

FEDTSYRER I MUSLINGER

Danske lineproducerede blåmuslinger (*Mytilus edulis*) mulig anvendelse som kosttilskud af vigtige omega-fedtsyrer til sammenligning med eksisterende muslingeolie fra New Zealandske grønlæbede muslinger (*Perna canaliculus*)

Fatty acid in mussels

Danish line-produced blue mussels (*Mytilus edulis*), possible use as dietary supplements of essential omega fatty acids for comparison with existing mussel oil from New Zealand greenlipped mussels (*Perna canaliculus*)



Syddansk Universtet, Det Tekniske fakultet, Institut for kemi-, bio- og miljøteknolog.
Diplomuddannelsen i bioteknologi procesteknologi og kemi.
Afgangsprojekt sommeren 2009, Vejleder Lektor Bent Lyager

Annette Høyvald Studienr. 4760

Resume

Formålet med denne rapport har været at undersøge ved litteraturstudier, kombineret med en mindre forsøgsrunde, mulige forskelle og ligheder af fedtsyreindhold og sammensætning i to forskellige arter af muslinger produceret på liner; den danske blåmusling (*Mytilus edulis*) og den New Zealandske grønløbede musling (*Perna canaliculus*). MarBioShell projektet, i samarbejde med SDU, ser på produktion af linemuslinger i åbne farvande til erstatning for nedgangen i muslingefangsten i fjordene. I forbindelse med høst af lineproducerede muslinger frasorteres en del spild, afhængig af årstiden, bestående af mindre muslinger der ikke er anvendelig til konsumbrug.

Den grønløbede musling er anerkendt for sit unikke indhold og kombination af vigtige omega-3 fedtsyre. Dette gør at den grønløbede musling ikke kun anvendes til konsum, men at der også er udviklet en hel industri inden for dens anvendelse som kosttilskud, jf. andre kommercielle fiskeolier. Der betragtes muligheden for anvendelse af lineproduceret blåmuslinger's indhold af relevante omega 3-fedtsyre til fremstilling af kosttilskud jf. allerede eksisterende muslingeolie fremstillet fra den New Zealandske lineproducerede grønløbede musling. Muslingeoliens hovedbestanddele, jf. varedeklarationen, er EPA(Eicosapentaensyre C20:5n3) og DHA(Docosahexaensyre C22:6n3) som det kendes fra fiskeolie, men derudover skulle det indeholde en række andre vigtige omega-3 fedtsyrer, som bl.a. ETA(Eicosatetraensyre C20:4n3)og STD(Stearidonicysyre C18:4n3).

Denne tese ønskes udfordret ved undersøgelse og sammenligning af markedets eksisterende muslinge- og fiskeolier, over for de to muslingearters indhold af fedtsyrer. Dette medførte undersøgelser af eksisterende metoder til mulig bestemmelse af relevante fedtsyrer i marine produkter. Fedtsyrer bestemmes på Gaschromatografi ud fra deres analoger af fedtsyremethylester(FAME) fremstillet ved methylering. Til analyse og bestemmelse af fedtsyrer i muslinger og marine olier blev anvendt hurtigmetode OSM(One-step-metode)til FAME-fremstilling, frem for den mere traditionelle metode med en forudgående lipidekstraktion. På gaschromatograf blev analyseret prøver af forskellige fiskeolier, samt den grønløbede muslingeolie. Der blev deslige analyseret på lineproduceret blåmuslinger i forskellige størrelser, lokation og tidspunkt, samt på indkøbte frosne grønløbede muslinger fra New Zealand.

Metoden ansås værende velegnet til kvalitative bestemmelser ud fra valgte referencestandarder, hvorimod kvantitativ bestemmelse angav resultater med både ringe nøjagtighed og repeterbarhed. Kvantitative vurderinger af prøverne blev foretaget med absolut forbehold for anvendte metode og dens manglende verificering af pålidelige resultater. Forsøgsresultaterne herfra skal udelukkende anses som oplæg til yderligere undersøgelser og diskussioner omhandlende relaterede emner jf. dem fundet i litteraturen.

Kvalitativ bestemmelse angav fedtsyrerne EPA og DHA i samtlige marine olier. ETA og STD blev identificeret i de fleste andre marine olier, skønt dog i anseelig relative små mængder. Det kunne ej konkluderes at muslingeolie ikke indeholder ETA og STD set ud fra måleusikkerhed ved anvendte metode. EPA og DHA blev identificeret i både grønløbede muslinger (*Perna canaliculus*)som blåmuslinger(*Mytilus edulis*), desuden STD og ETA i relative små mængder. Der var ingen nævneværdig kvalitative forskelle mellem blåmuslingernes størrelser.

Med forbehold for anvendte metode, kan der ikke konkluderes at kun muslingeolie indeholder omega 3 fedtsyrerne EPA og DHA som også var at finde i lignende produkter af fiskeolie anvendt til kosttilskud. Ej heller, at det viste signifikante forskelle i antal af betydende fedtsyrer mellem grønslæbede muslinger og blåmuslinger.

Fra litteraturen blev der fundet argumentationer for, at indhold af lipider i muslinger varierer mht. deres reproduktionscyklus og fødetilgængelighed. Her angives at glycogen lagres over sommeren og bruges hen over vinteren, hvor proteiner og lipider anvendes som energi i forbindelse med gydning. Der er to kategorier af lipider, de neutrale lipider som er lagret fedt (primært sammensat af triglycerider), samt phosphorlipider der indgår i cellemembranen. Dette indikerer at muslinger anvender både glycogen og lipider (der ikke indgår som membranlipider) som energilager. Depotlipiderne består hovedsagelig af triglycerider hvis sammensætning ændres afhængigt af tilgængelige næringsstoffer, hvorimod membranlipider hovedsagelig består af phosphorlipider hvis sammensætning ikke ændrer sig nævneværdigt. En undersøgelse angav at muslinger fra lokationer med gode næringsforhold viste højere andele af triglycerider i forhold til phosphorlipider, hvor ringere næringsforhold deslige medførte en lavere andel af triglycerider. Fedtsyresammensætningen kan tilsvarende påvirkes af fødetilgængelighed, sæson/årstid, vandtemperatur og vanddybde ved levested, samt deres reproduktionscyklus. Forskelle i fedtsyresammensætning kan også findes i blåmuslinger og grønslæbede muslinger afhængigt af artens foretrukne fødevalg af plankton. Et relativt højere indhold af EPA i grønslæbede muslinger afledes af en primærføde bestående af diatomer/kiselagler med højt indhold af EPA. For blåmuslinger gælder det et relativt højere indhold af DHA jf. primærføde bestående af dinoflagellater med højt indhold af DHA.

Vægtes kommercielle muligheder for anvendelse af linemuslingers omega fedtsyrer, evt. med henblik på brugen af spildmuslingerne, ville yderligere undersøgelse anbefales. Dette være sig en kortlægning omkring mængder af fedtsyrer og deres sammensætning vedrørende muslingerne's størrelse, reproduktionscyklus, fødetilgængelighed og temperatur.

Abstract

The purpose of this project was to examine through literature studies, combined with a small experimental study, possible differences and similarities of the fatty acid content and composition in two different species of mussels produced by long-line culture; the Danish blue mussel (*Mytilus edulis*) and the New Zealand Green Lipped mussel (*Perna canaliculus*). MarBioShell project, in cooperation with the University of Southern Denmark, was looking at the production long-line mussels in open waters to compensate for the decline in clams catch in the fjords. Associated to the harvesting of line-produced mussels there are discarded amount of smaller mussels, depending on season, which are not suitable for human use, but with interest for other usage.

The green lipped mussel is recognized for its unique content and combination of essential omega-3 fatty acids. This makes the green lipped mussel not only suitable for consumption, but there are also developed a whole industry in its use as dietary supplements, like other commercial fish oils. The possibility of using line-produced blue mussels' content of relevant omega-3 fatty acid for the manufacture of dietary supplements are considered as in existing mussel oil obtained from the New Zealand line-produced green lipped mussel. Green lipped mussel oil main components, indicated in nutrient information, are EPA (Eicosapentaenoic acid C20:5n3) and DHA (docosahexaenoic acid C22:6n3) as known from fish oil, but in addition it should contain a number of other important omega-3 fatty acids, such as ETA (Eicosatetraenoic acid C20:4n3) and STD (Stearidonic acid C18:4n3). This project wish to challenge by examination and comparison of market existing mussel and fish oils in relation to the two mussel species and their content of relevant fatty acids. This led to studies of existing methods to allow measurement of relevant fatty acids in marine products.

Fatty acids are identified by Gas chromatography from their analogues of the fatty acid methyl esters (FAME) gained by methylation. For analysis and determination of fatty acids in mussels and marine oils there were used the rapid method OSM (One-step method) for FAME production, rather than the more traditional method using prior lipid extraction. By Gas chromatography samples of various fish oils were analyzed, as well as the Green lipped mussel oil. There were further analyzed blue mussels produced in different location looking at various size and harvest time, along with frozen green lipped mussels obtained from New Zealand.

This One-step method was considered suitable for qualitative determination measure up to selected reference standards, but against quantitative determination the method gave results with both poor accuracy and repeatability. Quantitative assessments of the samples were carried out with absolute consideration of method used and its failure to verify the indication of reliable performance. The experimental results can only be considered in preparation for further studies and discussions dealing with issues found in the literature.

Qualitative determination confirmed the omega 3 fatty acids of EPA and DHA in the marine oils. It could not be concluded that the mussel oil contains no ETA and STD due to method uncertainty. ETA and STD were generally identified in all marine oils, however, though considerable in relative small quantities. EPA and DHA were identified in both green lipped mussels (*Perna canaliculus*) and

in blue mussels (*Mytilus edulis*), also STD and ETA in relative small quantities, there was no significant qualitative differences between mussels sizes.

Subject to the method uncertainty, the postulate could not be verified that only the Green Lipped mussel's oil contains ETA and STD in comparison with similar products of fish oil used as dietary supplements. Nor that there may where considerable differences in the number of significant fatty acids between green lipped mussel and blue mussels.

Argumentation was found in the literature that lipids in mussels vary in terms of their reproductive cycle and food availability. It appears that glycogen will be stored over the summer and used during the winter, where proteins and lipids are used as energy for spawning. There are two categories of lipids, the neutral lipids as depot fat (primarily composed of triglycerides) and phospholipids used in the cell membrane. This indicates that mussels use both glycogen and lipids (excluded membrane lipids) as an energy store. Fat deposits consists mainly triglycerides of whose composition changes depending on the available nutrients, where as membrane lipids mainly consists of phospholipids which composition does not change significantly. One study indicated that mussels from locations with good nutrition availability showed the highest proportions of triglycerides compared with phospholipids, as well as lower nutritional conditions led in to lower proportion of triglycerides in mussels. Fatty acid composition is similar affected by food availability, season, temperature and water depth at the habitat and yet again of their reproduction cycle. Differences in fatty acid composition can also be found in blue mussels and green lipped mussels, depending on the species' preferred food choice of marine plankton. A relatively higher content of EPA in green lipped mussels derived from a primary feed comprising of diatoms with high content of EPA. For blue mussels, in contrary, a relatively higher content of DHA derived from the primary feed consisting of dinoflagellates rich in DHA.

Considering commercial opportunities for use of the line-produced blue mussel's omega fatty acids, with possibility of using the waste of smaller mussels, further investigation is recommended. This may be a mapping concerning quantities of fatty acids and their composition on the size, reproductive cycle, food availability and water temperature .

Forord

Rapporten er udarbejdet sommeren 2009 som afgangsprøve på Diplomuddannelse i Bioteknologi, procesteknologi og kemi. Projektet er foregået i samarbejde med Marinebiologisk forskningscenter(SDU) i forbindelse med MarBioShell-projektet for udvikling af bæredygtig produktion af off-shore linemuslinger i Danmark. Rapporten omhandler mulig anvendelse af blåmuslinger med inspiration fra den New Zealandske lineproduktion af grønblå muslinger hvorfra der udvindes marine olie til kommercielt kosttilskud. Ved udførelse af projektet's praktiske del blev benyttet laboratoriefaciliteterne på Syddansk Universitet, Det Tekniske fakultet, Institut for kemi-, bio- og miljøteknologi.

Emnet for rapporten er valgt fra personlig interesse i biokemi og procesteknologi, men har også yderligere vakt min nysgerrighed inden for marinebiologi. Det har været en fantastisk mulighed at få faglig indsigt inden for et felt der bevæger sig ud over min daglige erhvervsmæssige beskæftigelse i medicinalbranchen. Dette har givet mange fornøjelige og lærerige oplevelser i samarbejde med utrolig engagerende og inspirerende mennesker. I denne forbindelse vil jeg gerne takke alle dem der har været behjælpelige med udformning af henholdsvis forsøg, samt projektet i sin helhed.

- Min vejleder Lektor Bent Lyager, Institut for Kemi-, Bio- og Miljøteknologi, Syd dansk Universitet for altid behjælpelig vejledning gennem hele forløbet.
- Laboratorieleder Dorthe Lillesø og laboratoriepersonalet, Institut for Kemi-, Bio- og Miljøteknologi, Syd dansk Universitet for deres imødekomne hjælp ved laboratoriearbejde med både praktisk som faglig ekspertise.
- Lektor Lene Pedersen, Uddannelseskoordinator, Institut for Kemi-, Bio- og Miljøteknologi for hjælp i forbindelse med opstart af projektopgave.
- Hans Ulrik Riisgård Professor, Ph.D. & D.Sc. Marine Biological Research Centre
- Kim Lundgreen, Academic technical, administrative staff, Marine Biological Research Centre Tak for et rigtig interessant besøg på Marinebiologisk Forskningscenter i Kerteminde, samt god og inspirerende feedback og input til mit projekt.
- Mads Anker Jørgensen, SydFyns Linemuslinger, Nordshell, for levering af friske muslinger.
- Novo Nordisk A/S for opbakning og økonomisk støtte under hele Diplomuddannelsen i Bioteknologi, procesteknologi og kemi.

Projektet er udarbejdet af

Annette Høyvald / 2009.08.27

Indholdsfortegnelse

Indledning	1
Problemformulering	1
Læsevejledning	2
Blåmuslingen	3
Anatomi og levevis	3
Muslingeproduktion	5
Blåmuslingeopdræt i hængekultur	5
Muslinger som rensningsanlæg	6
Muslinger som råvare	7
Grønlæbede musling fra New Zealand	7
Muslinger som næringsmiddel	9
Lipider	11
Lipider og deres opbygning	11
Fedtsyrer i kosten	13
Essentielle fedtsyrer	13
Fedtsyrebestemmelse i muslinger og marine olier	17
Oprensning af lipider	18
Prøveforberedelse	19
Væskekstraktion	20
FAME	25
Basisk katalyseret transesterificering	26
Syre katalyseret esterificering/transesterifikation	26
One-Step-Methylering	28
Two-Step-Methylering	28
GC-analyse af FAME	30
Litteraturstudie vedrørende fedtsyrer i muslinger	33
Lipider i blåmuslinger	33
Blå og grønne muslinger	35
Konklusion	40
Eksperimentelle fedtsyrebestemmelser i muslinger og marine olier	42

Metodevalg.....	42
Kemikalier, materialer og prøver.....	43
Indledende forsøg	47
Forsøgsplaner og resultater.....	48
FAME-metode og test af prøver.....	52
Håndtering af muslinger.....	55
Konklusion	55
Forsøgsrunde til bestemmelse af fedtsyre i muslinger og marine olier.....	56
Resultater	57
Kalibreringskurver for internstandarder	57
Referencestandarder.....	58
Optimering af metode 2	59
Afprøvning af metode 1+2 og metode 2 med to forskellige internstandarder.....	60
Fedtsyrebestemmelse i olieprøver og muslinger	62
Våd- og tørstofbestemmelse på sorterede muslinger	69
Konklusion	71
Kvantitativ bestemmelse.....	71
Kvalitativ bestemmelse	72
Diskussion.....	73
Konklusion.....	77
Perspektivering.....	78
Ordliste: Forkortelser og definitioner	79
Litteraturliste.....	81

INDHOLD I APPENDIX OG BILAG - TILLÆG TIL RAPPORT

APPENDIX A: Gaschromatografi.....	3
APPENDIX B: Frysetørring.....	12
APPENDIX C: Statistik.....	25
BILAG I: Fedtsyrer.....	30
BILAG II: Varedeklaration af olier.....	32
BILAG III: FAME-referencer.....	37
BILAG IV: Protokoller.....	45
BILAG V: GC-parameter for valgte metoder.....	55
BILAG VI: GC resultater fra uge 50/2008.....	57
BILAG VII: GC resultater fra uge 6/2009.....	66
BILAG VIII: Resultatberegninger og kromatogrammer.....	88
BILAG IX: Risikovurdering, APV og produktinformation.....	98

Indledning

Problemformulering

- ❖ Danske lineproducerede blåmuslinger (*Mytilus edulis*) mulig anvendelse som kosttilskud af vigtige omega-fedtsyrer til sammenligning med eksisterende muslingeolie fra New Zealandske grønåbede muslinger (*Perna canaliculus*).

Baggrund og oplæg til projektformulering

Projektet er valgt ud fra et samarbejde med Marinbiologisk Forskningscenter under SDU. Her indgår MarBioShell projektet støttet af Det Strategiske Forskningsråd for fødevarer og sundhed (FøSu), der gennem koordinerede forskningsaktiviteter på fire deltagende danske universiteter (SDU, KU, DTU, AAU) og Dansk Hydraulisk Institut (DHI) har til formål at fremme en udvidelse af miljømæssigt bæredygtig og rentabel produktion af muslinger i Danmark. Der ønskes bla. undersøgt hvilke muligheder der er for oprensning og anvendelse af muslinger, ikke mindst med interesse for spildmuslinger. I forbindelse med høst af lineproducerede muslinger frasorteres en del spild, afhængig af årstid, bestående af mindre muslinger der ikke er anvendelig til konsumbrug.

Jeg har valgt at fokusere på fedtindholdet i muslinger ud fra den nuværende sundhedsmæssige interesse for marine olie, med særlig vægt på essentielle fedtsyre(omega 3 og 6), og deres mulige virkning på hjerte-karsygdomme og inflammatoriske tilstande.

Fra den lineproducerede New Zealandske grønåbede musling, der fanges hele året, bliver olie bliver udvundet og anvendt som kosttilskud, der reklameres med at indeholde en unik sammensætning af vigtige omega-3 fedtsyre jf. andre kommercielle fiskeolier. Her ønskes udfordret belægget for denne tese, ved undersøgelse og sammenligning af markedets eksisterende muslinge- og fiskeolier. Deslige ønskes belyst, ud fra litteraturstudier, mulige forskelle og ligheder af fedtsyreindhold og sammensætning i de to arter af muslinger.

Der er foretaget indledende litteraturstudier før fastsættelse af målsætning. Her er fundet at blåmuslingens fedtindhold(ca. 2 %) er noget lavt og at de lager deres energi primært som glycogen(ca. 3 %), men at mængden og variationen af fedtstoffer varierer i forhold til tid(reproduktionscyklus) og ydre fysiske forhold.

Hypotese

Lineproduceret blåmuslinger indeholder relevante omega 3-fedtsyre til mulig fremstilling af kosttilskud jf. allerede eksisterende muslingeolie fremstillet fra den New Zealandske lineproducerede grønåbede musling.

Målsætning og projektafgrænsning

Der ønskes at belyse grundlaget for mulig anvendelse af blåmuslinger og evt. udnyttelse af spildmuslinger, til marine olie, jf. den grønåbede New Zealandske musling, sammenholdt med fiskeolier der almindeligvis anvendes som kosttilskud.

Emnet ønskes i første omgang belyst ud fra en teoretisk vinkel med baggrund i allerede eksisterende litteratur omhandlende undersøgelser af muslinger og deres fedtsyresammensætning. Dernæst ønskes undersøgt muligheder af eksisterende metoder til bestemmelse af relevante fedtsyrer i marine produkter med vægt på GC-analyse. Efterfølgende kan afprøves udvalgte analysemetoder i laboratoriet på indhentede prøver af forskellige fiskeolier og grønlæbede muslingeolie.

Der tilstræbes analyser på friske lineproduceret blåmuslinger i forskellige størrelser og, hvis muligt, på frosne grønlæbede muslinger fra New Zealand. Selve projektets praktiske del udføres på laboratoriet ved SDU i Odense. Da jeg er bosiddende på Sjælland, samt projektet indgår som afslutning på et studie ved siden af arbejdet, er selve forsøgsdelen af projektet begrænset til 2-3 uger. Forsøgsarbejdet er ment som oplæg til videre undersøgelser, ud fra sammenholdning af dertil fundne resultater fra litteraturstudier.

Målgruppe

Sm målgruppe for dette projekt er vægtet personer med interesse og relationer til samarbejde med Marinbiologisk Forskningscenter under SDU. Desuden personer og firmaer der er beskæftiget indenfor fiskeri og produktion af linemuslinger, samt visse områder indenfor fiskeolieindustrien.

Læsevejledning

Rapporten indleder med en introduktion omhandlende blåmuslinger og marine olier efterfulgt af et teoretisk afsnit om lipider og de essentielle fedtsyrers betydning. Herefter vil der gennemgås metoder relevant for bestemmelse af fedtsyre i muslinger og marine olier med vægt på teknikker omkring oprensning og methylering af fedtsyrer til GC-analyse. Ud fra valgte metoder og forsøgsplaner gennemgås resultater og konklusioner, jf. forudgående litteratursøgninger på fedtsyrer i muslinger.

Der henvises til litteraturlisten for monografier og artikler. Referencer er angivet i rapporten ved monografier med et nummer og side, for artikler ved et A efterfølgende et nummer. Alle referencer der henviser til web-steder er angivet direkte i rapporten ved aktuelle tekster.

Gennem hele rapporten vil de vigtigste faglige begreber og definitioner, samt diverse forkortelser, blive forklaret kort første gang de nævnes hvis det findes relevant for den tekst de indgår i. Her vil de efterfølgende markeres med en *, første gang de nævnes i et selvstændigt afsnit, som henviser til forklarende ordliste (alfabetisk rækkefølge) placeret sidst i rapporten.

Appendix og bilag er grundet omfanget samlet i et separat bind. Under indholdsfortegnelsen i rapporten er anført indholdet af "Appendix og bilag tillæg til rapporten".

Blåmuslingen

I denne rapport dækker betegnelsen "muslinger" hovedsagelig blåmuslinger og i visse tilfælde også grønslæbede muslinger, desuden kan der være tale om en fælles betegnelse for alle arter af f.eks kammuslinger, hjertemuslinger og andre muslingearter. Betegnelsen "skaldyr" dækker i daglig tale almindeligvis alle slags muslinger/ østers. I systematisk biologi er "muslinger" den danske betegnelse for klassen Bivalvia (toskallede bløddyr) i rækken Mollusca(bløddyr). "Toskallede bløddyr" er således den mere præcise, biologiske og lovgivningsmæssige betegnelse for blåmuslinger og østers m.v., hvorimod "skaldyr" i samme terminologi omfatter krebsdyr, d.v.s. rejer, hummer m.v. [www.fd.dk]

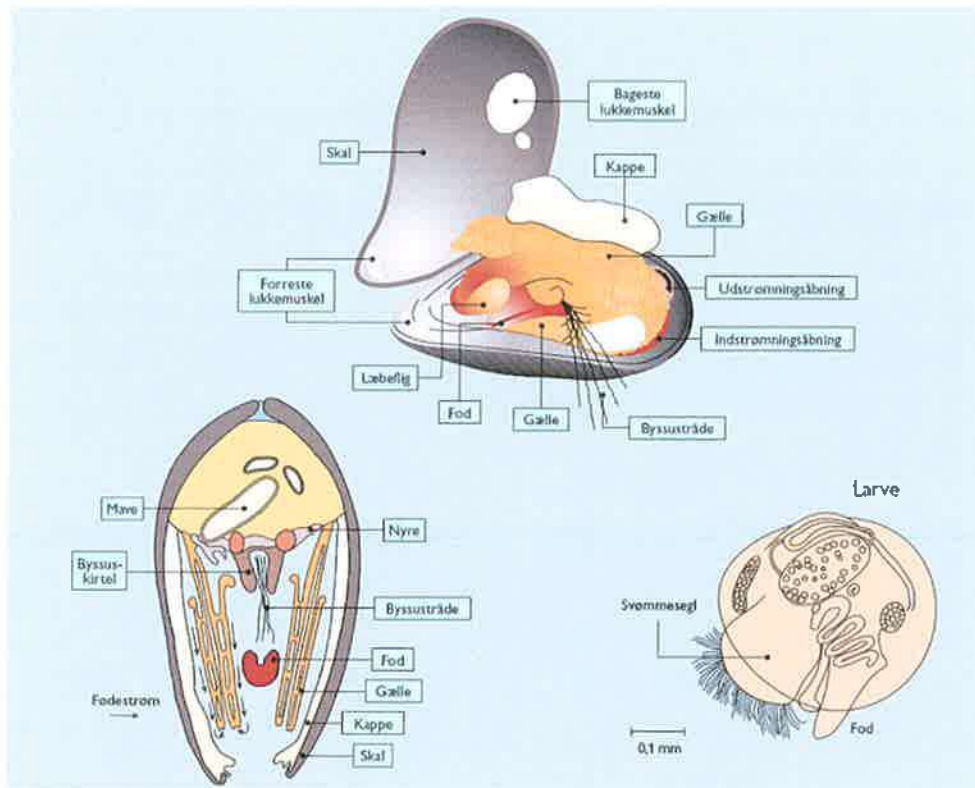
Anatomi og levevis

Muslinger (*Bivalvia*) er en klasse af dyr, der hører til bløddyrerne, hvor af blåmuslingen med det latinske navn *Mytilus edulis* betyder familien af muslinger der er spiselige. Blåmuslingen har karakteristiske sort-blå-violette glatte ovale skaller med en bukket i forenden og kan blive op til 10 cm lang. Den er udbredt i de danske farvande og findes både i saltvand og brakvand, helt ind i Østersøen og i fjordene. Næsten overalt i vores farvande vil man på beskyttede steder finde tætte banker af blåmuslinger der kan være op til 12.000 individer på en m², men de sidder også på pæle, sten og høfder. De stiller ikke særlige krav til dybde, og findes både på helt lavt vand i strandkanten og ud til 7-8 meters dybde og lokalt meget dybere. Deres udbredelse bestemmes hovedsageligt af vandets iltforhold og fødebeholdningen.

Som sikring mod at blive transporteret væk med strøm eller bølger fæstner blåmuslingen sig til underlaget ved hjælp af særlige jernholdige tråde, byssustråde. Byssustrådene kan hæfte til andre muslinger i en muslingebanke, eller til bundgarnspæle, sten m.m. Bliver livsvilkårene forringede, er blåmuslingen i stand til at frigøre sig fra byssustrådene og kravle et lille stykke væk ved hjælp af sin fod eller lade sig føre med strømmen. Muslingen fæstner sig igen med nye byssustråde og fortsætter livet under forhåbentligt bedre livsbetingelser. Dette er selve grundlaget for at man kan udtynde og omplacere blåmuslinger i forbindelse med kulturdyrkning.

Blåmuslingen beskytter sig mod fjender ved kalkskallerne, som den kan lukke fast sammen med to stærke lukkemuskler. Strandkrabber og søstjerner har dog kræfter nok til at tvinge skallerne fra hinanden og æde blåmuslingen, samt mange fisk lever af blåmuslingeægel, og nogle vadefugle, måger og ænder æder også blåmuslinger.

Blåmuslingen er filtrator med gæller der består af to "blade". Ud over at forsyne muslingen med ilt, optaget fra vandet, er gællerne også fødeopsamlingsorgan. Blåmuslinger lever af partikler, som de ved hjælp af gællerne filtrerer fra det omgivende vand. Ciliebevægelser på gællernes overflade sørger for, at fødeemnerne transporteres til munden. En voksen musling kan filtrere ca. 10 liter om dagen. Muslinger er altså ikke selv i stand til at sortere eventuelle uheldige fødeemner fra. Det er derfor vigtigt, at man ikke spiser blåmuslinger, som har levet ved spildevandsudløb o.l. Se figur 1.



Figur 1. Muslinger er tosidet-symmetriske dyr og kaldes ofte toskallede bløddyr, fordi de har en toklappet kalkskal omkring de bløde dele. Den beskyttende kalkskal udskilles bl.a. fra kappen, der omgiver dyrets krop. Mellem kroppen og kappen er der et hulrum, kappehulen. Gællerne findes også i kappehulen. De bløde dele består af en indvoldssæk, lukkemuskler og kønsorganer (gonader), der udgør kroppen, samt en fod.[1; p.47]

Blåmuslinger er enkeltkønnet og kan blive kønsmodne i det første leveår, alt efter størrelse og livsbetingelser. En hun kan gyde 5-12 mio. æg frit ud i vandet, til ekstern befrugtning fra en hans sperm. Befrugtes æggene udvikles de i løbet af 24 timer til små muslingelarver, der i en periode lever i de frie vandmasser som dyreplankton, før de slår sig ned. Herefter finder de et egnet sted at fastsætte sig vha. deres bysstråde, for at udvikle og vokse sig til muslinger.

Generelt kan reproduktionscyklussen inddeles i fire perioder, gydningsperioden i sommerhalvåret (april-juni måned), hvileperiode efter gydningen, gonadeudviklingen gennem vinterhalvåret og herefter en periode med modne gydeklare gonader. En visuel vurdering af muslingens indhold kan bestemme dens modningsstadiet ud fra gonadens størrelse, form og farve. Gonaden, hvor æg og sperm bliver produceret, ligger i kappen og typisk er hunnerne's rødbrune til gulorange, hvor hannerne's er creamfarvet. Vægten indikerer om det er før eller efter gydning hvor der sker et markant vægttab af gonaden, dog med forbehold for det samlede vægttab da der samtidig sker øgning i vægt af andre bløddele samt ændring i energidepoter. Helt sikker bestemmelse af kønsproduktion sker bedst vha. mikroskopi. Blåmuslingerne kan have en hvileperiode i løbet af august-oktober, hvorefter næringsdepot, hovedsageligt glykogen, vil lagres i kappen. Opbygning og indhold i næringsdepoter er afhængige af fødetilgangen, så variationer mellem områder og mellem år kan være store. De energirige næringsdepoter bruges til udvikling af gonaderne gennem vinteren når temperatur og fødetilgangen er lav. Blåmuslinger er funktionelt klare til at gyde sent på vinteren og det sker så snart havtemperaturen netop er nået over 10°C, dvs. at muslingerne kan bringes til at

gyde tidligere ved "kunstigt" at hæve temperaturen. Gydningsraten hos blåmuslingen er i stor grad styret af miljøfaktorer. Temperaturen er vigtig men også tilgangen af føde og vandets saltindhold spiller ind. Alderen på muslingerne har også en betydning, hvor unge muslinger kan nogle steder gyde senere på sommeren end ældre muslinger [4;p.43- 49, 53]

Muslingeproduktion

Op gennem 1980'erne og 90'erne udviklede muslingefiskeriet i Danmark sig særdeles positivt. I takt med industriens udvikling og evne til at udnytte markedets efterspørgsel, steg fiskeriet på muslinger (vildtfangende som kulturbanker).

Fiskeriet har i perioder landet op mod 100.000 tons muslinger årligt, hvilket på verdensplan har udgjort ca. halvdelen af den landede mængde af fiskede blåmuslinger. I de senere år er mængderne dog faldet drastisk, og i 2008 blev der samlet landet ca. 36.000 tons, som følge af en nedgang i den naturlige bestand.

Ved en produktion af blåmuslinger på line i de åbne danske farvande håber man at kunne imødegå faldet i landede muslinger fra fjorde og kystområder. Nedgangen skyldes sandsynligvis en kombination af manglende tilgang af yngel, stor dødelighed på grund af iltsvind, samt fiskerimetoder som fjerner de sten og skaller, der er vigtige for overlevelsesraten af blåmuslingeyngel. Allerhelst vil man erstatte disse fangster helt, hvor der skræbes fra bunden med kraftige trawl af jernkæder, med mere miljøskånsomme metoder som f.eks. langliner. Eksempelvis lider Limfjorden alvorligt under den hårdhændede skræbning af muslingebankerne, hvor store dele af fjordbunden herefter ligger død og øde hen på grund af iltsvind. [fd.fvm.dk], [www.dfu.min.dk]

Blåmuslingeopdræt i hængekultur

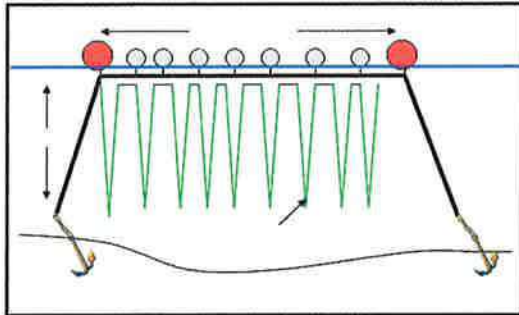
Muslingeopdræt er mere skånsomt mod havbunden end fiskeriet, hvor havbunden påvirkes af de bundslæbende fiskerredskaber. Til gengæld skal der ved placeringen af muslingeopdræt tages en lang række hensyn til bl.a. rekreative og kommercielle interesser og til naturbeskyttelse.

Blåmuslingerne kan opdrættes på langliner – enten på single drop-liner, hvor linerne hænger enkeltvis lodret ned i vandet, eller på kontinuerte liner, hvor lange liner hænger som guirlander i vandet. Se figur 2.

Ud over mængden af plankton* i vandet, som jo er blåmuslingernes hovedfødekilde (de lever også af opslæmmede organisk bundmateriale) er fødetilgængeligheden og egnede arealer til fasthæftning af muslingen meget afgørende for muslingetilvæksten. Muslinger, der sidder på bunden, får kun kontakt med planktonet, som hovedsagelig befinder sig i de øvre vandlag hvor lyset er, såfremt strøm og bølger fører vand med plankton ned til muslingerne. Anderledes forholder det sig med blåmuslinger, der slår sig ned på bøjer og andet, der flyder frit i vandet. Her befinder muslingerne sig altid midt i planktonsuppen, de har vand (=føde) hele vejen rundt om sig og normalt er der strømme, der hele tiden fører nyt planktonvand til. I tilgift er der normalt altid rigelig med ilt i de øvre vandlag i modsætning til mange bundområder i beskyttede eutrofierede* (se næste afsnit) fjordområder, som ofte rammes af iltsvind om sommeren.

Muslinger dyrket på liner vokser hurtigere og har et højere kødindhold, end muslinger fra havbunden, fordi der er mere føde oppe i vandsøjlen end på bunden. Muslingerne på liner har

ydermere den fordel, at krabber og søstjerner normalt ikke kan true dem. Det tager ca. et år for linemuslinger at vokse til salgbar størrelse. Til sammenligning tager det ca. 3 år for bundmuslinger. Muslinger fra langlineopdræt afsættes ofte til fersk konsum, mens en stor del af muslingerne fra bunden også anvendes i den øvrige muslingeindustri. [www.limfjord.dk],[www.aqua.dtu.dk]



Figur 2. Skematisk opbygning af lineopdræt. [marbioshell.biology.sdu.dk]

Muslinger som rensningsanlæg

Store bestande af blåmuslinger kan filtrere store vandmængder (op til 10 L/h/voksen musling) og dermed indvirke betydeligt på balancen i havet. Muslinger fjerner næringssalte fra vandet gennem fødeindtag af alger, og gavner på den måde vandmiljøet. Kystnære farvande er mange steder påvirket af næringsrige udledninger fra landbrug eller fiskeopdræt, især af nitrat og fosfat, der påvirker næringspyramiden i søer og havområder og dermed forårsager øget vækst af planktonalger. Dette kaldes eutrofiering* og medfører at de mange alger gør vandet uklart, så der nogle steder ikke kan trænge nok sollys ned til vandplanterne på de dybere steder. Desuden kan der opstå iltvind, fordi bakterier bruger ilt i vandet til at nedbryde de mange døde alger.

Muslinger lever af at filtrere partikler fra vandet og kan påvirke forholdene ved øget vækst af alger og sedimentation af dødt organiske materialer. Muslingernes vigtigste føde er planteplankton og der findes en række eksempler på at store naturlige forekomster af muslinger fjerner planteplankton og derved "renser" vandet. Når de filtrerer algerne optager de bla. det fosfor og nitrogen, som algerne indeholder og påvirker derved de vigtige elementer i eutrofieringssammenhængen. Men i forhold til muslinger er det væsentlig at tage hensyn til at de også optager andre partikler som følge af forurenende udledninger fra land, der kan have indflydelse på om muslingerne kan bruges til fødevarer. [4; p.97-98]

For at illustrere forholdene mellem blåmuslingedyrkning og miljø i forhold til forurening er der gjort en del betragtninger på nitrogenomsætningen. Der kan opsættes en massebalance for nitrogen i fødepartiklerne som muslingerne filtrerer; ca. 25 % går til produktion af muslingekødet, 25 % optages ikke og returneres som partikulær afføring, hvor de sidste 50 % er metaboliske affaldsstoffer, som ammoniak, der straks giver ny næring for planteplankton. Ved høst af 100 tons blåmuslinger fjernes på den måde en del af næringsstoffer fra havmiljøet, svarende til ca. 900 kg kvælstof og 100 kg fosfor. [4; p.97-98],[www.linemuslinger.dk]

Muslinger som råvare

Set ud fra et ernæringsmæssigt synspunkt bør fisk og skaldyr, der indeholder både proteiner, fedtstoffer og mineraler, udgøre en stor del af vores kost. Muslinger er en udmærket proteinkilde, som desuden indeholder sunde marine fedtsyre, flere vigtige vitaminer og er en glimrende kilde til jod og en række vigtig sporstoffer. Friske muslingerne er levende når de købes og nogle enkle og få forholdsregler skal overholdes, når disse tilberedes kogte eller stegte. De skal være friske og skallerne skal i ubehandlet stand være lukkede. Hvis de er døde, kan de være dårlige, og derfor er det vigtigt at sortere døde muslinger fra. Efter kogning skal de, somderimod ikke åbner sig, kasseres.

Muslingers smag, farve og næringsindhold afhænger af det miljø som de kommer fra mht. føde, salinitet/saltindhold og temperatur. Dog er selve høsttidspunktet af stor betydning i fht. muslingens reproduktionscyklus, da største del af muslingekødet består af gonade og energidepoter. Ved god fødetilgang om sommeren oparbejder muslingen energireserverne der bruges gennem vinteren, når fødetilgangen er begrænset, til opretholdelse af metabolisme samt kønsproduktion i gonaden. Disse energilagre består hovedsagelig af kulhydrater, som glykogen*, der giver muslingen dens smag og sødme, hvor fyldningsgraden i gonadene bestemmer volumen af muslingekødet. Opbygning af gonadene forsætter så længe der er føde hen over vinteren frem til tidlig forår, lige før gydning. Når kønsprodukterne modnes til gydning forbruges glykogen gradvis, samtidig med at lipidindholdet øges. Under gydningen i foråret/sommeren tømmes gonaderne med op til 70 % af deres fyldningsgrad og muslingerne bliver magre, vandige og farveløse herefter. Det er derfor velkendt at vinterperioden, frem til gydning i foråret, er højsæson for muslinger mht. smag og volumen.

På verdensplan ses en stigende efterspørgsel efter marine fødevarer, og der dyrkes og høstes mange millioner tons muslinger årligt. Blåmuslinger bliver regnet for en stor delikatesse i europæiske lande, hvor der dyrkes to arter af blåmuslinger, den hjemlige danske *Mytilus edulis* og den lidt større middelhavs blåmuslinge *Mytilus galloprovincialis*. Industrien eksporterer blåmuslinger enten ferske, røget, kogte, frosne eller som konserves. Men også andre muslingearter er ved at vinde indpas på vores hjemmemarked inden for de sidste par år, bl.a. er den grønslæbede musling *Perna canaliculus* fra New Zealand kommet til frysediskene i detailhandlen både i Danmark som i resten af Europa. [4;p.235-236,242-244]

Grønslæbede musling fra New Zealand

Grønslæbede musling (*Perna canaliculus*), også kaldt grønne muslinger (Greenshell), der findes i New Zealand, er en art af toskallede bløddyr i familien Mytilidae, ligesom blåmuslingen (*Mytilus edulis* og *Mytilus galloprovincialis*). Se figur 3a-c. Den adskiller sig fra andre muslingearter i, at den har en mørk brun/ grøn skal, en grøn læbe omkring kanten af skaller og kun har en stor lukkemuskel. Det er også en af de største muslingearter der kan blive op til 24 cm i længden. Den grønslæbede musling blev høstet manuelt fra kystlinjen i New Zealand indtil 1960'erne, hvor større efterspørgsel motiverede industrien til at udvikle moderne muslingefarme ved dyrkning på langliner støttet af bøjer. Se figur 4. Muslingerne vokser på tovværk ved at filtrerer planteplankton fra vandet og er modne til høst efter 12- 18 md med en størrelse på 9-12 cm. Frosne muslinger er hurtigt blevet en af de vigtigste eksportvare i New Zealand, og går under varebetegnelse Greenshell™, med salg i over 60 lande.



Figur 3a. Mytilus edulis (Blåmuslingen/ pælemusling) har karakteristiske sort-blå-violette glatte ovale skaller med en bukket i forenden og kan blive op til 10 cm lang. Den er udbredt i det meste af europa, fra det nordlige Spanien til Østersøen til det Arktiske Hav.[www.scandfish.com.]



Figur 3b. Mytilus galloprovincialis (Middelhavs blåmuslingen) er hjemmehørende i Middelhavet, Sortehavet og Adriaterhavet. Den ligner Mytilus edulis, men kan skelnes ved den spidsere og let bøjede umbo og sin mørkeblå eller brun til næsten sorte farve og kan blive op til 15 cm, dog typisk kun 5-8 cm. [www.scandfish.com]



Figur 3c. Perna canaliculus Greenshell mussel (Den New Zewlandske grønåbede musling) lever kun i havområde omkring New Zealand. Den kendetegnes ved sin grønne skal, men kan også have mørke striber eller være mere brunlig. De kan blive normalt 18-20 cm.[www.scandfish.com]

Den grønåbede musling er anerkendt for sit unikke indehold og kombination af fedtsyre. Dette gør at den grønåbede musling ikke kun anvendes til konsum men at der også er udviklet en hel industri inden for dens anvendelse som kosttilskud. Muligvis ud fra den yderst interessante betragtning at hullet i stratosfæren's ozon bevirker at dyrelivet i og omkring New Zealand har meget højere niveauer af de naturlige antioxidanter. Hvilket også skulle gøre sig gældende for havet's plankton som er den grønåbede musling vigtigste fødekilde.[www.green-lipped-mussel-oil.com]



Figur 4. Grønåbede muslingefarm fra New Zealand hvor muslinger dyrkes på langliner støtte af bøjer.[www.seapro.co.nz]

Muslinger som næringsmiddel

Fisk og skaldyr indeholder mange af de næringsstoffer, organismen skal have tilført, for at den kan fungere optimalt. I rå tilstand indeholder fisk og skaldyr et relativt højt indhold af proteiner, typisk 20 g protein pr. 100 g, små og ubetydelige mængder kulhydrater, samt ingen kostfibre.

Nedenstående tabel 1 viser næringsstoffer for nogle fede og mager fisk, samt skaldyr.

Indhold/ 100 g		Laks	Ørred	Rødspætte	Torsk	Tobis	Sperling	Blåmusling	Østers
Energi	kJ	769	569	393	349	377	353	384	261
Protein	g	18,4	18,5	19,1	19,2	18,8	18,5	14,4	7,8
Kulhydrat	g	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	4,2
Fedt	g	12,0	6,7	1,8	0,6	1,5	1,0	2,2	1,5
Mættede fedtsyrer	g	-	1,50	0,34	0,10	-	-	0,34	0,62
Enkeltumættede fedtsyrer	g	2,26	2,43	0,30	0,04	-	-	0,37	0,30
Flerumættede fedtsyrer	g	3,30	2,02	0,55	0,25	-	-	0,36	0,15
heraf n-3 fedtsyrer	g	3,32	1,76	0,54	0,25	-	-	0,27	0,38
Kolesterol mg	mg	3,0	31	-	60	60	-	38	0,34
Vitaminer og mineraler									
D-Vitamin	µg	30	13	3	1	-	-	0	1
Jod	µg	30	5,3	40	188	-	-	140	60
Selen	µg	19	26	30	-	-	-	46	49

Tabel 1. Tabel over energi- og næringsindhold med f.eks på fede fisk som Laks og Ørred, mager fisk som Rødspætte og Torsk. Industriefisk Tobis og Spelling, samt skaldyr Blåmusling og Østers.

[www.langkaer.dk/ocean98]

Der er ganske stor forskel på, hvor meget fedt den enkelte fiskeart indeholder, fed eller mager fisk, hvor skaldyr almindeligvis er fedtfattige. Både fisk og skaldyr indeholder de essentielle flerumættede n-3 fedtsyrer også kendt som de vigtige omega 3 fedtsyrer¹.

Fiskeolie har i de senere år været særdeles promoveret som middel mod en stribe af de såkaldte velfærdssygdomme, der hænger sammen med kolesterolindholdet i blodet, f.eks. hjerte- og kredsløbssygdomme. Fiskeolie indeholder de omega-3 fedtsyrer, som kroppen har brug for. Der er især to omega-3 fedtsyrer, eikosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA), der anses for særligt vigtige og gavnlige for sundheden. Fiskeolie menes at bidrage til at reducere risikoen for hjerte/ kar-problemer, nedsætte blodtryk, stabilisere hjerterefrekvens og virke blodfortyndende. Hjernen og alle kroppens celler har brug for disse essentielle fedtsyrer og arbejder bedre, hvis de har god adgang til dem, men også leddene og huden har godt af omega-3 fedtsyrer.

Fiskeolie er olie udvundet af fisk (f.eks makrel, laks, sild, ansjoser og sardiner) ved kogning, presning og centrifugering. Fiskeolie sælges i koncentreret form på flaske eller i form af kapsler enten som kosttilskud eller med betegnelse naturlægemiddel.

¹ De forskellige fedtstoffer og deres betydning beskrives nærmere under afsnit "Lipider"

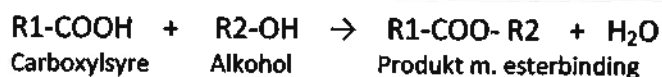
I Danmark er der også kommet et fabrikat af muslingeolie på markedet, Original muslingeolie (grønlæbede) forhandlet af firmaet Novasel. Dette produkt forhandles som kosttilskud og ikke naturlægemiddel, hvor kravene til dokumentation er øget, hvilket betyder at oplysningerne om muslingeoliens fordele ikke er så tilgængelige. Muslingeoliens hovedbestanddele er EPA* og DHA* som det kendes fra fiskeolie, men derudover skulle det indeholde en række andre omega-3 fedtsyrer, som bl.a. STA* og ETA*. Desuden mindre ubetydelige mængder af steroide*, frie fedtsyrer og polære fedtstoffer. Den flydende muslingeolie er ekstraheret af det frysetørrede muslingepulver fra den grønslæbede musling (*Perna canaliculus*), som dyrkes ved New Zealand. [www.fiskolja.se], [www.novasel.dk], [www.langkaer.dk/ocean98]

Lipider

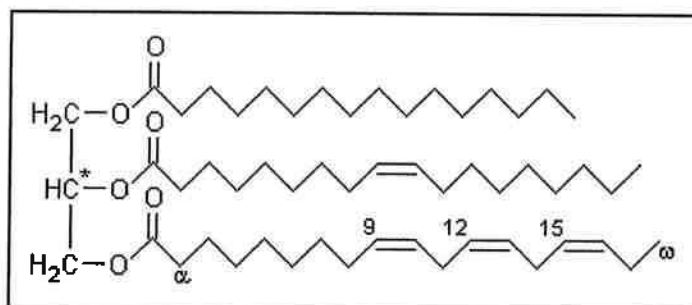
Lipider og deres opbygning

Lipider er bredt defineret som biologiske molekyler, der er opløselige i organiske opløsningsmidler. Kemisk set udgør lipider grupper af meget forskellige stoffer som olier, fedtstoffer, voks, phosphorlipider, glycolipider, steroider, hormoner og fedtopløselige vitaminer (K, E, D og A). Fedt er en vigtig bestanddel af kroppens cellemembraner og hormoner og er nødvendig for at andre fedtopløselige næringsstoffer kan optages fra tarmen. Fedtsyrer er hovedbestanddelen i fedt. Fedtsyrer (FA), er organiske syrer, der har det fælles, at de består af lange, ofte uforgrenede kæder af kulstofatomer (mellem 4 og 24) med netop én carboxylsyregruppe (-COOH) i den ene ende. (Se bilag I for oversigt af forskellige fedtsyrer.)

Der findes mange forskellige fedtsyrer, som adskiller sig fra hinanden ved at have kæder af kulbrinter af meget forskellig længde. De kan også adskilles efter antallet af dobbeltbindinger mellem kulstofatomerne. De lange, vedhæftede kæder kan være helt mættede, dvs. at de udelukkende indeholder enkeltbindinger. Eller de kan være umættede, hvilket betyder, at de har én eller flere dobbeltbindinger. En fedtsyre med mere end én dobbeltbinding kaldes også en flerumættet fedtsyre (PUFA*). Fedtstoffer, der er opbygget på grundlag af mættede fedtsyrer, er faste ved stuetemperatur, hvorimod de umættede fedtsyrer er mere flydende, som olier. De almindeligste fedtstoffer/oier er triglyceriderne, der består af glycerol (en alkohol), hvorpå der sidder tre fedtsyrekæder bundet via esterbinding. Se figur 5 og 6. Glycerol molekylet kan være forestret med 1, 2 eller 3 fedtsyrer eller phosphorsyrer til hhv. mono-, di- eller triglycerider eller phosphorlipider. Mest almindeligt er en længde på 16, 18 eller 20 kulstofatomer, da naturlige fedtsyrer i planter og dyr normalt har lige antal kulstofatomer i kæderne, hvilket skyldes den måde de syntetiseres ud fra acetyl-CoA*.



Figur 5. En esterbinding dannes mellem en carboxylsyregruppe og en alkoholgruppe under fraspaltning af et vandmolekyle. [5;p.37]



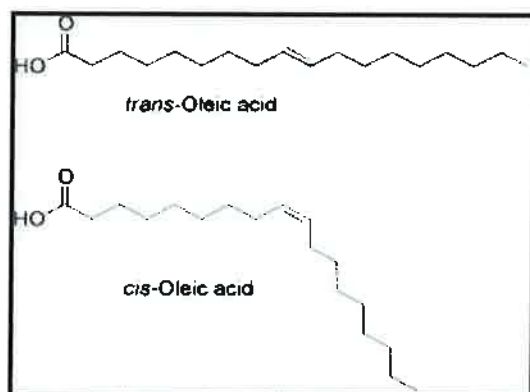
Figur 6. Triglyceriders kemiske formel er $\text{R1COO-CH}_2\text{CH(-OOCR2)CH}_2\text{-OOCR3}$, hvor R1, R2, og R3 er lange alkylkæder som kan være identiske eller forskellige. Figuren viser en triglycerid bestående af tre forskellige fedtsyrer; palmitinsyr (mættet), oliesyre (monoumættet), alfa-linolensyre (flerumættet omega 3).

[da.wikipedia.org/wiki]

Triglyceridmolekylet er amfifile*, hvilket vil sige at de både indeholdende den mere polære glyceroldel, hvor de 3 lange kulbrintekæder derimod er upolære. Fedtstoffer vil danne miceller* i vandig miljø, hvor de 3 kulbrintekæder samler sig med hinanden (og andre fedtsyrekæder) når de kommer i vand, således at glyceroldelen peger ud mod vandet mens fedtsyrekæderne gemmes væk fra vandet. Fedtstoffer har mindre amfifile egenskaber end fedtsyrene i sig selv, idet estergrupperne ikke er nær så hydrofile som carboxylgrupperne.

De lipider der især indgår i cellemembranerne, har i modsætning til triglycerider, en stærkere amfifil karakter ved at en eller flere af fedtsyrekæderne er udskiftet med en mere hydrofil gruppe, f.eks phospholipider, glycolipider, sphingolipider og steroler. I blodet findes lipoproteinerne som består af en kerne af hydrophobe lipider omgivet af en skal af polære lipider (phospholipid som phosphatidyl cholin (lecithin) og cholesterolestre) og til sidst en yderside af apoproteiner*. Disse proteiner indeholder signal-grupper som regulerer optagelse og udskillelse af forskellige lipider fra forskellige celler. Overordnet kan lipider inddeles i, de ikke-polære lipider som bl.a. tri-, di- eller monoglycerider samt andre frie fedtsyrer, og de polære lipider som phospholipider, spingolipider og glykolipider. Mængden og arten af lipid-klasser tages i betragtning når der skal vælges analysemetode til bestemmelse af lipid- og fedtsyresammensætning. [6;p.146-153],[7;p.178-179]

Dobbeltbindinger har en betydning for fedtsyrens struktur. Hvis carbonatomerne omkring en dobbeltbinding sidder på samme side, en cisdobbeltbinding, får carbonkæden et knæk. Når carbonatomerne derimod sidder på hver sin side af dobbeltbinding, transdobbeltbinding, giver det et mindre knæk i carbonkæden. Se figur 7. Der er stor forskel på de fysiske egenskaber for trans- og cisfedtsyre med samme antal C-atomer, transfedtsyrer har f.eks lavere smeltepunkt end cisfedtsyrer. Cisfedtsyrer er de mest almindelige forekomne fedtsyrer, hvor transfedtsyrer ofte optræder i forarbejdet fedtstoffer. På længere sigt er indtagelse af fødevarer med forhøjet transfedtsyreindhold mistænkt for at øge tilfælde af hjertekarsygdomme m.m. Transfedtsyrer opstår også naturligt i køers og fårs maver, hvorfor deres mælk også indeholder dem, men man mener dog at den naturlige form for transfedtsyrer er knapt så usund som de forarbejdet transfedtsyrer.



Figur 7. Nederst ses en dobbeltbinding i cis-konfiguration og øverst ses trans-konfiguration. Trans-konfigurationen giver ikke strukturen et lige så stort knæk som cis-konfigurationen. [da.wikipedia.org/wiki]

Konjugerede octadecadiensyrer er en gruppe af geometriske isomerer af linolsyre (conjugated linoleic acid, CLA). Konjugerede linolsyrer har dobbeltbindinger der er adskilt af en enkelt methylgruppe, i modsætning til normalt i flerumættede fedtsyrer hvor dobbeltbindingerne er adskilt af to methylgrupper. CLA er blevet sat i forbindelse med anticarcinogen virksomhed (hud, bryst og tarm cancerformer). CLA er til stede i mange forskellige fødevarer, højeste indhold findes i fødevarer som stammer fra drøvtyggere, som mælk og kødprodukter. Endvidere kan CLA fremstilles ved isomerisering ud fra umættede fedtsyrer i planteolier og forhandles som kosttilskud ved ønske om at øge muskelmassen og reducere fedtprocenten.

Forgrenede fedtsyrer er almindelige bestanddele af lipider i bakterier og dyr men forekommer også undertiden i integrerede lipider af højerestående planter. Mest almindelig er de mættede forgrenede fedtsyre, men umættede forgrenede fedtsyrer kan findes i marine dyr. Forgrenede fedtsyrer findes normalt som mono-methyl-forgrenet, men di-og poly-methyl- forgrenede er også kendt. Deres vigtigste funktion i cellemembraner er at øge lipidernes fluiditet som et alternativ til dobbeltbindinger, der er mere eksponeret for oxidation. [www.biosite.dk/leksikon/cla.],[htmwww.lipidlibrary.co.uk]

Fedtsyrer i kosten

Vores kostvaner er vigtige at få afstemt i forhold til kroppens behov. Der fokuseres først og fremmest på energifordelingen i vores kost, og fra hvilke af de tre grupper det kommer fra; kulhydrater, protein og fedt.

Der hersker bred enighed om, at mængden af fedt skal holdes på et begrænset niveau, men man kan absolut ikke undvære fedt i kosten. Fedt indgår bl.a. i vedligeholdelse af cellemembraner samt optagelse af fedtopløselige vitaminer. Kroppen har brug for fedt, ikke mindst de såkaldte essentielle fedtsyrer (omega-3 og omega-6) som kroppen ikke selv kan danne. Det er vigtigt at det fedt man indtager, er "sundt" fedt. De bedste kilder til de sunde fedtstoffer er vegetabiliske fedtstoffer, især dem i nødder, mandler, frø, bønner, fuldkorn, avocado, men også dem man får fra fisk, hvorimod det dårlige fedt mest kommer fra animalsk produkter(kød, mælkeprodukter). Fedtsyrerne opbevares i organismen i form af fedt og forskning viser, at indtagelse af store mængder af mættede fedtsyrer kan øge risikoen for åreforkalkning og hjerte-karsygdomme. Flerumættede fedtsyrer har til gengæld vist sig at have en gavnlig virkning på helbredet. Vegetabiliske olier indeholder forholdsvis lange og umættet fedtsyre som omega 6 og omega 9 fedtsyrer. Lange polyumættet fedtsyre, som eicosapentaensyre C20:5(EPA) og docsahexaensyre C22:6(DHA) er karakteristisk for marine olier. Disse fedtsyrer er begge omega 3 fedtsyrer. [5;p.37- 39],[www.netdoktor.dk]

Essentielle fedtsyrer

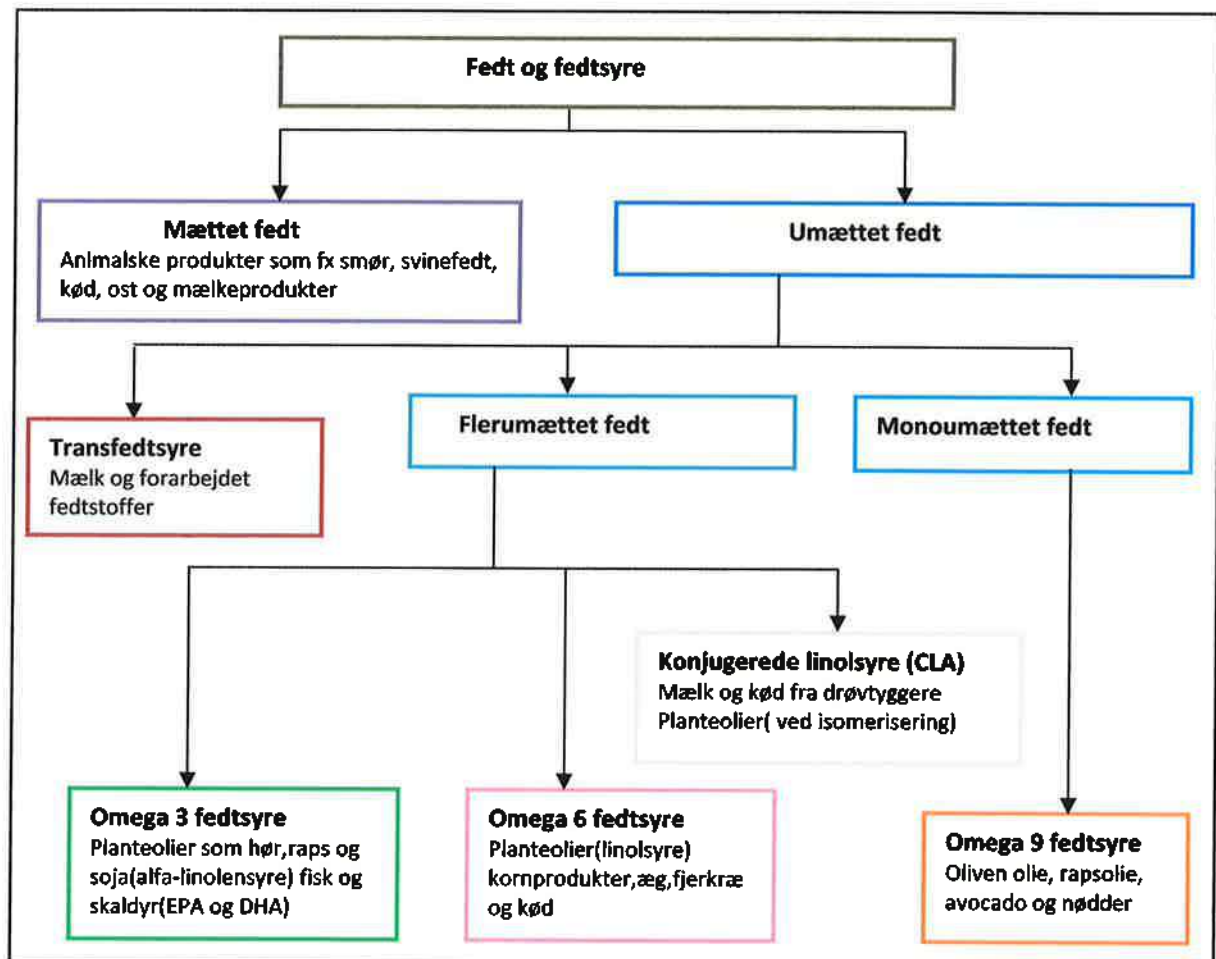
Fedtsyrer kan opdeles, i de ikke-essentielle fedtsyrer, som organismen selv formår at opbygge, og de essentielle fedtsyrer, som organismen ikke selv kan syntetisere og derfor skal tilføres direkte gennem føden. De essentielle er polyumættede fedtsyrer, som linolsyre og alfa-linolensyre, der især fås fra vegetabiliske fedtstoffer, men også fra fede fisk. Ud fra disse to fedtsyrer kan kroppen danne alle andre nødvendige fedtsyrer, ved biokemiske processer via elongase*(længere kæder af kulstof-atomer) og desaturase*(indsættelse af dobbeltbindinger). F.eks vil linolsyre omdannes i kroppen til semi-essentielle fedtsyrer som gamma-linolensyre (GLA) og arakidonsyre(AA).

Umættede fedtsyrer inddeles i familier afhængig af placeringen af den sidste dobbeltbinding i molekylet. Det er hovedsagelig tre fedtsyrefamilier der har interesse, nemlig omega-3-fedtsyrer, omega-6-fedtsyrer og omega-9-fedtsyrer. Se figur 8.

Omega-3-fedtsyrer (også n-3 og ω -3) er betegnelsen for familien af flerumættede fedtsyrer som har det til fælles, at de har en dobbeltbinding på kulstofatom nummer tre fra kulbrinteenden, den position på kulbrintekæden som kaldes ω -3/n-3 (omega-3). Nogle af de vigtigste omega-3-fedtsyrer, ernæringsmæssigt set, er alfa-linolensyre (ALA), eicosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA).

Alfa-linolensyre findes i blandt andet rapsolie og soyaolie. EPA* og DHA* findes fortrinsvis i fede fisk såsom laks, ørred, makrel og sild samt i torskelevertran.

Hvis den sidste dobbeltbinding i en fedtsyre sidder ved det sjette sidste kulstof-atom i kæden, kalder man fedtsyren for en omega-6-fedtsyre (ω -6-fedtsyre eller n-6-fedtsyre). Omega-6-fedtsyrer af betydning er linolsyre(LA), der findes i f.eks planteolier, og arachidonsyre(AA), som mest findes i kød. Oliesyre er en mono-umættet omega-9-fedtsyre(dobbelbindingen ved niende sidst kulstof) der især findes i olivenolie og rapsolie. [www.netdoktor.dk]



Figur 8. Fedt er opbygget af forskellige fedtsyrer, som findes i forskellige typer af mad [http://www.altomkost.dk],[http://www.netdoktor.dk]

De vigtige omega-fedtsyrer

Både omega-3 fedtsyrer fra fisk og omega-6 fedtsyrer fra planter indgår i komplicerede mekanismer i stofskiftet, hvor fedtsyrerne gennem en række trin omdannes til andre stoffer, som har mange forskellige funktioner i kroppen. De aktive omdannelsesprodukter fra flerumættede fedtsyrer kaldes under et for eikosanoider*(signalmolekyle). Eikosanoider har mangeforskellige funktioner i organismen, bl.a. i reguleringen af betændelsesreaktioner og indgår hovedsagelig ved inflammation eller immunitet, samt som budbringere i centralnervesystemet. Eikosanoider stammer fra enten omega-3 eller -6. Omega-6 eikosanoider er generelt pro-inflammatoriske, hvor omega -3 er i langt mere grad anti-inflammatoriske. Den mængde og balance mellem disse fedtstoffer i en persons kost vil påvirke kroppens eikosanoid-kontrolfunktioner og kan dermed indvirkninger på f.eks hjerte-kar-sygdomme, blodtryk, og arthritis. Anti-inflammatoriske lægemidler såsom aspirin og andre smertestillende midler fører til nedregulering af eikosanoidsynteser(pro-inflammatoriske).

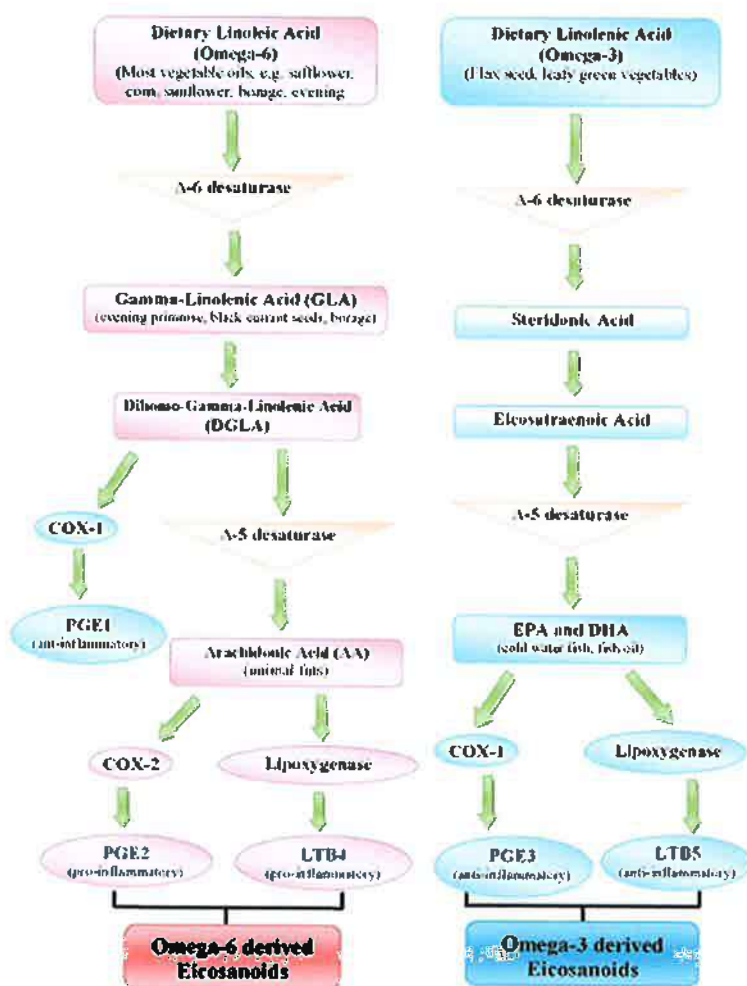
Flere videnskabelige studier peger på at omega-3 fedtsyrer bidrager til at begrænse inflammatoriske symptomer, hvorimod omega-6 fedtsyrer (og mættede fedtsyrer) bl.a. forstærker allergiske reaktioner. En ubalance mellem disse to fedtsyrer kan bidrage til udviklingen af sygdomme i kroppen, hvorimod hvis der er den rette balance mellem dem, kan det hjælpe med at forbedre forholdene og indvirke med en generel forbedring af sundhedstilstanden. Det menes, at de inflammatoriske lidelser der findes blandt den vestlige/amerikanske befolkning fortrinsvis er på grund af denne skæve ratio. Moderne vestlig kost har typisk et forhold af omega-6/omega-3 på 10:1, nogle steder op til 30: 1. Det menes at det optimale forhold bør være 4: 1, eller endnu lavere, ud fra næringsmæssige anbefalinger. Det kan bl.a. lade sig gøre at imødekomme de ernæringsmæssige anbefalinger ved at øge indtagelsen af fødevarer, el/og tilskud af bl.a. fiskeolie, med et højt indhold af omega 3 fedtsyrer. Det er evnen til at forskyde balancen mellem eikosanoider dannet fra henholdsvis omega 3 fedtsyrer og omega 6 fedtsyrer, som er forklaringen på en effekt ved høj indtagelse af bl.a. fiskeolier. De eikosanoider, som dannes fra fiskeolierne fedtsyrer forrykker balancen i blodet, så betændelsesreaktionerne afdæmpes. Fiskeolier nedsætter også blodets indhold af triglycerid, som er en type fedt i blodet, der øger risikoen for hjertesygdom. Derimod har fiskeolier ingen relativ virkning på kolesterolværdien af LDL, det såkaldte dårlige kolesterol, men god effekt på HDL, det gode kolesterol, der er med til at mindske risikoen for hjerte/karsygdomme.[17;p.89] [www.apoteket.dk], [www.altomkost.dk],[www.scumdoctor.com]

Fedtsyresyntese metabolismen

Essentielle fedtsyres biosyntese i organismen sker gennem flere trin af elongase*(indsættelse af en ethylgruppe), suppleret med forskellige desaturaser*(dannelse af dobbeltbindinger ved at enzymet fjerner to hydrogenatomer). Oxidation sker ved beta-oxidation i mitokondrier* og/el peroxisomer * ved dannelse af acetyl-Coa*. Eikosanoider, der er signalmolekyler, stammer enten fra omega-3- eller omega-6-fedtsyrer. De ω -6 eikosanoids fra AA (arachidonsyre) er generelt pro-inflammatoriske, hvor ω -6 eikosanoids fra DGLA(dihomo gamma-linolensyre) og ω -3 eikosanoids fra EPA* og DHA* er anti-inflammatoriske. Eikosanoider dannes ud fra arachidonsyre ved at der indbygges oxygen i fedtsyrekæden. Arachidonsyre frigøres fra phospholipider som phosphatidylinositol og phosphatidylcholin i cellemembranen ved phospholipase A₂. Arachidonsyre danner selve grundlaget for biosyntesen(også kaldet Arachidon-kasaden) af pro-inflammatoriske eicosanoider, hvor DGLA, EPA og DHA konkurrerer om samme reaktionsveje med anti-inflammatoriske eikosanoider. Se figur 9.

Når der indbygges oxygen i fedtsyrekæden til eicosanoider, sker det ved forskellige oxygenaser, som cyclooxygenaser(COX-1 og COX-2), hvor forbindelserne ender som prostaglandiner, prostacyliner og thromboxaner, eller ved lipoxygenaser hvor forbindelserne ender som leukotriener. COX-2 dannes som respons på forskellige inflammatoriske stimuli, og de eicosanoider der dannes er skyld i betændelsestilstande, dem fra COX-1 derimod er inflammatoriske hæmmende.

Leukotriener indgår i organismens immunreaktioner og kan være involveret i sygdomme som bronchitis, astma, kroniske inflammationer, psoriasis, gigt, eksem, overfølsomheder og allergier. Prostaglandiner har et bredt virkningsspektrum. De modulerer, dvs. hæmmer eller fremmer, en lang række hormoner og andre signalstoffers virkninger på næsten alle slags væv. F.eks. fremmer de inflammationsreaktioner (betændelse), hæmmer hormoninduceret fedtforbrænding, påvirker sammentrækning af glat muskulatur og sammenklumpning af blodplader. Tromboxaner er signalstoffer, der bidrager til at forhindre blodtab fra blodkarrene. Når der opstår defekter i karvæggen, frisætter de aktiverede blodplader. Ligeledes virker prostacyliner i et samspil med tromboxaner. [www.biosite.dk],[www.denstoredanske.dk][16;p.106-108,457-459]



Figur 9. Simplificeret skildring af

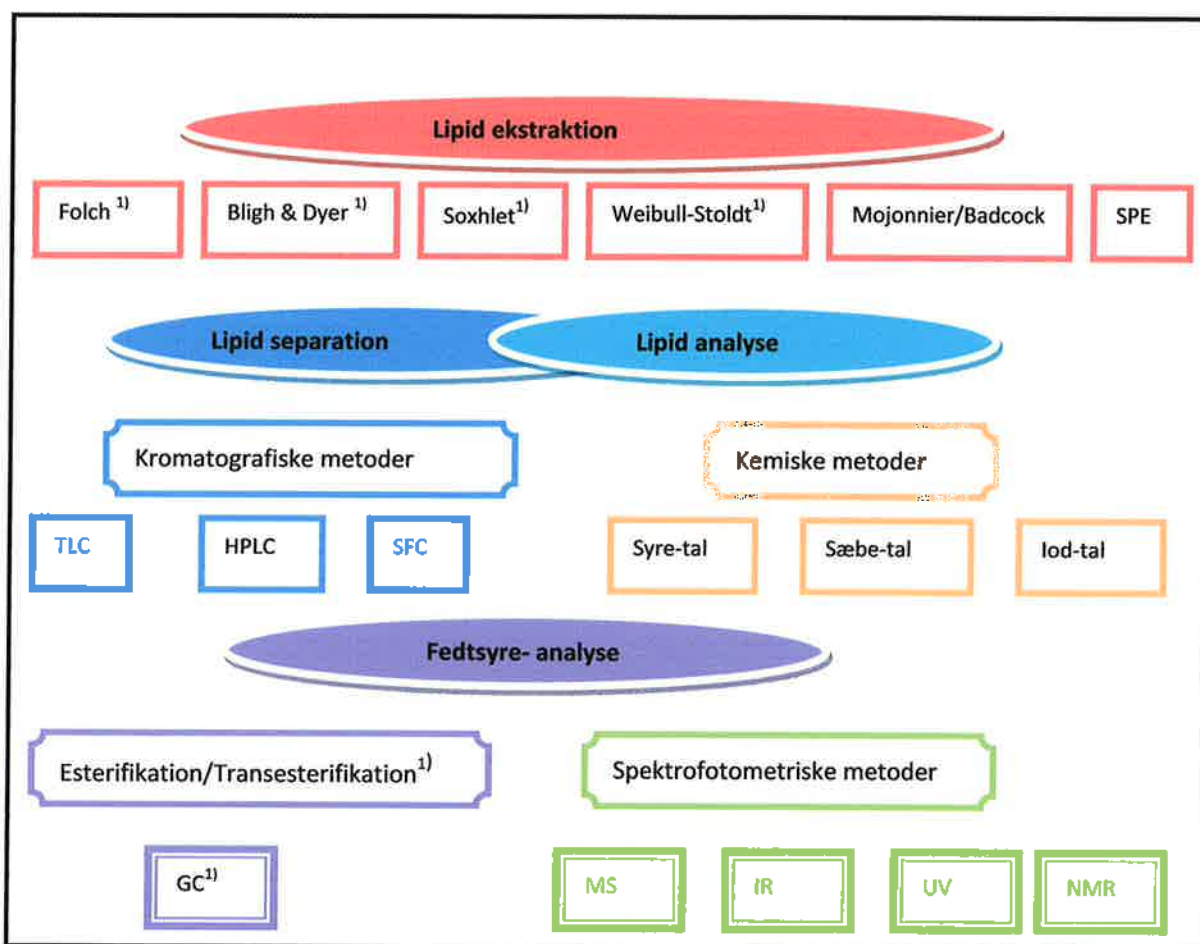
eicosanoider produceret fra omega-3 og -6 fedtsyrer. For at opnå fordelene af anti-inflammatoriske eicosanoider, bør indtag af omega-6 fedtsyre reduceres og omega-3 fedtsyrer øges. Omega-3 og omega-6 konkurrerer i kroppen, og den af højeste koncentration vil frem for den anden fortrinsvis blive metaboliseret. Bemærk i diagrammet ved omega-3 fedtsyrer at hørfrøolie /planteolier indeholdende linolensyre(ALA), skal gå gennem flere enzymatiske trin før det metaboliseres til EPA og DHA, hvor fiskeolie allerede indeholder EPA og DHA i deres aktive form ved indtagelse.[http://beatcoloncancer.com/images/fatty_acid_metabolism.jpg]

Fedtsyrebestemmelse i muslinger og marine olier

Lipider kan overordnet bestemmes kvantitativ ud fra en række forskellige væskeekstraktionsprincipper med anvendelse af organiske opløsningsmidler og efterfølgende gravimetrisk bestemmelse. Men der er også metoder hvor der ikke indgår organiske opløsningsmidler, som f.eks volumetrisk bestemmelse med stærk syrebehandling (Badcock- eller Mojonnier-metoden) eller ved søjletekniker som SFE(Solid-phase extraction).

Kvaliteten af fedtstoffer kan bestemmes ud fra simple kemiske metoder, disse benævnes f.eks. ved syretal*, sæbe-tal* og iodtal*. [8;p.51-57].

Ønskes en mere detaljeret bestemmelse af lipidsammensætningen i prøven kan der anvendes forskellige adskillesteknikker inden for kromatografien, som f. eks SPC*, TLC* og HPLC*. Ved analyse for fedtsyresammensætning kan anvendes direkte metoder som f.eks. UV*, IR* og NMR*, eller derivater kan fremstilles til analyse på HPLC* eller GC*. Se figur 10.



Figur 10. Overstående viser et udvalg af mulige metoder til kvantitativ/kvalitativ bestemmelse af lipider/fedtsyre. 1)Væskeekstraktion, samt esterifikation/transesterifikation med efterfølgende GC-analyse gennemgås i dette afsnit. For yderligere beskrivelse af de her nævnte metoder, henvises til supplerende litteratur. Forkortelser er angivet i ordliste bagerst i rapporten.[10;p.233-259]

I de eftergående afsnit vil der gennemgås prøveforberedelse og metoder der kan være relevante for fedtsyrebestemmelse i muslinger og marine olier. Her er på forhånd valgt at analyser på GC ud fra den devise at det er den mest anvendte og standardiserede metode til fedtsyrebestemmelser. Først omtales en kort beskrivelse af oprensning af lipider, dernæst prøveforberedelse, samt håndtering og opbevaring af lipider med henblik på minimering af oxidation og uønsket hydrolyse. Overordnede væskeekstraktionsprincipper gennemgås og enkelte mulige ekstraktionsmetoder, med vægt på chloroform/methanol-metoderne, samt deres fordele og ulemper. Efterfølgende gennemgås teorien bag prøvebehandling af fedtsyre til derivater før GC-analyse, både mere traditionelle metoder men også alternativ *in situ*- metode jf. relevante videnskabelige artikler. Dernæst ses på GC- analysen med vægt på metode- og kolonnevalg ved FAME-bestemmelse. Afslutningsvis vil der gennemgås og argumenteres for valgte metoder til eksperimentelle laboratorieforsøg ved studier af fedtsyre i muslinger og marine olier inden for projektets afgrænsninger.

Oprensning af lipider

For at kunne analysere på lipider er det nødvendigt først at isolere dem kvantitativt fra non-lipide komponenter. Lipider er organiske stoffer (upolære), hvilket gør det muligt at adskille dem fra mere polære stoffer i prøven, så som proteiner, kulhydrater og vand. Dette kan gøres ved ekstraktion med upolære opløsningsmidler som f.eks. chloroform, ether og benzen.

Lipiderne i organismen findes især som strukturelle bestanddele af membraner og som oplagsnæring og er i kemisk henseende en inhomogen gruppe, der overordnet kan inddeles i følgende grupper. (Se evt. foregående afsnit "Lipider").

Simple lipider: Mættede og umættede frie fedtsyre som evt. kan være forestrede med alkoholer. Gruppen indeholder triglycerider, prostaglandiner (hormoner) og voksarter.

Sammensatte/komplekse lipider: Lipider med fedtsyrer og/el. f.eks. phosphorsyre, nitrogenholdige baser, kulhydrater og/eller proteiner. Gruppen indeholder phosphorlipider, glycolipider og lipolipider.

Steroider: indeholder sjældent fedtsyrer men er uopløselige i vand og har forekomst i fedtvæv, f.eks. kolesterol, galdesyrene, binyrebarkhormoner, sexuelhormoner og D-vitaminer.

Der er en bred vifte af metoder til lipidbestemmelse, alle med formålet at adskille cellulære lipider eller væske lipider fra de øvrige bestanddele som proteiner, polysaccharider, aminosyre, sukker og andre mindre molekyler. Metoden skal udføres på en måde så der videst muligt undgås ændring i lipidsammensætning og struktur set ud fra prøvens biologiske karakter, men også med henblik på følsomheden af de aktuelle lipider. Forsigtighed skal tages med hensyn til at minimere oxidation af lipider, især flerumættede fedtsyre (PUFA), ved at beskytte mod oxidative nedbrydninger fra ilt, enzymer, her i kombination med temperatur og lys. Det kan derfor være nødvendigt at bl.a. deaktivere enzymer der ellers kan medføre til hydrolyse* af lipiderne. [7;p.174],[9;p.433], [www.cyberlipid.org].

Prøveforberedelse

Som det første trin kan det være nødvendigt at ekstrahere lipiderne fra deres matrix og adskille dem fra alle andre non-lipider, før en egentlig analyse kan foregå. Ideelt skal dette foregå ud fra frisk biologisk materiale eller som alternativ opbevaret ved $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gerne i en atmosfære af nitrogen el/og tilsat antioxidant.[14;p.428]

Tørring

Det kan være svært for upolære opløsningsmidler at trænge ind i vandholdige prøve(>8 % vand) uden at det medfører en ringere evne for lipidekstraktionen. Derfor kan det være en fordel at tørre prøven for at nedsætte vandindholdet før ekstraktion.[11;p.136]

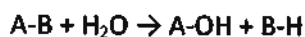
Homogenisering

Effektivitet af lipidekstraktionen afhænger bla. af opløsningsmidlets tilgængelighed i fht. prøvens overfalde/partikelstørrelse. Mindre partikler øger den samlede overflade af prøven og medvirker til en optimering af lipidekstraktion. I nogle tilfælde kan det være en fordel at homogeniserer prøven med selve ekstraktionsvæsken.[11;p.136]

Lipolytisk aktivitet(nedbrydning af fedtstoffer ved enzymatisk hydrolyse) har frie betingelser når cellen ødelægges, og kan medvirke til at give et falsk(og forhøjet) billede af frie fedtsyre og triglycerol koncentrationer. En begrænsning af den lipolytiske* aktivering kan ske ved hurtig indfrysning og pulverisering af prøven vha. tøris(-80°C) og herefter overføres til et organisk opløsningsmiddel (inaktiverer den enzymatiske proces), efterfulgt af homogenisering og ekstraktion ved rumtemperatur. [14;p.429],[A6].

Syre/base hydrolyse

Hydrolyse er en kemisk reaktion eller proces, hvor et molekyle reagerer med vand og bliver opdelt i mindre molekyler.



Ved hydrolyse af fedtstoffer dannes glycerol og frie fedtsyrer eller salte af fedtsyrer.

For at gøre lipider mere tilgængelige ved ekstraktion, kan man behandle prøven først med syre eller base. Syre eller base hydrolyse er nødvendig for at frigøre lipider med kovalente- eller ionbindinger til hhv. proteiner og kulhydrater, men også til at bryde op i emulsioner af fedt. Hydrolyse med syre(3-6M HCl), under reflux betingelser, frigører bundne lipider fra proteiner og kulhydrater. Hvor hydrolyse med base kan være med til at bryde op for emulsioner, neutralisere evt. syrer og opløse proteiner forud for ekstraktionen. Hydrolyse med stærk base(NaOH eller KOH) kaldes en forsæbning eller saponifikation og er oprindeligt den proces hvorved sæbe fremstilles ved en reaktion mellem et fedtstof og en base. Sæbe er derfor natrium- eller kaliumsalte af fedtsyrer.

Enzymer(Clarase; en blandning af α -amylase og protease) kan også anvendes til hydrolyse af prøver med lipider bundet til proteiner og kulhydrater.[11;p.136],[6;p.150].

Harskning og autooxidation

Harskning er nedbrydning af fedtstoffer, olier og andre lipider ved hydrolyse eller oxidation, eller begge dele. Hydrolytisk harskning kan forekomme enten rent kemisk (vand, base), enzymatisk eller ved mikrobiologisk påvirkning. Hydrolysen resulterer i frigørelse af fedtsyre fra triglycerider til frie fedtsyre og glycerol. En hydrolytisk harskning kan påvises ved syretal*.

Disse frie fedtsyrer kan herefter gennemgå yderligere auto-oxidation*. I fedtsyren dannes frie radikaler, når der tilføres energi f.eks. i form af lys eller varme. Den energimængde der kræves for at radikaler dannes er langt mindre i de umættede fedtsyre, og de oxideres derfor langt letter. Den frie fedtsyre radikal reagerer med luftens ilt og danner peroxidradikal som kan reagere med en ny fedtsyre. Således fortsætter reaktionen, der kaldes en auto-oxidation (kædereaktion), fordi der hele tiden dannes en ny radikal ved brug af en gammel. Lipooxygenase* kan ligeledes indgå i oxidation af lipider. Den eneste måde en radikalreaktion kan stoppes er ved en reaktion mellem to radikaler, hvorved der dannes en ikke-radikal forbindelse. Peroxiderne spaltes let til ildelugtende aldehyder, ketoner og carboxylsyre. Disse processer kaldes harskning og kan forhindres, eller i hvert fald mindskes væsentligt, ved at tilsætte antioxidanter som reagerer med de frie radikaler og neutraliserer dem. I olier er der naturligt antioxidanter, som f.eks. E-vitamin (alpha-tocopherol). Der kan også tilsættes syntetiske antioxidanter såsom propylgallat (PG, E310), og butylhydroxytoluen (BHT, E321). [14;p.428],[5;p.40].

Opbevaring

Efter ekstraktion af lipiderne kan disse opbevares til videre analyse, afkølet og mørkt. Ved længere tids opbevaring sker det bedst ved -20°C eller gerne under. Antioxidanter er særlig vigtige som konserveringsmidler, da oxidative reaktioner stadig kan være forholdsvis aktive i frosne/kølede prøver. [5;p.40].

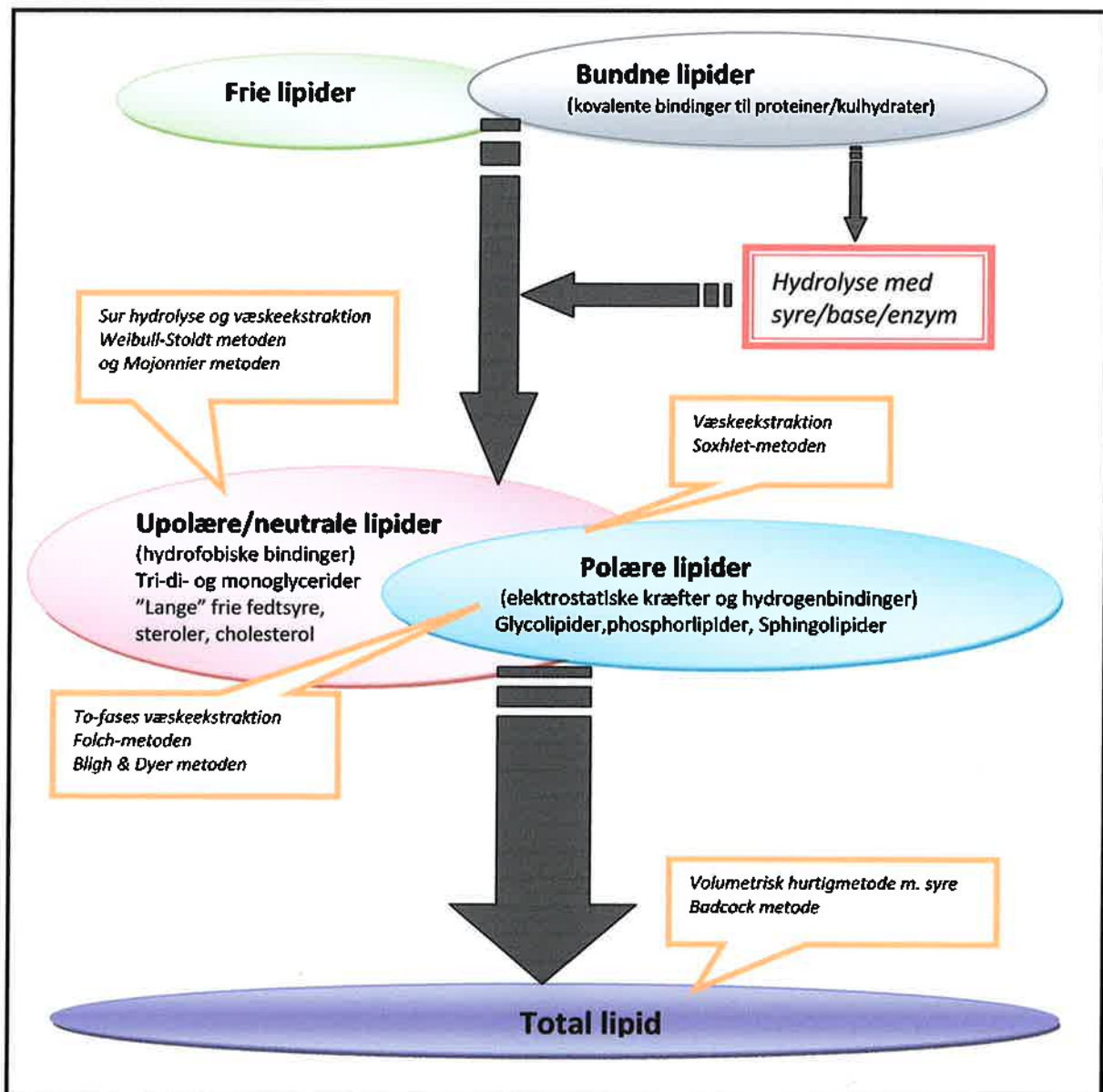
Væskekstraktion

Ved at tilsætte en ikke blandbar ekstraktionsvæske til en prøveopløsning, kan stoffer i prøveopløsningen, som er blandbar med ekstraktionsvæsken, ekstraheres fra prøveopløsningen over i ekstraktionsvæsken. Det kan ske ved teknikker som udrystning i skilletragt, centrifugering og filtrering. Herefter kan ekstraktionsvæsken med de ønskede stoffer adskilles fra prøveopløsningen ved faseadskillelse, hvorefter stofferne isoleres ved afdestillation af selve ekstraktionsvæsken.

I forbindelse med ekstraktion af lipider fra biologisk materiale er det nødvendigt at finde et solvent der både opløser lipiderne hurtig og samtidig "overvinder" interaktionerne mellem lipiderne og prøvens matrix. Et andet, men også vigtigt hensyn at tage, er de valgte solventers toksiske egenskaber og evt. mulighed for substitution med mere miljøvenlige solventer.

Lipider er mangfoldige i både deres strukturer og polaritet og ofte er en enkelt ekstraktion ikke nok til at ekstrahere alle lipiderne. Valget af solventer afhænger af lipid-typer og deres indbyrdes interaktioner der skal nedbrydes. Neutrale lipider, som triglycerider er bundet hydrofobisk og kan ekstraheres med upolære solventer som hexan eller diethyl ether, hvor polære lipider som phosphorlipider er stærkere bundet og kræver mere polære solventer. Lipider kan findes i både fri og bundet form, frie er let ekstraherbare i en svag upolær organisk opløsningsmiddel som f.eks. petroleumsether eller diethylether, hvor bundne kan kræve en forbehandling med eks. en stærk syre før en efterfølgende ekstraktion med mere polære opløsninger som f.eks. alkoholer. Se figur 11.

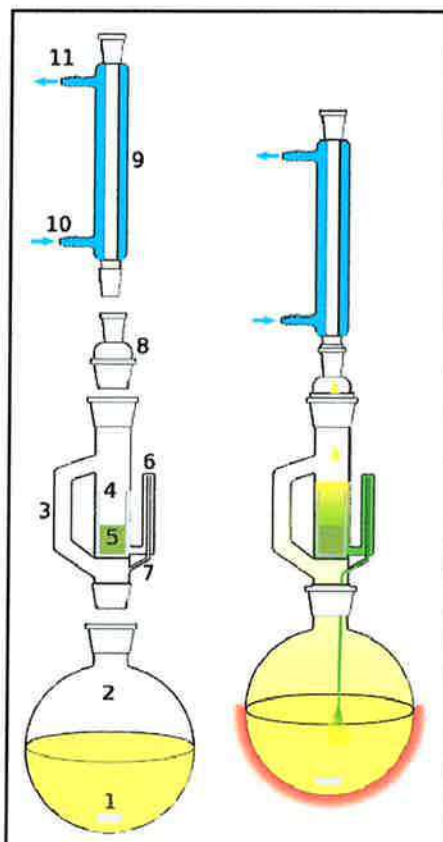
Derfor er en enkelt opløsning ikke altid optimalt for ekstraktion ved bestemmelse for total indhold af lipider i en prøve. Den mest anvendte og afprøvede solventblanding til lipid ekstraktion er, indtil dags dato, chloroform/methanol(2:1) i samspil med vand, der evt. indgår i selve prøven som en tredje komponent. Metoden bruges både til lipidanalyse fra dyr, planter og bakterier. [17.p.102],[15;p.97-100],[A3],[A5].



Figur 11. Normal vil en fedtbestemmelse udgøre de "frie" lipider med ekstraktion vha en svag upolær organisk opløsningsmiddel. Ekstraktion af de "bundne" fedtsyre kræver mere polære opløsninger som f.eks. alkoholer. Under væskeekstraktion vil van der Waals og elektrostatiske kræfter, samt hydrogen bindinger, brydes i forskellige udstrækning i opløsningsmidlet, mens kovalente bindinger vil forblive intakte. Neutrale lipider er hydrofobisk bundet og kan ekstraheres med upolære opløsningsmidler. Hvor polære lipider, som overordnet er bundet af elektrofobiske kræfter og hydrogenbindinger, kræver et polær opløsningsmiddel til at bryde disse bindinger.[11;p 137]

Weibull-Stoldt-metoden er et eks. på bestemmelse af "total mængde fedt" ved ekstraktion af summen for "frit fedt" og "bundet fedt", frigivet ved sur hydrolyse. Ekstraktion foregår i upolær fase, hvorved polære lipider ikke indgår i "total mængde fedt". **Mojonnier-metoden** bygger på samme princip, hvor **Backcock-metoden** er volumetrisk hurtigmetode til bestemmelse af det totale fedtindhold med en stærk syre(syre-fordøjeligheden).[12; AOCA official Methods],[13;p.96].

En **Soxhlet** er et laboratorieudstyr opfundet i 1879 af Franz von Soxhlet. Det benyttes ofte til at ekstrahere fedtstof ud af en fedtholdig prøve ved hjælp af et organisk opløsningsmiddel. Soxhlet ekstraktion af lipider kan let foregå i enten hexan, petroleum-ether(blanding af pentan/hexan m. kogepkt 35-40°C) eller diethylether. Denne metode kan bruges til kvantitativ bestemmelse af prøver med både lavt som højt lipidindhold, men begrænset til oprensning af upolære lipider, da polære lipider opløses ringe i upolære solvent. Prøver med højt vandindhold ($\geq 10\%$) anbefales at tørres før ekstraktion, dette gøres med forsigtighed for at undgå oxidation af lipider ved for høje temperaturer. Soxhlet ekstraktion af prøver kan nemt udføres uden anvendelse af upolære solventer som chloroform(eller andre toksiske solventer), men til gengæld anses metoden for ikke at give et resultat svarende til det totale lipidindhold, men mere som indholdet af "ekstraherbare lipider" (≈frie lipider). [A3]. Bagsiden ved soxhlet metoden er generelt tidsforbruget, men også dens manglende evne til at oprense polære samt bundne lipider. Desuden kan udbyttet afhænge af både anvendte solventer, ekstraktionstider og antal cykler, hvilket betyder at resultatet kan variere med hensyn til flere operationelle faktorer. Se figur 12. [9;p.425],[A3].

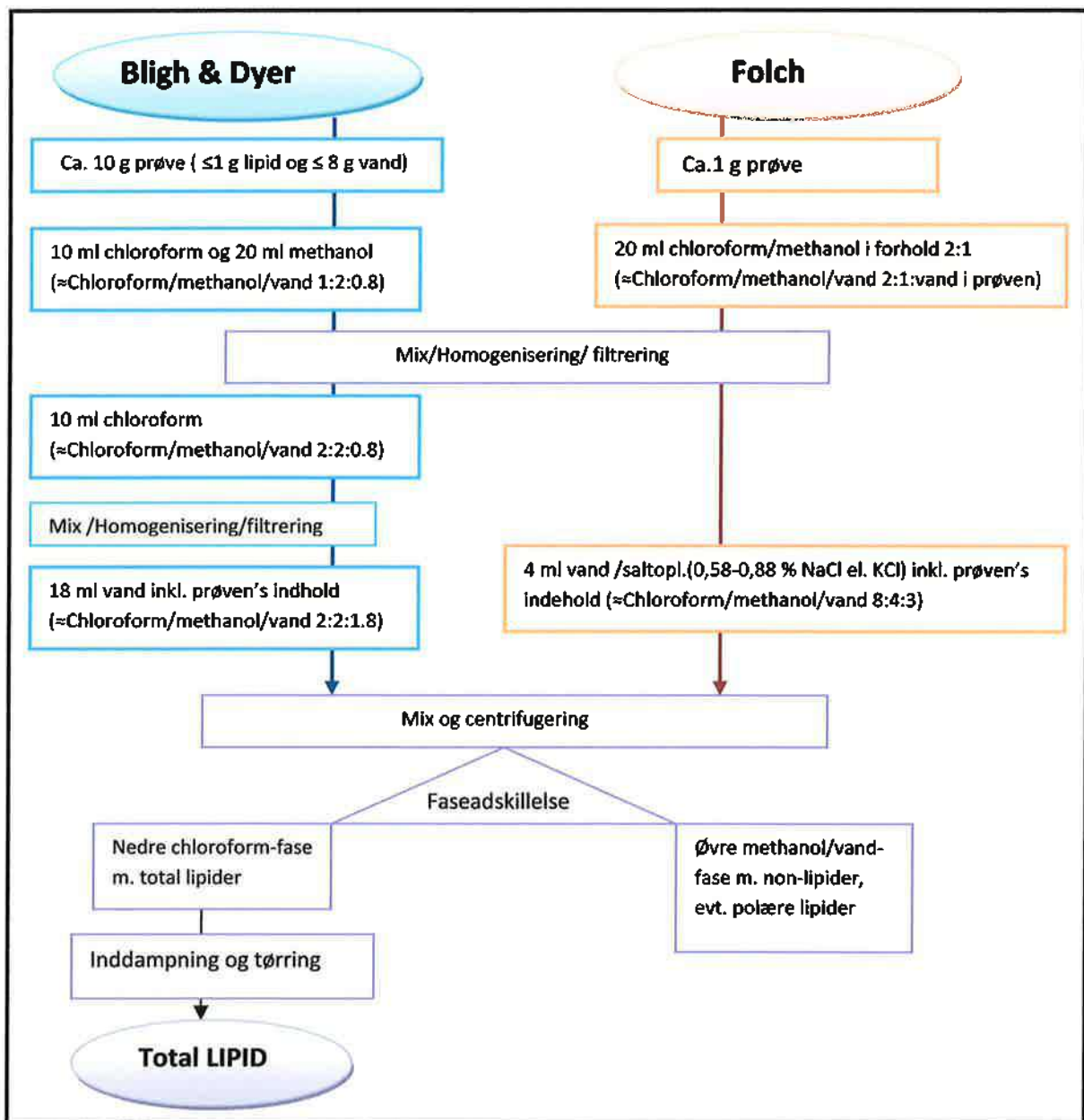


Figur 12. Soxhlet; Tv opbygning, th i funktion; Ved opvarmning på rundbundet kolbe(2), bringes det organiske opløsningsmiddel(1) i kog og dampen stiger op til svalerøret(9). Da svalerøret er afkølet(9), vil dampen kondenseres, og opløsningsmiddel vil dryppe ned på ekstraktionshætten(4)indeholdende prøven. Når væsken her er i niveau med toppen af det smalle stigrør(6)vil væsken i ekstraktionskammeret(5)"vende" tilbage i kolben via overløbsrøret(7). Processen gentager sig selv, så længe der er varme på kolben og tilstrækkeligt ekstraktionsvæske. Fedtstoffet kan herefter isoleres ved afdestillering af opløsningsmidlet, og ikke-fedtopløselige dele af prøve forbliver i ekstraktionshætten. [http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor]

Selvom chloroform/methanol baseret ekstraktioner udgør større miljø- og sundhedsmæssig fare er de stadig de mest anvendte og foretrukne metoder til oprensning og bestemmelse af lipider. De mest kendte har været "Folch"- og "Bligh & Dyer"- metoderne, både i deres klassiske udformning, men også i flere modificerede former. De er grundlæggende hurtige og simple ekstraktionsmetoder til oprensning af lipider fra biologiske materialer. Lipider oprenses fra prøven ved en tre- komponent ekstraktion med methanol/chloroform, samt chloroform og vand. Ved selve fase-separationen vil lipider befinde sig i den upolære chloroformfase. For at øge udbyttet af lipider, kan vand erstattes med en saltopløsning. Både for "Folch" og "Bligh & Dyer" kan mere krævende prøver ekstraheres over flere gange; efter homogenisering med chloroform/methanol, filtreres restproduktet fra og processen gentages, bagefter adderes filtraterne til det videre forløb. I materialer hvor der er stærke interaktioner mellem lipider og matrix'en, er det en fordel at forbehandle prøven med base eller syre. Se figur 13.

I "Bligh & Dyer" bruges forholdet 1:4 mellem prøve og en opløsning af chloroform/methanol/vand i forhold 1:2:0.8 og 2:2:1.8, svarende til før og efter fortynding. For "Bligh & Dyer" metoden er det nødvendigt at kende vandindholdet i prøven. "Bligh & Dyer"-metoden er en videreudvikling af "Folch"-metoden til prøver der indeholder større mængder vand og anses for at være en hurtig og effektiv metode til bestemmelse af total lipidindhold i fisk og andre marine dyr. I prøver med indhold <2% lipid er der umiddelbart ingen forskel i resultater mellem de to metoder, hvorimod for prøver med indhold >2 %lipid fås lavere resultater ved "Bligh & Dyer" end ved "Folch" metoden. Ekstraherbarheden falder dog ved prøver med højt vandindhold og evt. frysetørring før ekstraktion kan anbefales. "Folch" metoden har et forhold på 1:20 mellem prøve og opløsning af chloroform/methanol/vand (8:4:3). Her er det vigtigt at forholdet er 8:4:3 mellem chloroform/methanol/vand til at opnå ønsket adskillelse af chloroform/methanol/vand i forholdet 3:48:47 for øverste fase og 86:14:1 for nederst fase. [A1],[A2], [A3],[A4], [10;p.235-236],[15;p.100-101],[17;p.103].

Anvendelse af chloroform er ikke ideelt, men metoderne er generelt anvendt, især for kød og fisk, selv om andre og mindre toksiske solventsammensætninger er afprøvet, såsom hexan/isopropanol eller cyclohexan/ethanol, med næsten tilsvarende resultater. Brugen af dichlormethan i stedet for chloroform er blevet evalueret i udvinding af lipider fra prøver af forskellig art. Resultaterne viser, at dichlormethan /methanol kan erstatte chloroform /methanol, og dermed undgå de store sundhed- og sikkerhedsmæssige problemer forbundet med brugen af chloroform. Der er en række af mere moderne metoder for ekstraktion af lipider, og selv om de giver visse fordele frem for den mere traditionelle metode, er de dog ikke blevet testet over for så vidt en række af forskellige prøver. [A3], [A9].



Figur 13. Folch-metoder er generelt anvendelig til de fleste lipider og er i sammenligning med andre solventblandinger det mest effektive ekstraktionsmiddel. Bligh & Dyer er udviklet til prøver der indeholder større mængder vand.

"Folch": Lipider ekstraheret ved at homogenisere prøven i 2:1 chloroform-methanol, hvorefter homogenisatet filtreres fra. Filtrat tilsættes kun vand (indeholdende et salt øges dets polaritet).

"Bligh & Dyer": En "våd" prøve homogeniseret i en blanding af chloroform/methanol så der dannes et blandbar forhold med vandet i prøven. Ved yderligere tilsætning af chloroform dannes to-fase system.

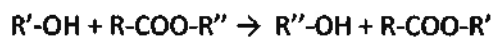
For begge metoder: To-fase system bestående af chloroformfase indeholdende lipiderne og en methanol/vand fase indeholdende non-lipiderne. Lipiderne isoleres herefter ved adskillelse af chloroformfase (nederste lag) fra methanol/vandfase (øverste lag) og efterfølgende inddampning. [A4] [A2] [17; p.103].

FAME

Analyse for kvalitativ/kvantitativ bestemmelse af fedtsyresammensætning i kompleks blanding af lipider som triglycerider, phosphorlipider, sphingolipider og steroler er den mest anvendte metode Gas Chromatografi(GC). Traditionelt bliver sammensætning af fedtsyre(FA) i prøver bestemt ud fra deres analoge FAME*(fedtsyremethylester) fremstillet ved methylering* af lipider vha. en sur- el. basisk- katalyseret reaktion. Generelt er de fleste FA* kovalent bundet til enten en alkohol(glycerol) via en ester binding(triglycerid, phosphorlipids og sterol ester) eller lange C- kæder som sphingosin via amid binding. For at analysere fedtsyresammensætning i en lipid-prøve må denne forbehandles så de enkelte fedtsyrer er tilgængelig for chromatografisk analyse. Methylestere bruges næsten universelt for gaschromatografiske analyser af fedtsyrer. Ester derivater (methylester) er upolære molekyler der har lavere flygtighed(kogepunkt) end fedtsyrer hvilket gør dem velegnet til kromatografiske adskillestetnikker, samt de er enkle at frembringe rent kemisk. For at frigøre bundne fedtsyrekomponenter kan det være nødvendigt først at behandle dem med sur eller basisk hydrolyse for derefter at konvertere dem til derivater, såsom methyl estere, egnet for GC-analyse.

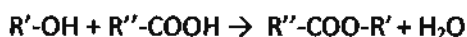
Der er overordnet to måder at omdanne fedtsyrer til deres tilsvarende methylester, FAME*, enten ved transesterificering og/eller esterificering via en katalyseret reaktion(syre, base eller enzymer) i methanol under opvarmning. For lipider der ikke er opløselige i methanol kan det evt. være nødvendigt at yderligere tilsætte en upolær solvent (eks. toluen, dichloromethan). Se figur 14, 15a og 15b.

Transesterificering er en udveksling mellem alkoxy*gruppen af en ester med en anden alkohol. Reaktionen er ofte katalyseret ved tilsætning af syre eller base, hvor syren katalyserer reaktionen ved at donere en proton til carbonylgruppen, og dermed gøre den mere reaktivt. Baser katalyserer reaktionen ved at fjerne en proton fra alkoholen, og dermed gøre den mere reaktivt.



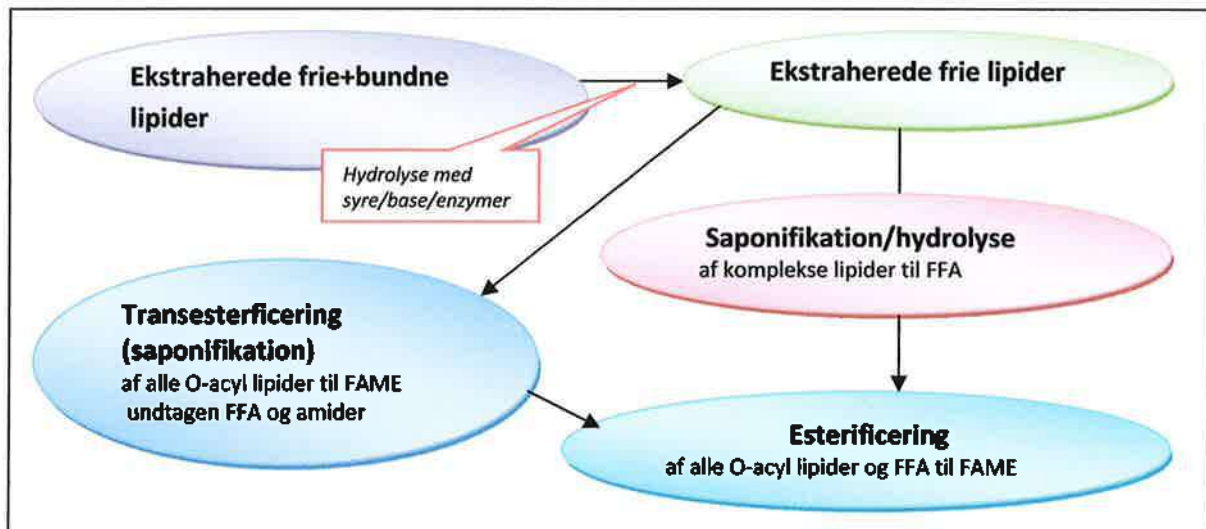
Esterificering er dannelse af en ester eller en esterbinding, ved kondensationsreaktion mellem en alkoholgruppe (-OH) og en syregruppe (-COOH) under fraspaltning af vand.

Reaktionen katalyseres af stærk syre ved at den reagerer med det vand som dannes, og ligevægten forskydes mod højre til øget esterdannelse. Esterificering katalyseres derfor ikke af baser.



Saponifikation/hydrolyse sker ved reaktion mellem et fedtstof og en base ved at bryde bindinger mellem fedtsyren og glyceroldelen. Ved en saponifikation med stærk natrium- eller kaliumhydroxid sker en forsæbning af fedtstofferne til frie natrium- eller kaliumsalte af fedtsyrer. Disse kan også dannes ud fra hydrolyse under anvendelse af f.eks methanolic base (basisk katalyseret transesterifikation) i samspil med vand. Dannelse af de frie natrium- eller kaliumsalte af fedtsyrer og andre frie fedtsyrer kan ikke esterificeres ved basisk katalyserede betingelser, kun ved sure.

Tilstedeværelsen af vand i prøven kan interferere med både transesterificering og esterificering ved at føre til hydrolytiske reaktioner, men hvor den for esterificering er reversibel(Figur 15 b,(5)) er den for transesterificering irreversibel(Figur 15a,(2b)). [10;p.241],[18;p.12-15], [A10],[www.lipidlibrary.co.uk]



Figur 14. I materialer hvor der er stærke interaktioner mellem lipider og matrix'en, er det en fordel at forbehandle prøve med syre/ base el. evt. enzymer. Saponifikation sker ved basisk behandling. Syre-reagenter katalyserer esterifikation/transesterifikation, hvor base-reagenter katalysere transesterifikation hvor der evt. indgår frigørelse af FFA* til en efterfølgende esterificering med syre-reagent. [A12]

Basisk katalyseret transesterificering

O-acyl *lipider som triglycerider/phosphoglycerider transesterificeres meget hurtigt i tilstedeværelse af en basisk katalysator i vandfrit methanol. Frie fedtsyrer (og amider) bliver normalt ikke esterificerede. Man skal derfor være opmærksom på udelukkelse af vand ved reaktionen hvis der ønskes at forhindre dannelse af fedtsyrer som følge af hydrolyse(irreversible reaktion). Se figur 15a(2b). Hvis indholdet af frie fedtsyre(FFA) er tilstrækkeligt højt kan disse interferere ved at reagere/destruere katalysatoren. Det kan derfor være vigtigt i visse tilfælde at udføre transesterifikation under omstændigheder hvor hydrolyse ikke kan forekomme.

Natrium methoxide i vandfri methanol (tilberedt ved at opløse ren natrium i tørret methanol), er den mest populære reagens, men kalium eller tetramethylguanidine(TMG) er også almindelig anvendt. [10;p.240],[9;p.438-442], [www.lipidlibrary.co.uk]

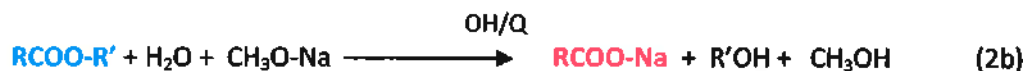
Syre katalyseret esterificering/transesterifikation

Frie fedtsyrer bliver esterificeret og O-acyl lipider transesterificeret ved at opvarme dem i stort overskud af vandfrit methanol under tilstedeværelse af en sur katalysator. Hvis for meget vand er til stede, kan det forhindre at reaktionen kommer til afslutning, fjernes vandet vil det derimod få reaktionen til at forløbe yderligere mod højre(se Figur15b(5)). Den mest almindelige og mildeste reagens er vandfri chlorbrinte i methanol, men en opløsning af koncentreret svovlsyre i methanol er ligeså anvendelig. Boron trifluride-methanol er også meget anvendt som en effektiv reagent, men beskyldes ofte for at være ustabil med uheldig dannelse af biprodukter og tab af PUFA*(polyumættede fedtsyrer). Trods dette er BF₃-methanol reagens tit anvendt i forbindelse med en forudgående anbefalet basebehandling af lipider,(saponifikation, se Figur15a(1)), til dannelse af FFA* som efterfølgende esterificeres. Men effekten af hydrolyse ved basisk katalyseret transesterifikation kan også indføres som en fordelagtig kombination af både transesterificering og saponifikation efterfuldt af sur katalyseret esterificering. Til trods for det ikke er absolut nødvendigt at hydrolysere lipider til FFA før transesterificering/esterificering med sur katalyseret reagent, anses kombinationsesterificering alligevel for at være en hurtigere og mere effektiv metode. [15; p.207], [A11], [A12].

Saponifikation i ren base



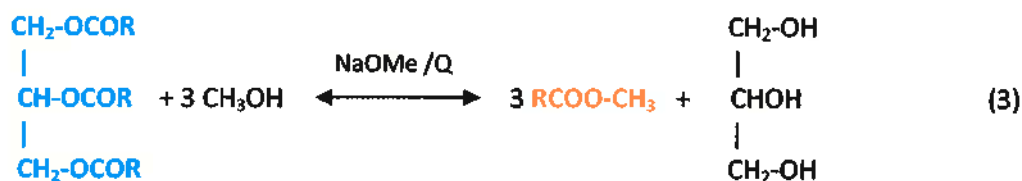
Hydrolyse i Methanolic-base



Transesterifikation



Eller

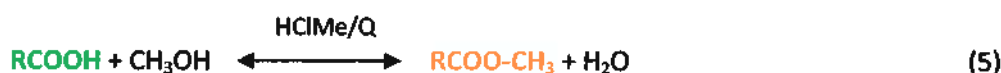


Figur 15a. Saponifikation og basisk katalyserede transesterifikation og hydrolyse med Methanolic Base (NaOH-methanol). Her er ingen esterifikation af frie fedtsyre og deres salte. [A12]

Esterifikation



Esterifikation (Hydrolyse)



Transesterifikation



Figur 15b. Sur katalyserede transesterifikation af O-acyl lipider og esterifikation af frie fedtsyrer og deres salte. [15;p.207]

One-Step-Methylering

Som et alternativ til ekstraktion, m/u hydrolysering, af den total mængde lipid før dannelse til FAME*, er der udviklet en hurtig one-step *in situ* ekstraktion/methylerings* metode. OSM(One-Step-Methylering) er en samtidig ekstraktion og derivatisering hvor FAME's dannes direkte, uden forudgående lipid ekstraktion. Se figur 16. Succesen af denne metode afhænger af både den valgte solvent(polaritet) i samspil med methanol og prøvens indhold af vand, samt den anvendte katalysator. Ved OSM kan der spares på både tid, arbejdsprocedure, anvendelse af udstyr, mængde af solventer og prøvemængde, samt anvendelse af toksiske solventer. Der anbefales samme tid og temperatur til OSM som ved almindelige FAME procedure for opnåelse af komplet derivatisering. Prøver indeholdende små mængder vand kan anvendes ellers anbefales at vandet fjernes først, helst ved frysetørring, da almindelig tørring af prøver kan give ændringer i UFA*(umættede fedtsyre). Metoden har demonstreret sammenlignelige resultater med konventionelle metoder som ekstraktion med chloroform/methanol, samt Soxhlet ekstraktion med forudbehandling af sur hydrolyse. De mest populære metoder til (marine) lipid ekstraktioner er metoderne "Folch" eller "Bligh & Dyer", men disse er ofte tidskrævende. Desuden anvendes større mængder af solventer(toksiske) over flere trin, givende at hvert trin øger risiko for fejlagtige resultater, kontaminering, samt tab af udbytte. OSM er et af de tiltag der er lavet for at finde en procedure mht. både hurtigheden og reduktion i anvendelse af organiske opløsningsmidler. Ved anvendelse af en IS*(internstandard) kan FA* bestemmes efterfølgende, kvantitativt som kvalitativt, direkte ved GC-analyse.

Den optimale procedure for FAME fremstilling afhænger af prøvetype og sammensætning. OSM metoden er udviklet og modificeret alt efter præferencer af katalysator og solventer i hht. prøven og dens FA indhold. Dette gælder bla. valg af katalysator(NaOH og/eller BF₃, HCl), ekstra solvent (hexan, toluen, benzen og visse tilfælde chloroform), temperatur(70-110°C) og tid (45-120 min). Af internstandard kan f. eks nævnes C23:0, C21:0, C:19:0 og C13:0, både som TAG*(triglycerid), FA og FAME. Forberedelse af prøve kan være homogenisering, tørring eller frysetørring, samt pulverisering.[17;p.109],[A7],[A13],[A14]. OSM er bevist som fordelagtig metode til bestemmelse af FA i marine produkter, både mht. præcision og nøjagtighed, men også hurtig og enkel i udførelse.[A8]

Two-Step-Methylering

Methylering ved basisk katalyse har fordele som hurtig reaktionshastighed ved lave temperaturer, mens dens ulemper er manglende evne til esterificering af FFA* samt i visse tilfælde dens følsomhed(hydrolysering) over for vand. Dog er den base-katalyseret reaktionshastighed for transesterifikation op til 1500 gange hurtigere end selve den basiske hydrolyse, hvilke næste eliminerer vands interfererende egenskaber. Se Figur 15a (2b),(3). Med hensyn til temperaturen kan for høj over længere tid føre til degraderinger af FA, hvor mildere betingelser kan indebære ringe eller ufuldkommen omdannelse til FAME.

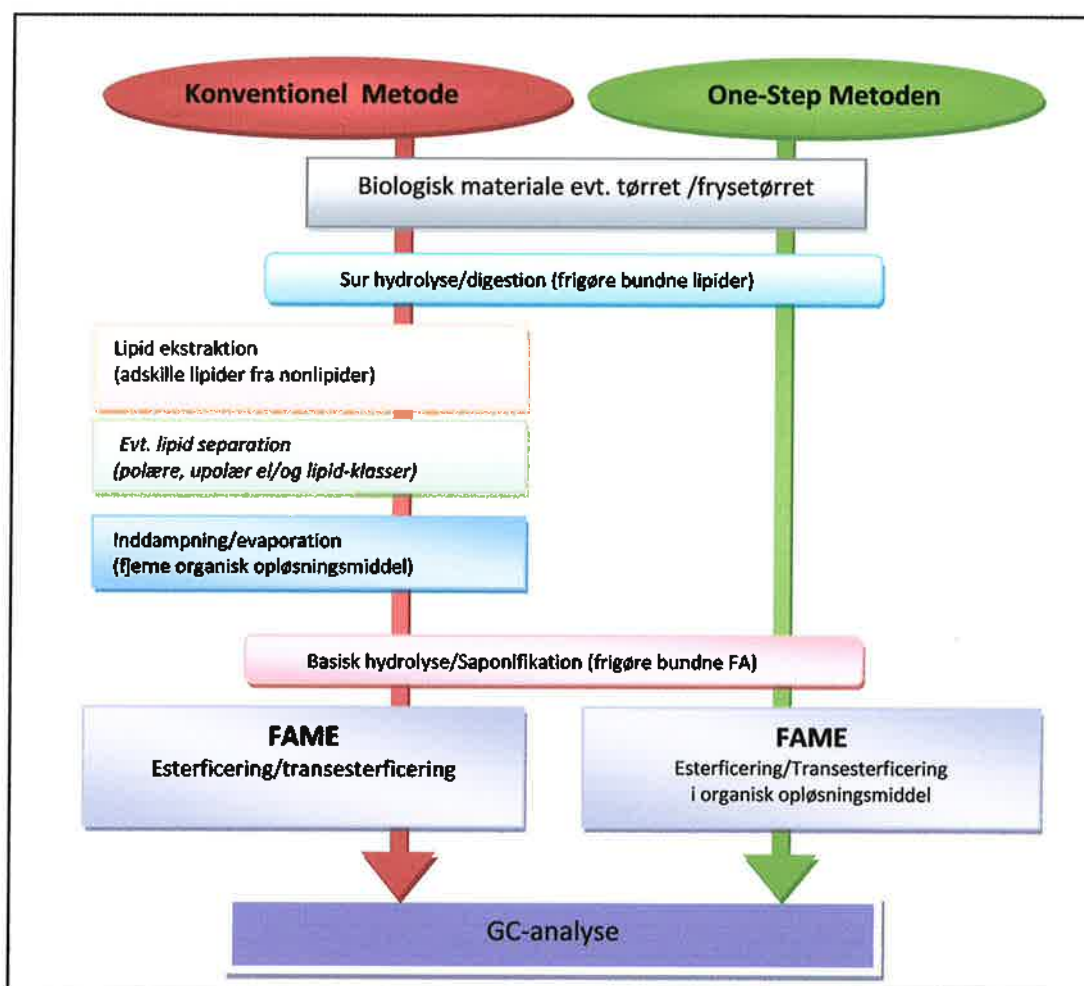
Som nævnt før har sur katalyse visse signifikante fordele frem for basisk katalyse (esterificering af FFA, ringe interferens af vand), men evnen til transesterificering er ikke så høj/hurtig som ved basisk katalyse. Ønskes nedsættelse af den noget længere reaktionstid som er påkrævet ved sur katalyse, kan det være en fordel i første omgang at anvende en basisk katalyse. Ved basisk reagenter, eks. NaOH-Methanol, vil der ske basisk hydrolyse(langsom reaktion) af FA fra TAG* samtidig med transesterificeret(hurtig reaktion) af TAG(O-acyl lipider). Se figur 14 og 15a. Herefter vil en

efterfølgende sur katalyse primær esterificere(hurtig/medium reaktion) FFA og uden at der skal tages forbehold i den begrænset(≈manglende) transesterificering(langsom reaktion). Se tabel 2.

Methylerings betingelser	Sur-katalyse	Basisk-katalyse
Temperatur	Høj	RT
Tid	Minutter til timer	Sekunder til minutter
Esterificerings-egne	Medium-høj	Ingen
Transesterificerings-egne	Lav	Høj
Saponifikation	Lav	Høj
Interferens af vand	Lav	Høj

Tabel 2. Angiver fordele og ulemper ved anvendelse af hhv sur- el basisk-katalyse[A13]

Hermed kan den totale reaktionstid nedsætte ved anvendelse af en slags two-steps- frem for one-step-metoden. HCl-methanolic er ifølge litteraturen den mest anvendte esterificerings-reagent og anvendes især ved OSM, måske ud fra dens foretrukne stabilitet. Dog skal der tages hensyn til dens begrænsede holdbarhed lige som ved andre sure-reagenter. [A13] [www.cyberlipid.org].



Figur 16. Konventionel metode kan inkl. flere steps som; tørring, sur hydrolyse, solvent ekstraktion, oprensning/inddampning, basisk hydrolyse, transesterificering/esterificering samt evt. efterfølgende prøveforberedelse. Ved OSM tilsættes prøve(gerne tør el < 5% vand) et organisk opløsningsmiddel samt en methanolic-katalyse(basisk/sur) og varmes ved anbefalet temp/tid. Ved kvantitativ bestemmelse tilsættes en internstandard.[A12]

GC-analyse af FAME

Selvom der er rapporteret om direkte GC-analyse af FA*, er det absolut mest optimalt at anvende ester derivater af FA, specielt methyl esters. Ester derivater har lavere kogepunkt end deres korresponderende FA og derfor bedre egnet i gasform til GC-analyse. Ester er også mindre polære og har ikke tendens til at absorbere på kolonnematerialet eller dimerisere* der bla. kan medføre tailing eller leading (toppen der enten er bredere på bag- eller forkanten) For yderligere information om GC teori og principper, se Appendix A med henvisninger til Apparatteknik [3] og Analyseteknik [2].

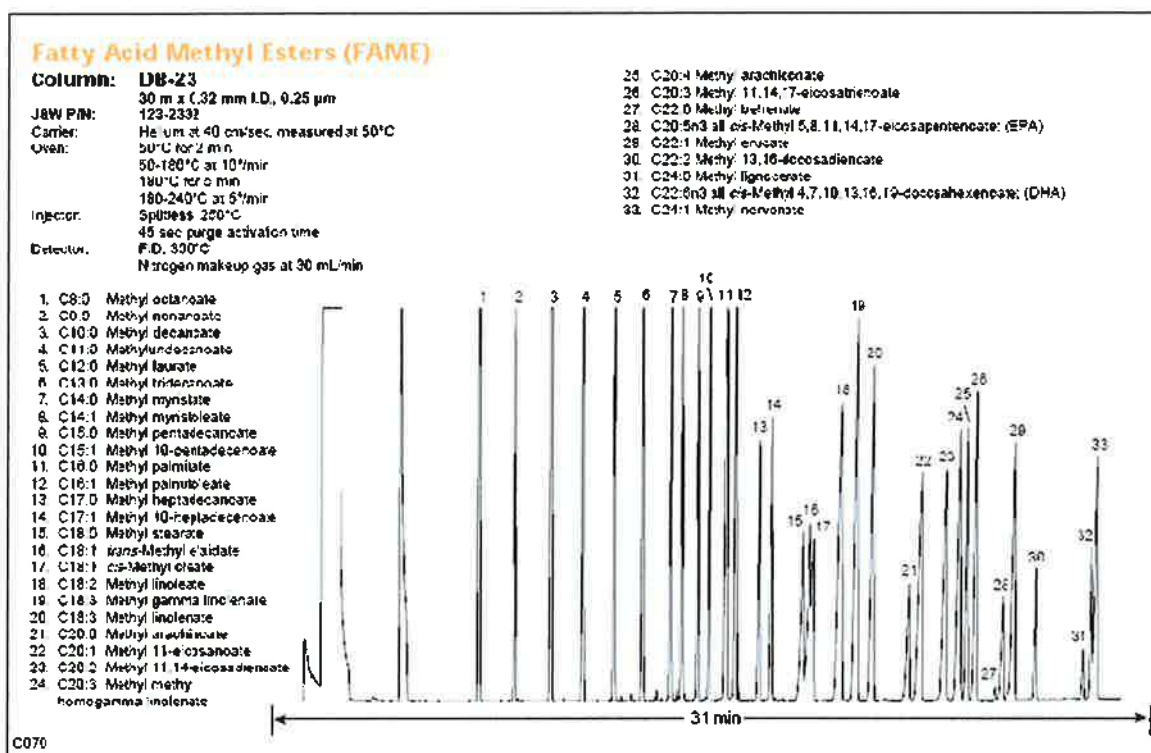
For at en given prøve skal være kompatibel til GC-analyse skal den være flygtig ved temperaturer under 350-400 °C, men samtidig også kunne tåle relative høje temperatur uden at den degraderer og/eller reagerer med andre tilstedeværende komponenter i GC systemet. GC systemets evne til separation af givne komponenter skal ses i sammenhæng med parameter som kolonnelængde, indre diameter, kolonnemateriale, temperatur, flow o. lign.

Kolonnen er den mest kritiske del af GC systemet og valget af kolonnen skal afpasses arten af prøver der ønskes analyseret. Der er overordnet to typer af kolonner, pakkede og kapillær kolonner. Pakkede kolonner vælges sjældent grundet deres lave resolution/opløsning samt krav om større mængde prøve. Der anvendes primært i dag kapillær kolonner coatede med forskellig grader af polære materialer brugbar til FAME-analyse. Selve kolonnens performans afhænger af flere parameter som f. eks coatingmateriale, længde, diameter samt filmtykkelse af coatingmaterialet. Polariteten af den stationære fase, og valget af denne, har indflydelse på retentionstider af de pågældende komponenter, især PUFA*, i prøven der skal analyseres. Generelt er resolutionen for FAME, specielt umættede fedtsyre(UFA), højest i meget polære kolonner, der til gengæld har kortere levetid end kolonner af mere non-polære slags. Blandt kolonner til FAME analyse er de fleste polære faser fremstillet af biscyanopropyl/dimethylsiloxane eller polyethylene glycol(PEG) med vægt på deres stabilitet og præcision hvor med alle komponenterne elueres. Se tabel 3 og figur 17.

Marine olier indeholder en bred vifte af FA (op til 50-60), men kun ca. 14 er interessante i forhold til deres mængde. Primært indeholder de PUFA med kædelængde af 20, 22 eller flere karbonatomer, indeholdende op til seks dobbeltbindinger. FAME elueres efter kædelængde og deres indhold af dobbeltbindinger, hvor kortere kæde elueres først, vil et øget antal af dobbeltbindinger medføre længere elueringstid. Alle FAME af en given kædelængde elueres før en tilsvarende med 2 karbon længere kæde, den eneste undtagelse er C22:6 ω 3(DHA*) der til tider kan elueres mellem C24:0 og C24:1 ω 9. Isomere med dobbeltbindinger nærmest ester gruppe elueres først, f. eks vil C20:4 ω 6 elueres før C20:4 ω 3.[17p.110]. Dobbeltbundet positionelle isomere(cis og trans) vil normal separeres lige efter hinanden. Ændringer i polaritet af kolonnematerialet har ikke betydning for hvor med rækkefølge af komponenter med samme kædelængde med forskellig konfiguration(eks. antal dobbeltbindinger) elueres, men kan have effekt på rækkefølge af eluering i forhold til andre kædelængder. Ved at bruge egnede standarder(referencer) kan identifikation af peaks(toppe) verificeres ved at sammenligne retentionstider af kendte komponenter i standarden i forhold til ukendte i prøven. [9;p.446],[10;p.240],[15;p.228][19;p.126].

Firma	Agilent Technologies	Sigma-Aldrich		
Kolonne navn	DB-23	OMEGAWAX	SP-2560	SP-2380
Matrix	50%-Cyanopropyl-methylpolysiloxane	Polyethylene glycol(PEG)	bis-cyanopropyl polysiloxane	90% biscyanopropyl/10% cyanopropylphenyl siloxane
Polaritet	Høj	Moderat til høj	høj	høj
Anbefaling fra producenten	FAME, samt cis og trans- isomere	Høj reproducerbarhed FAME, omega 3 og 6	Specielt cis/trans isomers og FAME	Specifik designet til FAME
Reference kromatogram	FAME ¹⁾	PUFA No.1 ²⁾ PUFA No.3 ²⁾	Menhaden fish oil ²⁾ Olive oil ²⁾	37 Component FAME Mix ²⁾

Tabel 3. Sammenligning af udvalgte kolonner anbefalet til GC-analyse af FAME. DB-23 er anvendt til analyse af indeværende prøver for marine olier og muslinger. Information er hentet fra www.chem.agilent.com og www.sigmaaldrich.com 1) Se figur 17 og figur 18a i efterfølgende afsnit. 2) Se Bilag III.



Figur 17. Kromatogram ved kolonne DB-23 af FAME fås tydelige separation for kædelængde C8:0 og op efter, samt PUFA med forskellige kædelængder og antal dobbeltbindinger giver tilfredsstillende resolution. [www.chem.agilent.com]

Ud fra GC-analyse kan hver enkel FAME udtrykkes som en procentdel af det totale FAME. Arealet under GC toppen tilsvare mængden af den pågældende FAME, derfor kan arealet af hver top (som procenten af det totale areal af alle toppe af FAME) tilsvare w/w % af hver FAME. Men, at bruge den tilnærmelse, vil medføre overestimering ved længere kædelængde og underestimering ved kortere kædelængder. Areal % værdierne kan multipliceres med en teoretiske korrektionsfaktor (TRF) og værdier korrigeres svarende til sande procentværdier. Korrektioner er af mindre betydning for kædelængder mellem C14-24, men vil være mere toneangivende for kortere kædelængder og endda have signifikant indflydelse på resultater for kædelængder C4-C8.

For at bestemme koncentrationen af fedtsyrer opgivet i mg/g kan en kendt mængde af en internstandard tilsættes til en kendt mængde prøve/lipider. Internstandard kan tilsættes enten som fedtsyre eller FAME alt efter valgt procedure. Den valgte internstandard skal være en FA/FAME som ikke forefindes(eller i ganske ringe mængde) i prøven, samt den skal tilsættes i en mængde der repræsenterer en gennemsnitlig top i GC- kromatogrammet. For det meste vælges en internstandard med et ulige antal kulstofatomer(de fleste naturligt forekommende fedtsyrer har et lige antal kulstofatomer), samt med en kædelængde der ligger i området af prøvens fedtsyrer og deres repræsentative kædelængder. Eks kan en internstandard som C11:0 vælges til prøver med kortere kædelængder(C4-C18), hvor C17:0 og opefter bedre passer til bestemmelse af PUFA som EPA og DHA. Selv om toppe for C19:0 eller C21:0 til tider ligger i området af kromatogrammet hvor mængden af de fleste toppe for marine prøver er repræsenteret, vil de om end under optimale kørsel give præcise resultater. Hvis der er tvivl vedrørende om den valgte internstandard allerede indgår i prøven, kan der vælges at analysere på prøven med og uden tilsætning af internstandard. Internstandard kan bl.a indikere/korrigere for tab af lipider/fedtsyrer gennem de forudgående procedurestep før GC-analyse, men angiver ikke hvilke lipider/fedtsyrer. Ved ineffektive frigørelse (saponation/transesterification) af mere eller mindre bundne fedtsyrer i prøven's matrix vil en Internstandard ikke i sig selv indikere udslag i mængde, da denne fra start figurere som FFA*. Når en basisk katalyseret reagent anvendes kan der ikke anvendes FFA som internstandard, en triglyceride må anvendes i stedet. Uanset hvilken internstandard der bruges skal denne tilsættes fra starten, hvor ved den gennemgår alle præparationssteppene før GC-analysen. [17;p.111-114], [A12].

Mængde af FAME i en prøve kan beregnes ud fra nedenstående formel.

$$FAME(mg/g) = \frac{Ax \cdot Wis \cdot CFx}{Ais \cdot Ws} \cdot 1000$$

Ax : Areal af FAME *x*

Ais: Areal af internstandard

Wis: vægt af tilsat internstandard i mg

Ws: vægt af prøven i mg

CFx: TRF for FAME *x*

Litteraturstudie vedrørende fedtsyrer i muslinger

Detaljeret næringsindhold i rå blåmuslinger kan findes på DTU Fødevareinstituttets hjemmeside; www.foodcomp.dk, Fødevaredatabanken (version 7.01). Tabel 4a og 4b viser et udsnit af udvalgte relevante informationer for indeværende projekt, som eks. tørstof, fedtindhold og indhold af mættede/umættede fedtsyrer. Det er velkendt at muslingers lipidindhold og sammensætning varierer alt efter årstid, lokation, fødeforhold, temperatur og produktionsforhold (se afsnit "blåmuslingen"). Der er ikke angivet hvorfra og på hvilket tidspunkt muslingerne næringsindhold er bestemt, og produktionsformen er heller ikke opgivet, men det antages at være konsum muslinger fra danske farvande. Værdier i fødevaredatabanken for total lipid og fedtsyrerne er angivet som vejledende værdier, g/100 g spiseligt indhold, beregnet ud fra en fedtsyreomregningsfaktor (FAF). For anvendte metode henvises til www.foodcomp.dk.

Energi	347 Kj
Protein, total	11.9g
Fedt, total	2.2g
mættede fedtsyrer	0.4g
monoumætt. fedtsyrer	0.5g
polyumætt. fedtsyrer	0.5g
Kulhydrat, total	3.7g
kostfibre	0.0g
Aske	1.6g
Vand	80.6g

Tabel 4a. Næringsindhold i rå musling. [www.foodcomp.dk]

Fedtsyrer	g/100g	%
C14:0	0.047	3.30
C15:0	0.015	1.04
C16:0	0.225	15.9
C17:0	0.024	1.70
C18:0	0.137	9.70
C16:1, n-7	0.121	8.57
C18:1, n-9	0.130	9.23
C20:1, n-11	0.138	9.79
C22:1, n-9	0.096	6.78
C18:2, n-6	0.037	2.64
C18:3, n-3	0.029	2.07
C20:4, n-6	0.082	5.84
C20:5, n-3	0.209	14.8
C22:5, n-3	0.037	2.64
C22:6, n-3	0.085	6.03
Sum mættede	0.446	31.6
Sum monoumættede	0.485	34.4
Sum polyumættede	0.480	34.0

Tabel 4b. Fedtsyresammensætning i rå muslinger. [www.foodcomp.dk]

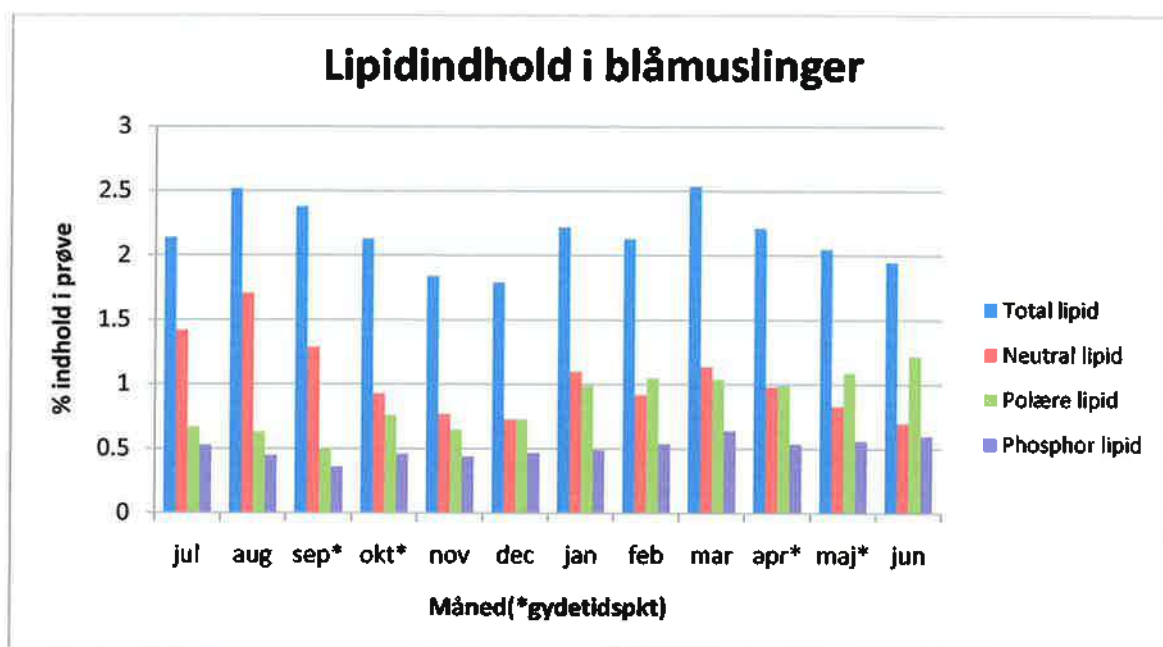
Lipider i blåmuslinger

I en undersøgelse fra Kina, [A15; Hong Lin et al.2002], blev der analyseret på lipidindhold i blåmuslinger udtaget, ud fra kysten ved Qingdao, hver måned. De fleste blåmuslinger der produceres i Kina anvendes til dyrefoder og dernæst til konsum. I artiklen fokuseres på FA* sammensætning i phosphorlipider i muslingerne jf. årstiderne. Som årstiderne skifter, vil temperaturen i havvandet og planktonindholdet ændres, hvilket kan have effekt på muslingernes fysiologiske aktivitet og fødeindtagelse, som relaterer til lipidindhold og dens sammensætning.

Indholdet af totale lipider, neutrale lipider, polære lipider og phosphorlipider i muslinger ændres med årstiderne. Phosphorlipider i marine organismer er komplekse og deres fedtsyrer er udpræget umættede, specielt indeholdende EPA *og DHA*.

Resultaterne viste sammenhæng mellem lipidindhold, gydetidspunkt og årstid. Det totale lipidindhold(2.5-1.8%) ses højest lige før gydning og lavest lige efter gydning. Indholdet af neutrale lipider(1.7-0.7%) ses højest sensommer/efterår og lavest ved vintertid, hvor phosphorlipider(0.6-0.4%) har mindre udsving i indhold, med lavest efterår og højest forår. Se figur 18 der illustrerer data fra artiklen [A15; Hong Lin et al.2002;p.134,tabel 1].

I flg. artiklen, antages det, at neutrale lipider med højste værdier om efteråret, efterfølgende faldende hen over vinteren, fungerer som energilagere der opbygges hen over sommeren hvor fødemængden er optimal. Hvor phosphorlipider med deres næsten konstante indhold primært må indgå i cellemembraner som membranlipider.



Figur 18. Årstidsbestemt sammensætning af totale lipider, neutrale lipider, polære lipider og phospholipider. * Angiver gydetider der i Kina kan foregå op til to gange årligt. [A15; Hong Lin et al.2002;p.134,tabel 1]

Det anses at glycogen* indholdet i blåmuslinger er på sit laveste i det tidlige forår frem til gydning og stiger først hen over sommeren hvor fødemængde er størst (Se afsnit "Blåmuslinger").

I artikel,[A21; Peiters H. et al. 1980], er der bestemt indholdet af lipid, protein og glycogen på blåmuslinger udtaget ugentligt fra vadehavet, ved Tysklands kyst. Undersøgelsen viser at både indhold af lipid og protein er højest lige før gydning, hvor glycogen indholdet ligger på sit minimum(angivet som mg /musling). Efter gydning ses fald i totale mængder af lipid og protein og stigning af glycogen, der herefter lagres igen som hurtig dannende energi der senere kan omdannes til fedt og protein. Største udsving i mængder ses for protein og glucagon, hvor mindre udsving er at finde for lipidindhold. Her angives at glycogen lagres over sommeren og bruges hen over vinteren, hvor lipid og proteiner anvendes som energi i forbindelse med gydning. I undersøgelsen defineres ikke hvilke lipidklasser der indgår som energilagere, men det kan antages at være neutrale lipider frem for membranlipider jf. artikel [A15; Hong Lin et al.2002]. Her argumenteres for at både

glycogen og (neutral) lipider lagres hen over sommeren hvor fødemængde er størst, det topper omkring efterår og falder over vinteren ved ringere fødemængde. Dette kunne tyde på at muslinger anvender både glycogen og neutrale lipider (der ikke indgår i cellemembranen) som energilagere.

Lignende undersøgelse [A16; Seiichi Uno et al.1999] blev lavet i Canada på blåmuslinger udtaget ved 7 forskellige lokationer (Vancouver). Her angives ligeledes at lipider i store træk kan opdeles i to kategorier: de neutrale lipider (NL), som er lagret fedt der primært er sammensat af triglycerider, samt phosphorlipider (PL) og kolesterol* der er membranernes byggesten. Resultater viste at vigtigste lipider i muslinger var 10 - 23% triglycerid (TAG), 24 - 37% frie fedtsyrer (FFA), 4 - 7%sterol (ST), og 36 - 55% phospholipid (PL).

Det anses at depotlipiderne hovedsagelig består af TAG* og sammensætning vil ændres afhængigt af tilgængelige næringsstoffer. Hvor lipider fra væv/celler hovedsagelig består PL* og deres sammensætning ændrer sig ikke nævneværdigt. Ud fra tesen om TAG/PL forholdet i muslinger og deres tilgang af næringsstoffer, viste resultaterne overensstemmelse ved at muslinger fra lokationer med gode næringsforhold havde højeste TG/PL forhold og vice versa. Fedtsyresammensætningen anses generelt at være påvirket af føde, sæson/årstid, vandtemperatur, og vanddybde ved levested. Indhold af FFA i undersøgelsen her var overordnet domineret af komponenterne C16:0, C16:1n7, C18:1n7, C20:5 n-3(EPA) og C22:6 n-3(DHA).

Blå og grønne muslinger

Jævnførte informationer fundet for blåmuslinger ønskes vurderet for den New Zealandske grønlæbede muslinger, der høstes hele året, hvorfra olie er udvundet anvendt til bla. kosttilskud. Der blev foretaget litteratursøgning på undersøgelser af fedtsyrersammensætning i blåmuslinger til sammenligning med grønlæbede muslinger. Dette med øje for om der var, og i givet fald hvilke, forskelle/ligheder i fedtsyreindhold og sammensætninger der er at finde mellem de to arter ud fra dokumenterede studier. Der er, jf. [A17; MCLEAN & BULLING,2005], kun lavet få studier om muslingers variabilitet i lipidprofil under den årlige cyklus, men her angivet i en undersøgelse hvor der blev udtaget prøver af grønlæbede muslinger (*Perna canaliculus*) og blåmuslinger (*Mytilus edulis*) 4 gange over et år (forår, sommer, efterår og vinter). Der blev målt lipidindhold og sammenholdt de to muslingearters procentvise andel af forskellige indeholdende fedtsyrer. Udbyttet af olie fra de analyserede muslinger var forholdsvis små, varierende fra 0,5 til 2 % (w/w). Mængde af totallipid indholdet i New Zealand grønlæbede musling (NZGLM) og blåmusling (BM) er ikke helt entydig med teorien om at det er højest før gydning og lavest lige efter. Dette forklares med at der kun er udtaget prøver 4 gange i løbet af et år, hvilket ikke nødvendigvis kan afspejle det reelle udsving i lipidindhold. Det skal også fremhæves at muslinger i New Zealand kan gyde op til to gange årligt.

Det totale lipid indhold i NZGLM* var højest sommer/efteråret (1.8-1.7%) og lavest vinter (1.0%) med opadgående indhold i løbet af foråret (1.4%), for BM* lå det totale lipidindhold med et lille udsving hen over året (0.5-0.6%). BM producerede både lavere olie- og omega-3 fedtsyrer og viste samtidig større variation i indhold i forhold til grønlæbede muslinger. Lipidekstraktet fra NZGLM indeholdt større andel af omega 3 (17-22 %) end for BM (1-21%), med et bemærkelsesværdigt fald om efteråret. Se tabel 6. Ses på indholdet af de to vigtige fedtsyrer, EPA* og DHA*, fås for NZGLM en øgning af DHA hen mod vinteren (inden gydetidspunkt) og et drastisk fald om foråret (lige efter gydning). For BM falder indholdet af EPA og DHA hen over sommer/efterår (efter gydning). PUFA* indholdet for NZGLM er højest om vinteren og for BM er det om foråret. Se tabel 5.

Tesen er jf artikel[A17; MCLEAN & BULLING,2005]: Selv om omega-3 niveau i muslingerne ses som en virkning af kravene til reproduktion og måske fremstilles i marine organismer til netop det formål, er deres tilstedeværelse også i den grad afhængig af om de ønskede fedtsyrer er tilgængelige i føden. De fleste skaldyr optager store mængde føde ved filtrering af plankton som indeholder omega-3 fedtsyre. NZGLM OG BM kunne antages at optage samme fødesammensætning når de vokser ved samme lokation(line-produktionsfarm i New Zealand). Dog er der formodninger om at forskellen i fedtsyresammensætning mellem de to muslingearter kan forklares i at NZGLM konsumerer føde med højt indhold af diatomer*/kiselagler, hvor BM konsumerer føde med højt indhold af dinoflagellater*. Dinoflagellater udgør sammen med kiselalger de vigtigste primærproducenter af organisk stof i havets plankton.

mg/g lipid	Grønlæbede muslinger				Blåmuslinger			
	Forår	Sommer	Efterår	Vinter	Forår	Sommer	Efterår	Vinter
SFA	132	143	131	159	130	105	63	89
MUFA	65	73	68	85	63	51	25	44
PUFA	192	237	223	271	229	203	24	140
Omega 3	178	225	207	251	212	187	13	128
Omega 6	14	12	16	20	17	16	11	12
EPA	84	102	79	99	101	90	4	44
DHA	63	86	100	115	80	66	5	64

Tabel 5. Fedtsyrerne grupperes efter grad af dobbeltbindinger : PUFA>SFA>MUFA. Omega 3 og omega 6 indgår som total mængde PUFA. EPA og DHA er en andel af total mængde omega 3. [A17; MCLEAN & BULLING,2005]

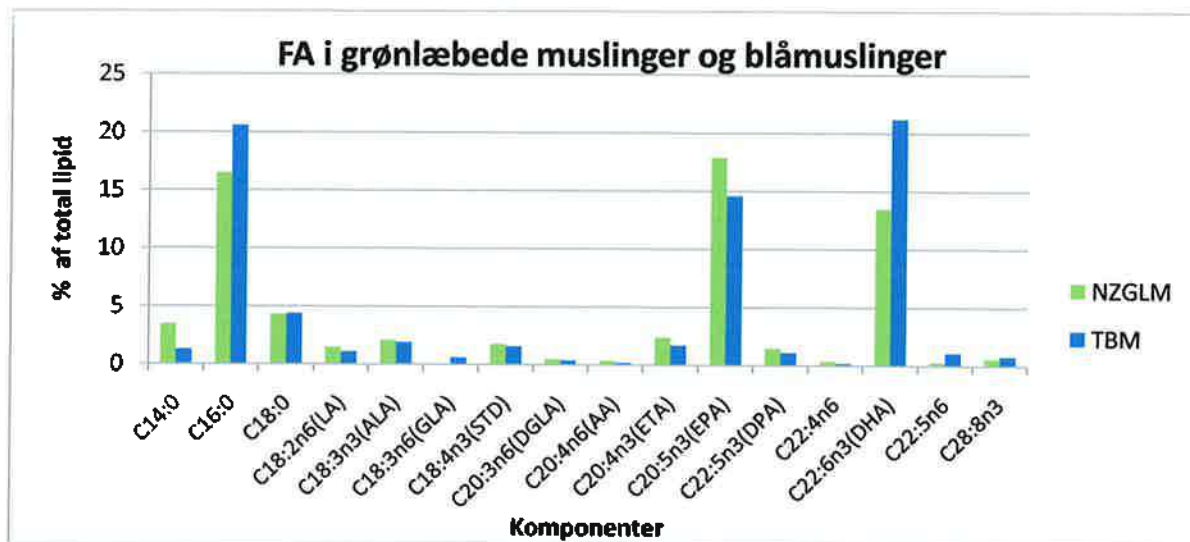
I en anden undersøgelse, jf. artikel[A20; Murphy KJ et al. 2002], blev der ligeledes sammenlignet forhold af lipid, FA, og sterolindhold i New Zealand grønslæbede muslinger (NZGLM, *Perna canaliculus*) og Tasmanske blåmusling (TBM, *Mytilus edulis*). De respektive muslingearter blev indhentet om foråret(lige før gydetidspunkt) fra tre forskellige lokaliteter i både New Zealand og Tasmanien. Total lipid blev her fundet til 1.2% for TBM* og 1.8% for NZGLM . Lipidklasse af begge muslingearter var karakteriseret ved en høj andel af phospholipid (PL, 57-79%) og TG (10-25%), FFA (7-12%) og steroler (ST, 12-18%) . NZGLM havde højere andele af TAG, FFA, og ST, mens TBM havde en større andel af PL. Der var en højere andel af PUFA*, SFA* og omega-3 i TBM sammenlignet med NZGLM. Se tabel 6.

% Fedtsyrer	NZGLM	TBM
Wax ester	0.1	0.2
TAG	22	14
FFA	12	7
Sterol	6	5
PL	60	74
% total lipid i prøven	1.8	1.2

Tabel 6. Gennemsnitlige værdier fra tre lokation for lipidindhold og sammensætning i hhv. grønslæbede muslinger og blåmuslinger. [A20; Murphy KJ et al. 2002].

Størstedelen af FA (% af total lipid)i NZGLM var C16:0 (15-17%), C20:5n3/EPA(14-20%) og C22:6n3/DHA(11-17%). De samme FA dominerer i TBM, selv om der var signifikant højere andel af C16:0 og C22:6n3/DHA og lavere andele af C20:5n3/EPA. En novel PUFA, C28:8n3, blev fundet i

begge muslingearter, med højeste indhold i TBM(0.8% frem for 0.6%), hvilket formentlig er en afspejling af blåmuslingens føde bestående hovedsageligt af dinoflagellater. Kolesterol * var den dominerende sterol* i begge muslingearter. Der var betydelige forskelle mellem NZGLM og TBM for 12 af de 20 steroler der blev målt. Forskellene i både FA og sterol sammensætning mellem de to arter kan skyldes at føden for NZGLM bidrager mest med kiselalger/diatom (højt indhold af EPA), hvor føden for TBM indeholder dinoflagellater(høj indhold af DHA). Se Figur 19.



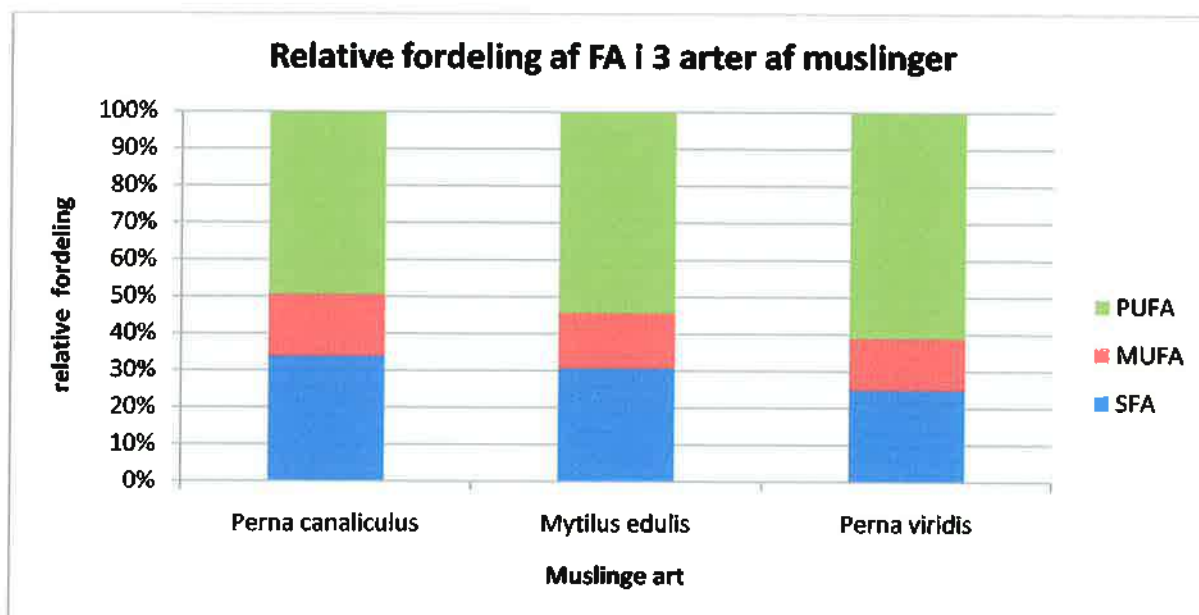
Figur 19. Primære FA komponenter i New Zealandske grønslæbede muslinger(NZGLM) og Tasmanske blåmuslinger(TBM). [A20; Murphy KJ et al. 2002]

Lignende den New Zealandske grønslæbede musling *Perna caliculus*, findes tilsvarende grønne muslinger i farvandene omkring Asien, *Perne viridis*, og ved Afrika, *Perna perna*. Undersøgelser tilsvarende dem på New Zealandske grønslæbede musling (*Perna caliculus*) kan findes på den asiatiske grønslæbede muslinger(*Perna viridis*) udtaget ved østkysten af Hong Kong, jf. artikel [A18; K. Y. CHAN et al. 2004]. Total lipid på 6.2(±0.7)% og neutrale lipider 2.7(±0.4)% er bestemt ud fra tørvægt. Det høje lipidindhold, der er analyseret lige før gydetidspunktet, forudsættes at være relateret til den reproduktive status på muslinger. Sammensætning i lipidindholdet gav 38±0.9 % for DHA og 17.9±1.2% for EPA, hvor de resterende enkelte FA komponenter var mindre end 3%. Sammensætning af FA komponenterne i totale lipider/phosphorlipider(≈membranlipider) var næsten af tilsvarende sammensætning i neutrale lipider(≈lagre energi). Se tabel 7.

Procentindholdet af DHA og EPA i *Perne viridis* ses relativt højere end i andre muslinger. I figur 20 vises grafisk den relative fordeling mellem SFA*, MUFA* og PUFA* overfor lignende analyser af *Perna caliculus* og *Mytilus edulis*. En forklaring på det især høje DHA indhold i *Perne viridis* kan være dens primære tilgang af føde i området består af dinoflagellate der indeholder større mængder DHA, frem for diatom hvor indholdet af EPA er mere fremherskende. Her omtales også neutrale lipiders varierende indhold hen over en sæson, hvor phosphorlipider som strukturelipider i cellemembraner ikke udviser samme tendens.

% Fedtsyrer	total lipid	neutral lipid
SFA	25	25
MUFA	14	14
PUFA	61	61
omega-3	56	57
EPA+DHA	56	56
% total lipid i prøven	6.2	2.7

Tabel 7. Lipidindhold og sammensætning i den asiatiske grønblæbede musling (*Perna viridis*) i hhv. total lipid og neutral lipid. [A18; K. Y. CHAN et al. 2004].



Figur 20. Relativ fordeling af flerumættede (PUFA ≈ omega 3+6), monoumættede (MUFA) og mættede (SFA) fedtsyre i blåmuslinger (*Mytilus edulis*) og grønblæbede muslinger fra Asien (*Perna viridis*) og New Zealand (*Perna canaliculus*). [A17; MCLEAN & BULLING, 2005], [A18; K. Y. CHAN et al. 2004].

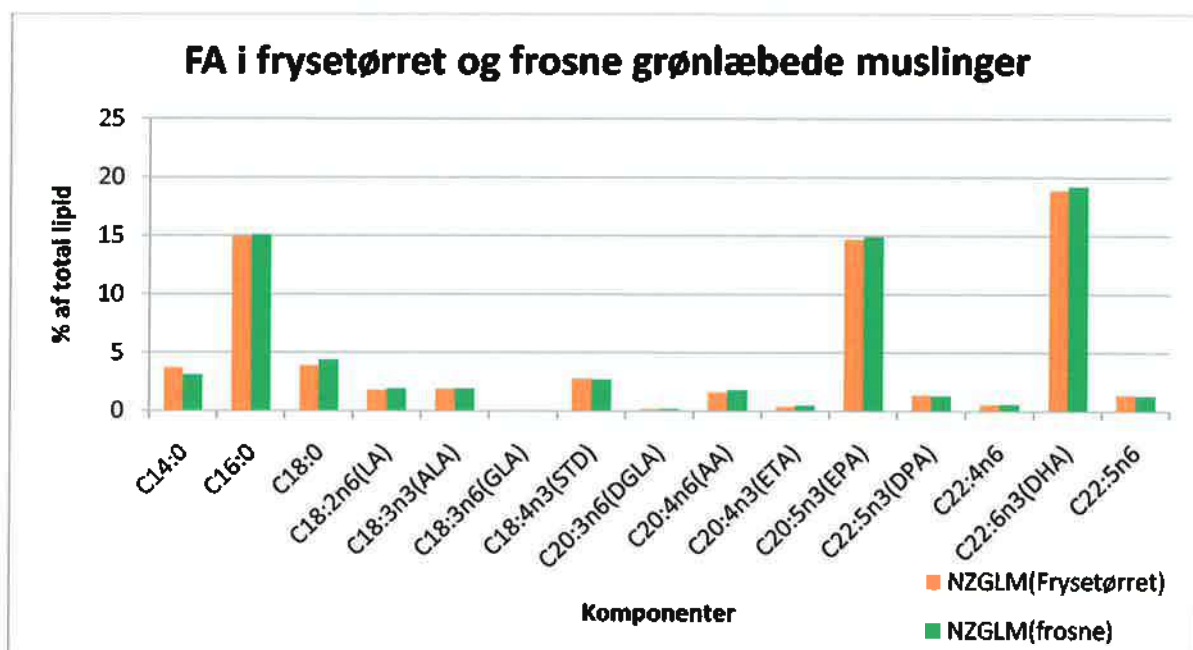
Ved alle ovennævnte undersøgelser blev der anvendt friske muslinger eller muslinger der havde været opbevaret på frost. Lipidindhold blev bestemt ved ekstraktion med chloroform/methanol/vand ("Folch" eller "Bligh & Dyer" metode, (se afsnit "Fedtsyrebestemmelse i muslinger og marine olier"). Til bestemmelse af lipidklasser blev anvendt TLC*/GC*/MS*.

Fremstilling af FAME* foregik først med basisk hydrolyse/saponifikation (på nær ;[A18; K. Y. CHAN et al. 2004]) og efterfølgende methylering ved sur-reagens (HCl-, BF₃- eller H₂SO₄- methanol). Det kan ikke afgøres hvilken betydning opbevaring af prøve, prøveforberedelse og metode for de givende resultater har for sammenligning mellem de nævnte undersøgelser. I artikel [A16; Seiichi Uno et al. 1999] refereres til det velkendte fænomen omkring oxidation og hydrolyse af fedt i fisk og skaldyr der selv under frossen oplagring kan forårsage alvorlig forringelse af kvalitet. Endda opbevaring under -20 °C kan medføre fald i indhold af TAG og visse PL(PC*) hvor ved koncentrationen af frie fedtsyrer øges.

Dette fænomen er set på i en anden undersøgelse [A19; Murphy KJ et al. 2003] foretaget på grønslæbede muslinger (NZGLM) der hhv. blev frosset og frysetørret lige efter prøveindsamling (udtaget lige før gydetidspunkt). Tesen angiver at FFA vil stige under opbevaring af muslinger forårsaget af lipolytisk* aktivitet, givende fejlagtige resultater af forestående analyser. Undersøgelsen viste ingen tydelige forskelle i de vigtigste bestanddele af lipider, fedtsyrer og steroler mellem frysetørret og frosne prøver. Kun alene forskellen i lipidkoncentrationer for frysetørret og frosne prøver, udledt fra fjernelsen af vandet under frysetørring. PUFA var den største gruppe af fedtsyrer i både frysetørret og frosne prøver (45-46%), hovedsageligt bestående af omega-3 fedtsyrer (40-41%). SFA tegnede sig for cirka en fjerdedel af den samlede mængde fedtsyrer, med lille variation mellem frysetørret og frosne prøver. De vigtigste fedtsyrer i NZGLM var C22:6n3/DHA (19% i både FD og frosne prøver), C20:5n3/EPA, og C16:0/palmitinsyre (16:0) (15% for begge komponenter i både FD og frosne prøver). Se tabel 8 og figur 21.

% Fedtsyrer	Frysetørret NZGLM	Frosne NZGLM
SFA	26	25
MUFA	23	23
PUFA	45	46
omega-3	40	41
omega-6	5	4
Andre	6	6
% total lipid i prøven	8.4±0.8(tørvægt)	1.6±0.5(vådvægt)

Tabel 8. Lipidindhold og lipidklasser i hhv. frysetørret og frosne grønslæbede muslinger. [A19; Murphy KJ et al. 2003]



Figur 21. Primære FA komponenter i hhv. frysetørret og frosne New Zealandske Grønslæbede muslinger(NZGLM).[A19; Murphy KJ et al. 2003]

Konklusion

Der blev overordnet vurderet ud fra gennemgået litteratur følgende punkter

- Neutrale lipider fungerer som energilager, anses variabel i indhold.
- Phosphorlipider indgår i cellemembraner, anses konstant i indhold.
- Forskel i lipidmængde for hhv. blåmuslinger og grønløbede muslinger.
- Forskel i fedtsyrersammensætning i hhv. blåmuslinger og grønløbede muslinger afhængig af fødesammensætning.
- Relativt højere indhold af EPA i grønløbede muslinger, føde primært diatomer/kiselagler.
- Relativt højere indhold af DHA i blåmuslinger, føde primært dinoflagellater.
- Forhold mellem FFA og TAG kan stige, ved frosen opbevaring, afledt af oxidation.
- Frosne og frysetørret prøver indikerer ikke lipolytisk aktivitet ved frosen opbevaring
- Der er ikke anvendt OSM* til FAME-fremstilling i nogen af undersøgelserne.

Der blev fundet betydelig varierende oplysninger angående lipidkoncentration i blåmuslinger fra 0.5 op til 2.5 % i vådvægt og for grønløbede muslinger blev der ikke fundet højere værdier end ca. 1.8%. Der skal tages højde for mulige variationer af lipidindholdet ved f.eks årstid, lokation og fødeforhold.

Undersøgelsen, jf. [A21; Peiters H. et al. 1980], viser at både indhold af lipid og protein er højest lige før gydning, hvor glycogen er på sit minimum (angivet som mg /musling). Efter gydning ses fald i totale mængder af lipid og protein og stigning af glycogen. Her angives at glycogen lagres over sommeren og bruges hen over vinteren, hvor lipid og proteiner anvendes som energi i forbindelse med gydning. Dette sammenstilles med undersøgelse, [A15; Hong Lin et al. 2002] hvor der også argumenteres for at både glycogen og (neutral) lipider lagres hen over sommeren hvor fødemængde er størst, topper omkring efterår og falder ned over vinteren ved ringere fødemængde. Dette kunne tyde på at muslinger anvender både glycogen og neutrale lipider (der ikke indgår i cellemembranen) som energilager. Lignende undersøgelse, jf. [A16; Seiichi Uno et al. 1999], angav ligeledes at lipider i store træk kan opdeles i to kategorier: de neutrale lipid (NL), som er lagret fedt der primært er sammensat af triglycerider, samt phosphorlipider (PL) og kolesterol der er membranernes byggesten. Det anses at depotlipiderne hovedsagelig består af TAG og sammensætning vil ændres afhængigt af tilgængelige næringsstoffer, hvor lipider fra væv/celler hovedsagelig består PL og deres sammensætning ændrer sig ikke nævneværdigt. Muslinger fra lokationer med gode næringsforhold viste, jf. teori, højeste TG/PL forhold og vice versa. Det ansås også her at fedtsyrersammensætningen generelt er påvirket af føde, sæson/årstid, vandtemperatur, og vanddybde ved levested jf. andre undersøgelser.

Der argumenteres, jf. [A20; Murphy KJ et al. 2002], at forskel i sammensætning af FA og sterolindhold mellem de to arter kan skyldes føden. Føden for NZGLM bidrager mest med kiselalger/diatom (høj EPA), hvor det for TBM primært er dinoflagellater (høj DHA). Lignende argumenter, jf. [A18; K. Y. CHAN et al. 2004], angiver at højt DHA indhold i asiatiske grønløbede muslinger tillægges fødetilgang i område der primært består af dinoflagellate indeholdende større mængder DHA, frem for diatom med mere fremherskende indhold af EPA. Dette sidestilles med

tesen, jf. [A17; MCLEAN & BULLING,2005], at NZGLM foretrækker at konsumere føde med højt indhold af diatomer/kiselagler, hvor BM foretrækker at konsumere føde med højt indhold af dinoflagellater selv ved samme lokation og fødesammensætning.

Der skal tages højde for faktorer angående f. eks opbevaring af prøve, prøveforberedelse, anvendte metoder o.lign. der kunne have indflydelse på givende resultater ved sammenligning mellem de nævnet undersøgelser. Der omtales, jf.[A16; Seiichi Uno et al.1999] bla. lipolytisk aktivitet/oxidation mulige indvirkning på analyseresultater, medførende fald i TAG indhold, og visse PL(PC*), hvor ved koncentrationen af frie fedtsyrer øges, selv ved opbevaring under -20 °C. Dog blev antydnet, jf. [A19; Murphy KJ et al. 2003], at der ikke var signifikante forskelle i lipidsammensætning mellem frysetørret og frosne prøver der kunne indikationer evt. oxidation under frossen opbevaring.

Til sidst skal nævnes at der i ingen af de omtalte undersøgelser blev anvendt OSM* til fremstilling af FAME for GC-analyse, men brugt den mere traditionelle metode ved lipidekstraktion med chloroform/methanol/vand(friske eller frosne muslinger) og derefter FAME-fremstilling, gerne med forudgående basisk hydrolyse.

Eksperimentelle fedtsyrerbestemmelser i muslinger og marine olier

Metodevalg

Ud fra ønskes om bestemmelser af fedtsyrer i muslinger og marine olie blev følgende overvejelser og planlægning foretaget i forbindelse med metoder og procedurer. Der blev fra starten af projektet bestemt at anvende velkendt metode til fedtsyrebestemmelse bestående af en forudgående methylering af fedtsyrerne før GC*-analyse. [www.cyberlipid.org],[www.lipidlibrary.co.uk]. GC-kolonne SB-23 anbefalet til FAME* blev valgt ud fra de til laboratoriets allerede tilgængelige kolonner. GC- metoden blev sat ud fra anbefalede parameter fra producent af valgte kolonne SB-23. [www.chem.agilent.com].

Først blev der set på mulige metoder for oprensning af lipider fra biologiske materialer med vægt på to populære metoder, "Folch" og "Bligh & Dyer". [A1],[A2]. Begge metoder anvender, i kombination med methanol/vand, det upolære opløsningsmiddel chloroform som er klassificeret værende sundhedsskadeligt og kræftfremkaldende (se bilag IX) og der eftersøges mulige metoder med substituerende stoffer [A9],[A3].

Desuden blev der samtidig undersøgt metoder for fremstilling af FAME jf. bagvedliggende teorier. FAME fremstilling kan overordnet opdeles i to metoder, transesterificering og esterificering, med anvendelse af flere forskellige varianter af sure eller basiske reagenter. Af de basiske er den mest populære NaOH-methanol, for de sure er det HCl- methanol, samt den meget anvendte BF₃-methanol der også bliver beskyldt for reaktion af biprodukter. [www.lipidlibrary.co.uk]. I forbindelse med litteratursøgning omhandlende FAME fremstilling blev der fremhævet en hurtig metode uden forudgående oprensning af lipider fra prøvemateriale. Ved anvendelse af One-Step-metoden(OSM) kan der undgås kræftfremkaldende solventer som chloroform, samtidig med en betydelig begrænsning af øvrige organiske solventer.[A7],[A8],[A13],[A14]og [17]. Der blev besluttet at se nærmere på OSM* som anvendte metode med dens mangfoldige kombinationer af methyleringsreagenter/solventer/tid /temperatur. Dette blev vurderet og sammenholdt med gennemgåede teorier og litteratursøgning(se afsnit " Fedtsyrebestemmelse i muslinger og marine olier"), samt projektets tidsramme og økonomiske ressourcer.

Der blev overvejet at anvende NaOH-methanol både som basisk hydrolyse af komplekse lipider og transesterificering af TAG*, herefter HCl-methanol til esterificering/transesterificering af FFA*. Som upolære solvent vælges hexan, men toluen kunne også have været en mulighed. For tilsætning af polær solvent til faseadskillelse vælges vand efter NaOH-methanol behandling og ved HCl-methanol 6% K₂CO₃, som desuden neutraliserer syren under udvikling af CO₂. Fastsættelse af temperatur og tid kan jf. diverse litteratur anbefales i området 50-100°C i 5-120 min. Her er som udgangspunkt valgt omkring de 70°C i 30-120 min, ud fra den betragtning at minimere mulige begrænsende faktorer af temperatur/tid for opnåelse af fuldstændig reaktionsforløb, dog med risiko for evt. utilsigtet interferende sidereaktion og/el. nedbrydning af fedtsyrerne. Det er muligt at reduktion i temperatur og/el tid ville give samme, end og måske bedre resultater, men inden for projektets tidsramme er fravalgt nærmere undersøgelser af disse faktorer.

Frysetørring af muslinger er anbefalet som optimal fjernelse af vand fra marine produkter før FAME-fremstilling pgra af den skånsomme tørring ved betydelig lavere temperatur end mulig anvendt ved almindelig tørringsprocesser (varmeskab ved 105°C).[A8],[A19]. Se evt. Appendix B for frysetørringsprincipper og teori.

Til GC- analyse blev valgt to internstandarder, C13:0(Tridecanoic acid) liggende uden for ønsket område af relevante fedtsyrer og C19:0(Nonadecanoic acid) i midten af området. Der blev udvalgt et afgrænset, men afdækkende antal standardreferencer til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af mulige relevante fedtsyrer i marine produkter. Deslige blev undersøgt marked for kosttilskud af forskellige fiskeolier i differerende kvalitet og prisleje til sammenligning med muslingeolie og indkøb fortages herefter (se bilag II). Der blev koordineret modtagelse af friske lineproducerede blåmuslinger og indkøb af konsum blåmusling og grøn læbede muslinger. Der blev tidsmæssigt planlagt to forsøgsrunder i laboratorium på SDU i Odense, hvor første runde primært blev bestemt til afprøvning af udstyr og metoder til udarbejdelse af protokoller og forsøgs- planlægning af efterfølgende forsøgsrunde til bestemmelse af fedtsyrer i muslinger og marine olier.

De to forsøgsrunder vil senere hen i rapporten omtales som uge50/2008 og uge6/2009. Overordnet arbejdsflow og procedure er udarbejdet jf. figur 22 og 23, der henvises til yderligere forklaring i efterfølgende afsnit i forbindelse med udarbejdelse af forsøgsplaner.

Kemikalier, materialer og prøver

Der blev anvendt diverse almene laboratorieudstyr, glasvare og engangsmaterialer i forbindelse med procesgangen. Der blev af apparatur anvendt IKA-Ultra-Turrax T25 (homogenisering), FD4/55 frysetørre, samt HP6890A Gas Chromatograf. Se Bilag IV for yderligere information i protokoller.

Der blev udarbejdet risikovurdering på kræftfarligt stof(methylenchlorid) og APV på anvendte sundhedskadelige stoffer, samt vedlagt produktinformation for reagenser med faremærket:Giftig. Se Bilag IX. For referencestandarder og øvrige kemikalier blev anvendt producentens anvisninger på emballage og bølge og/eller medfølgende dokumentation. Heptan og methylenchlorid indgår i anvendte standardreferencer fra producentens side. Methanol indgår i selve methylerings-reagenserne og hexan anvendes til prøver. Chloroform og toluen er ikke anvendt, men blev erstattet af mulige supplikanter. Der blev fremstillet 6 % kaliumcarbonat opløsning anvendt efter sur methylering. Natriumsulfat(vandfrit) kan tilsættes for fjernelsen af evt. rester af vand i prøven. Der blev indkøbt i detailbutikker diverse olieprøver, samt frosne konsum grøn læbede muslinger og friske konsum blåmusling fra køledisk. Lineproducere friske "urensede" blåmuslinger blev afhentet direkte en gros hos SydFyns Linemuslinger Nordshell A/S. Se tabel 9,10,11 og 12.

Navn	Bruttoformel	Mw	Kp	Densitet	Bemærkning
Methylenchlorid ¹⁾	CH ₂ Cl ₂	84,93 g/mol	40°C	1,325 g/cm ³	Standarder
Methanol ¹⁾	CH ₃ OH	32,04 g/mol	64,7 °C	0,792 g/cm ³	OSM
Hexan ¹⁾	C ₆ H ₁₄	86,18 g/mol	69°C	0,659 g/cm ³	OSM/prøveopløsn.
Heptan ¹⁾	C ₇ H ₁₆	100,2 g/mol	98°C	0,684 g/cm ³	Reference
Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄	142,04 g/mol	-	-	Vandsugende
Kaliumcarbonat	K ₂ CO ₃	138,20 g/mol	-	-	6% opløsn.

Tabel 9. Solventer og kemikalier anvendt til forsøg.

¹⁾Udarbejdet APV, se Bilag IX. Bemærk at Hexan og Heptan er udarbejdet i en og samme APV.

Varenavn	Produkt nr.	Mængde
Methanolic Base 0,5N ¹⁾	33080	100 ml
Methanolic acid 1.25 M ¹⁾	17935	100 ml
Methanolic HCl 3 N	33050-U	400 ml
Menhaden fish oil	47116	Ampule 1000 mg
Olive oil	47118	Ampule 1000 mg
Supelco®37 Component FAME Mix	47885-U	10 mg/ml dichlormethan
PUFA No.1(Marine Source)	47033	100 mg
PUFA No.3(from menhaden oil)	47085-U	100 mg
Tridecanoic acid	T0502	1 g
Methyl tridecanonate	T0627	1 g
Nonadecanoic acid	72332-1G-F	1 g
Methyl nonadecanoate	74208-1G	1 g
Cis-9-Octadecenoic methyl ester	46902-U	10 mg/ml Heptan
Cis-9,cis-12-Octadecadienoic acid methyl ester	46950-U	10 mg/ml Heptan
Methyl cis-5,8,11,14-eicosatetraenoate solution	47572-U	10 mg/ml Heptan
Cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	47571-U	10 mg/ml Heptan
Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic methyl ester	47570-U	10 mg/ml Heptan

Tabel 10: Referencer og reagenser, med tilhørende produkt nr., er bestil gennem Sigma-Aldrich Danmark A/S. [www.sigmaaldrich.com]. ¹⁾ Se produktinformation Bilag III og IX.

Produkt	Vare	Indhold	% EPA	%DHA	%ETA/ OTA ²⁾
Original muslingeolie	Kosttilskud	50 stk.	3,3(10) ¹⁾	2,7(8) ¹⁾	1,2/0,1
FISKEOLIE	Kosttilskud	120 stk.	18	12	-
TOBIS™ Omega-3	Fødevarer	200 ml	8,9	9,6	-
Torskelevertran	Kosttilskud	200 ml	5,5	6,1	-
Fitness Pharma	Kosttilskud	120	23,8(33,3) ¹⁾	16,2(22,6) ¹⁾	-
Pikasol GI 60	Naturlægemiddel	180 stk.	30	21	-
Oliveolie	Fødevarer	500 ml	-	-	-

Tabel 11. Olieprøver indkøbt i detailbutikker.

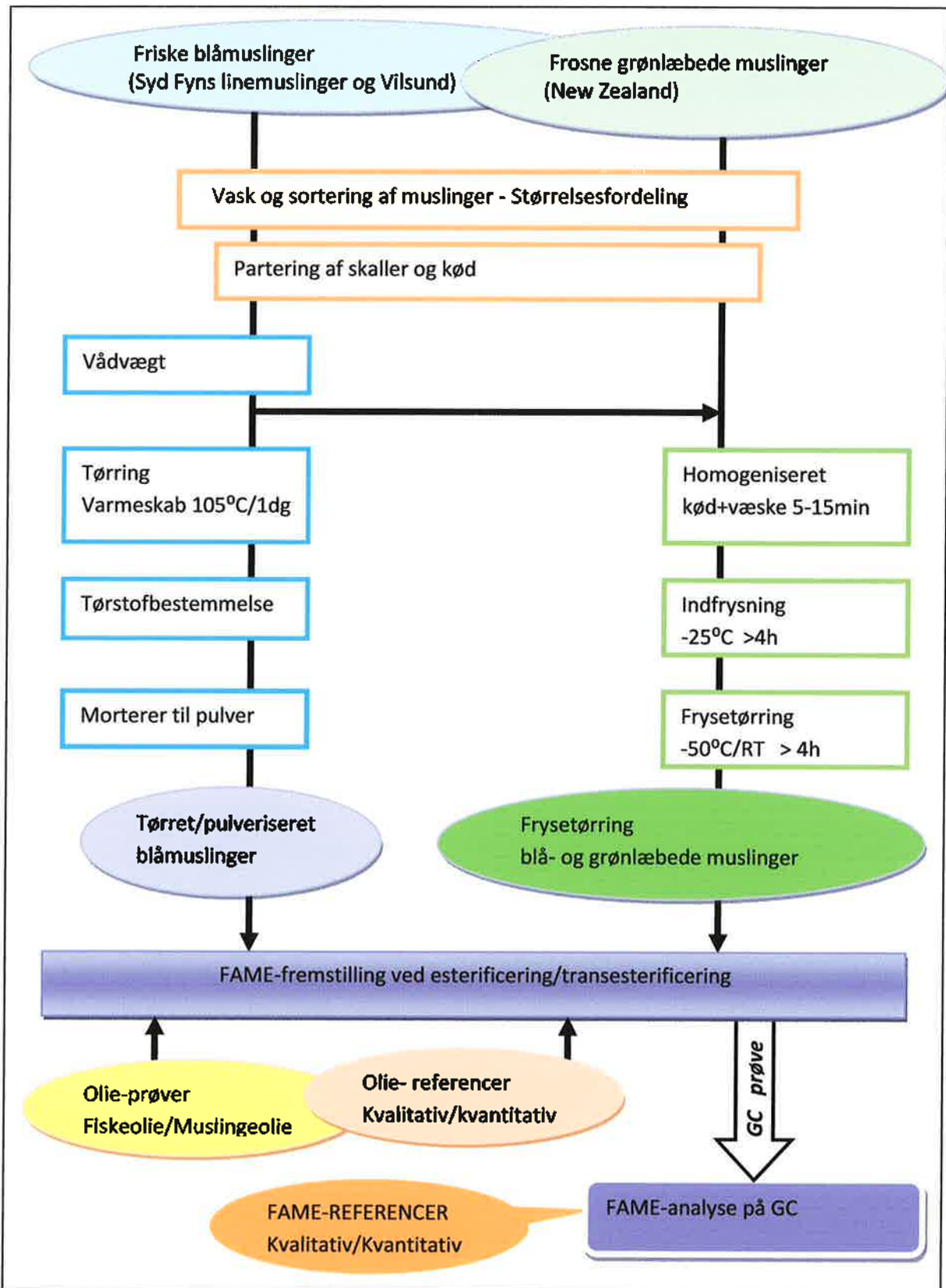
1)Procent i parentes angiver netto % i olien excl. indeholdende planteolie.

2)OTA* svarer til STD* (Stearidonic acid C18:4n3).

Produkt	Firma	Opbevaring	Bemærkning	Opdræt/lokation
Frosne grønblå muslinger ¹⁾	Nordic Seafood A/S	Frost/-20°C	Importeret muslinger der fra producentens side er blancherede før indfrysning	Lineproduceret/ New Zealand
Friske blåmuslinger ¹⁾	Vilsund Trading A/S	Køl/-20°C	Ingen angivelse af opdrætsmetode	Det Nordøstlige Atlanterhav
Friske blåmuslinger	SydFyns Linemuslinger Aps/Nordshell	Køl	Afhentes "urensset" friske opbevaret på køl	Lineproduceret/ Sydfyn

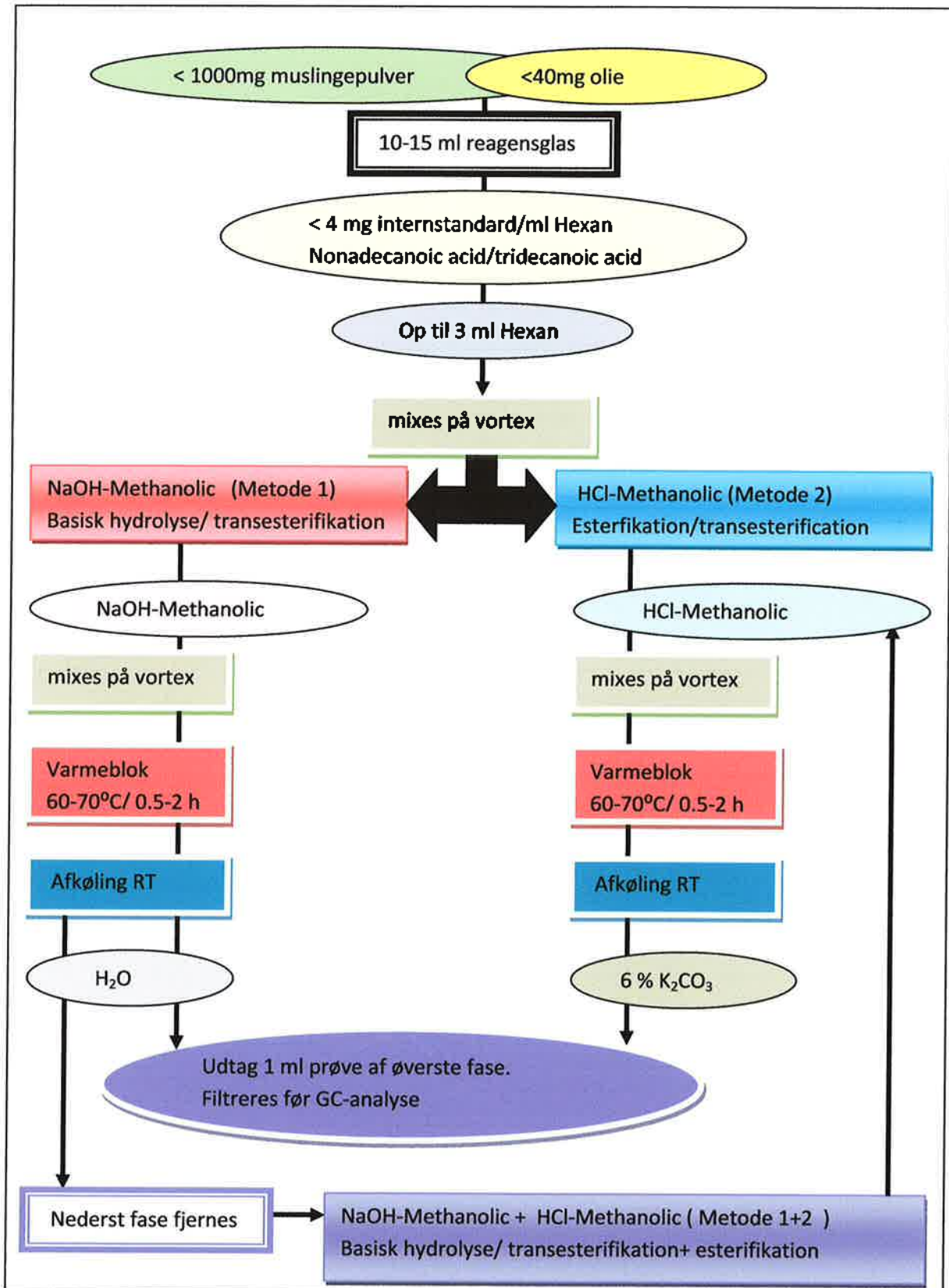
Tabel 12. Muslinger indhentet til analyse. ¹⁾ Grønblå og blåmuslinger indkøbt i detailbutik blev efterfølgende opbevaret ved -20°C indtil anvendelse.

Metodeplan for prøvebehandling



Figur 22. Metodeplan for prøveforberedelse til FAME-fremstilling.

Metodeplan for FAME-fremstilling ved esterificering/transesterificering



Figur 23. Metodeplan for FAME-fremstilling ved esterificering/transesterificering.

Indledende forsøg

Der blev i forbindelse med opstart af de eksperimentelle forsøg til bestemmelse af fedtsyrer i marine olier og muslinger indledt med planlægning af en uges(uge50/2008) laboratoriarbejde med vægt på afprøvning af metoder og udstyr, samt diverse prøveforsøg. Der blev udarbejdet indledende forsøgsplaner med vægt på nedenstående punkter

GC-parameter

- Blindprøver
- Internstandard
- Temperaturremper
- Referencestandarder

FAME-metode

- HCl-methanol
- NaOH-methanol
- NaOH-methanol+ HCl-methanol

Analyse af prøver

- Marine-olier
- Muslingeprøver

Håndtering af muslinger

- Sortering i størrelse
- Våd- og tørvægtbestemmelse

Frysetørring

- Afprøvning af udstyr
- Frysetørring af muslinger

Der henvises til afsnit "Kemikalier, materialer og prøver", samt protokoller med metodevejledninger i bilag IV. For oversigt af GC-analyser og dertilhørende resultater henvises til bilag VI. Det skal bemærkes at resultater fra GC-analyser ikke indeholder den totale mængde rådata, men udvalgte værdier (RT/%Areal) blev indtastet manuelt fra papir udprint. Det var ikke muligt efterfølgende at genfinde samtlige rådata til overførsel i excel, grundet mellemliggende opdatering af anvendte GC-program. Da resultaterne primært blev anvendt til vurdering af indledende forsøg vægtes dette ikke at være af større betydning. Alle beregninger er derfor foretaget ved areal % metoden, se Appendix A. Statistiske beregninger er udført i excel for middelværdi, standardafvigelse og relativ standardafvigelse(%CV), se Appendix C for statistiske metoder.

Forsøgsplaner og resultater

GC-analyse

Der henvises til bilag VI, 1.prøveoversigt og dertilhørende tabeller.

Blindprøver blev målt ved start og slut, samt ca. mellem hver 10'ende prøvekørsel for løbende kontrol af stabil basislinie. Der blev anvendt blindprøve tilsvarende solventer anvendt til prøver og referencestandarder. Der ønskes anvendt Hexan til prøver, hvor Methylenchlorid(MeCl) og Heptan indgår i referencer (se afsnit "Kemikalier, materialer og prøver"). Der blev som det første ved opstart af GC-analyse målt på Hexan til RT: 1.84 og MeCl* til RT:2.08.

Ved **internstandard**(C19:0 ester, Methyl nonadecanoate) i hhv. Hexan og MeCl blev målt til RT:11.3, uafhængig af opløsningsmiddel og koncentration. Dog var der ikke overensstemmelse mellem koncentration(10-50 mg/ml) og opløsningsmiddel for fundne % Areal. Dette kan muligvis forklares i den valgte internstandards opløselighed i henhold til polaritet af de to anvendte solventer. C19-ester opløses lettere ved højere koncentrationer i MeCl end i den lidt mere upolære Hexan.

Der blev valgt referencestandard, Supelco®37 Component FAME Mix, til **optimering af GC-kørsel** angående temperaturramper og parameter valg. Metoder blev afprøvet ud fra værdier anbefalet fra fabrikanten af referencestandard(Sigma-Aldrich/kolonne SP2560, se bilag III) samt fabrikanten af valgte kolonne DB-23(Agilent Technologies, se bilag IV protokol E).

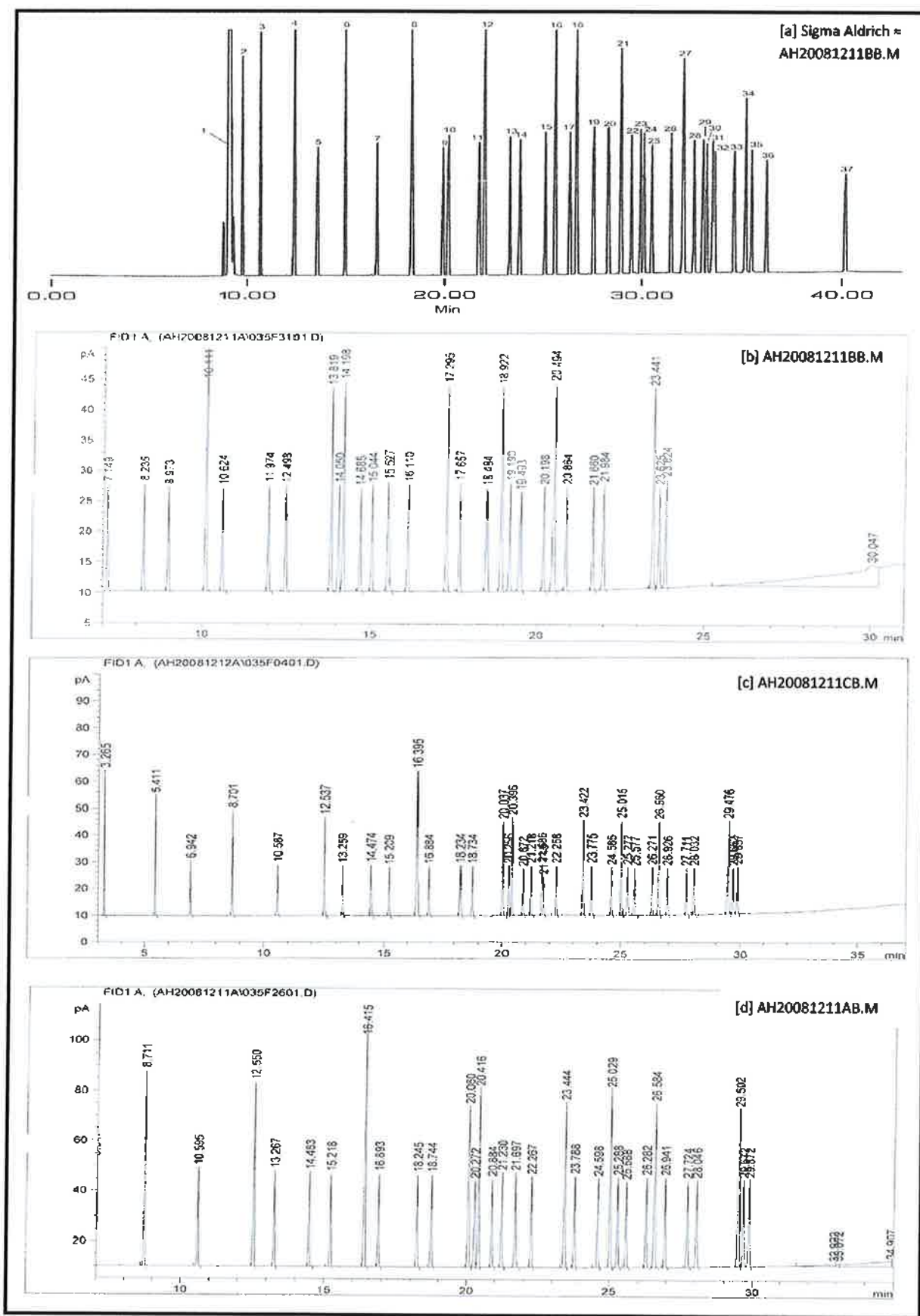
For valgte GC-metoder med tilhørende kromtogrammer, se tabel 13 samt figur 24A og 24B.

I Figur 24A ses øverst referencekromatogram[a] fra Sigma-Aldrich/kolonne SP2560, med tilsvarende parameter sat ved metode AH20081211.BB.M, kromatogram [b]. Kromatogram [c] starter rampe ved lavere temperatur end [b] og efterfølgende ved kromatogram [d] er slit ration sat op. Der opnås god opløselighed mellem toppene for alle kromatogrammer, dog ses drift af basislinien sidst i forløbet. Dette kan måske ligge i kolonnevalget, DB-23, som adskiller sig fra kolonne, SP2560 anvendt ved referencekromatogram[a]. Se afsnit "GC-analyse af FAME" for kolonnematerialer.

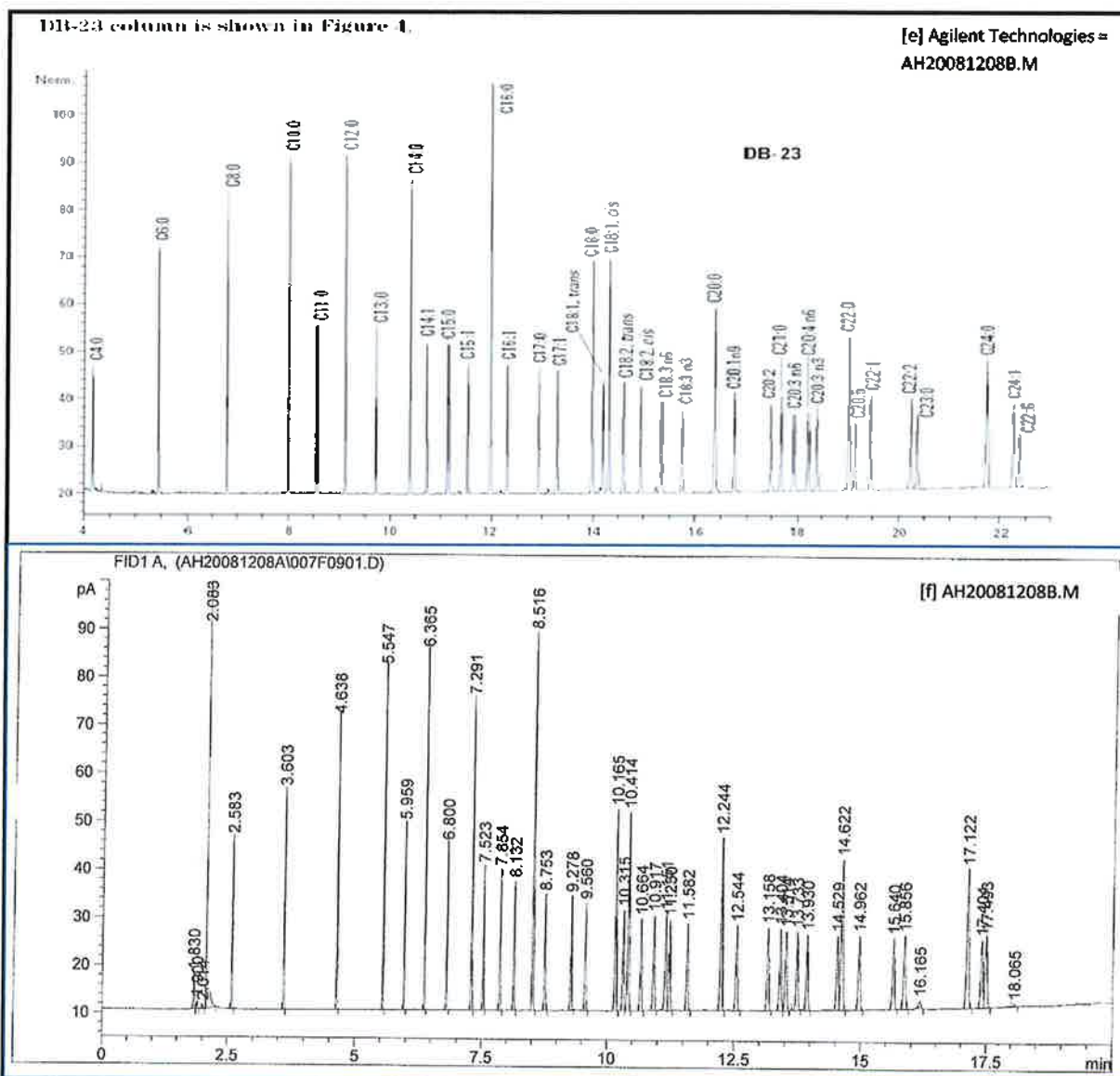
I figur 25B ses kromatogram [f] metode AH20081208.B.M, tilsvarende referencekromatogram[e] fra Agilent Technologies/ kolonne DB-23. Her ses god opløselighed mellem toppene og næsten identiske kromatogramme for god identifikation ved kvalitativ bestemmelse. Ud fra visuel vurdering blev der valgt at køre alle GC-analyser med metode AH20081208.A.M(Hexan) og AH20081208.B.M(MeCl) tilsvarende anbefalet fra Agilent Technologies/ kolonne DB-23. Se bilag V.

Ud over ovenstående referencestandard blev der målt på to opløsninger af PUFA No.3(from menhaden oil) af 21.2mg/ml MeCl og 46.0mg/ml Hexan. Solventer blev valgt jf. de selv samme anvendt ved øvrige referencestandarder og prøver. Der blev målt på begge prøver lige efter fremstilling samt efter 4 dage med henblik på holdbarheden og evt. indikering for ændringer i FAME sammensætning af kendt standard. Der blev ikke tilsat nogen former for antioxidater*.

Kromatogrammer viste ingen umiddelbar forskelle mellem anvendte solventer målt lige efter fremstilling. Måling efter 4 dage pegede på ændring i kromatogrammer, ekstra toppe sås først og fremmest i området RT: 8 til 10min, svarende til fedtsyrer af kædelængde C16 til C18 (jf. referencekromatogram[e], figur 24B). Dette kunne indikere oxidation af umættede forbindelser medførende færre dobbeltbindinger, givende kortere elueringsstid. Se figur 25.



Figur 24A. Referenkromatogram [a] er Supelco® 37 Component FAME Mix fra Sigma Aldrich med kolonne SP2560, [b], [c] og [d] er kromatogrammer kørt på kolonne SB-23 med valgte metoder jf. tabel 13.



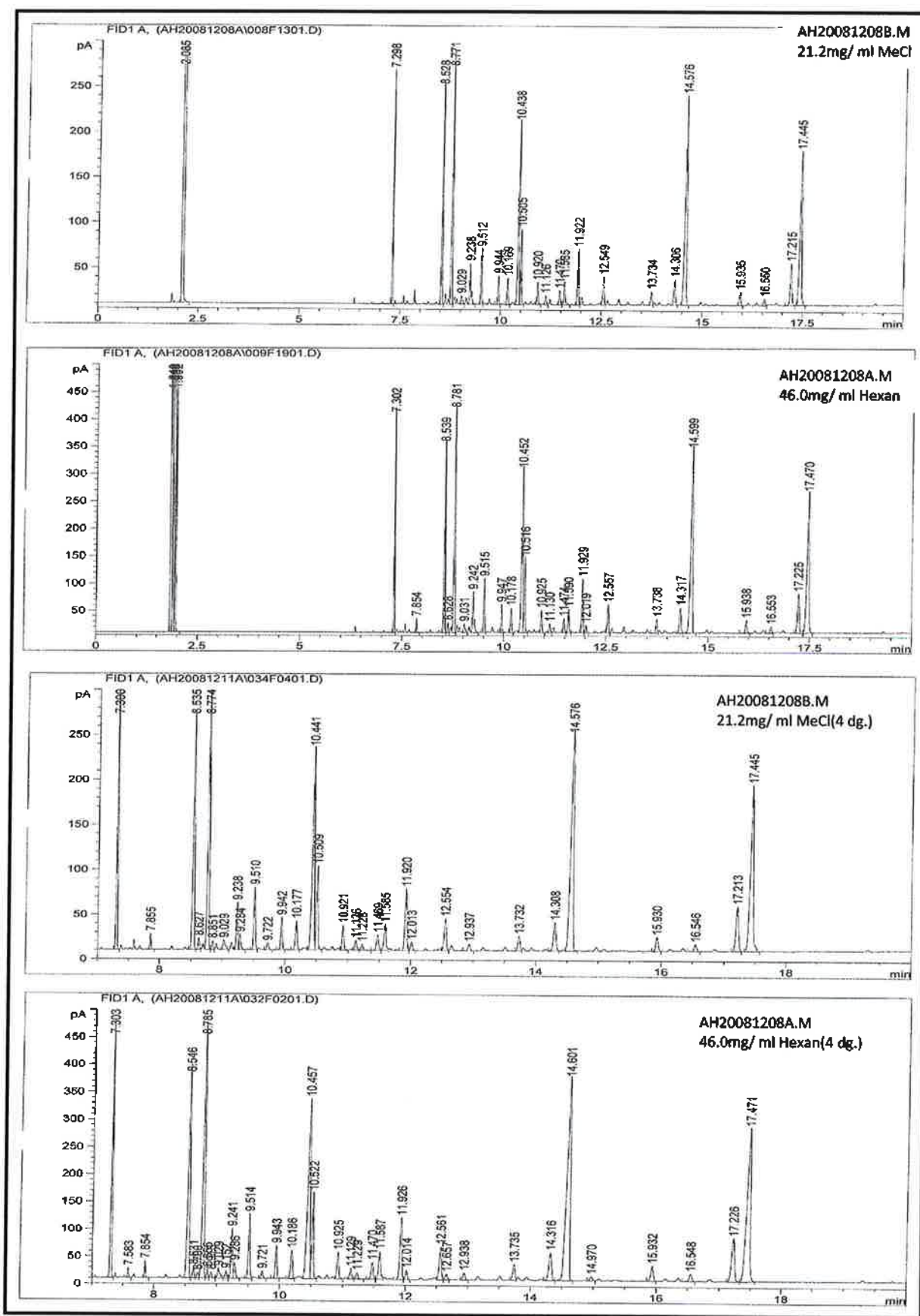
Figur 24B. Referenkromatogram [e] fra Agilent Technologies på kolonne SB-23 af Supelco®37 Component FAME Mix sammenholdt kromatogram [f] med identiske parametre og kolonne, jf. tabel 13

Metode navn	Initialt ovn temp./time	Rampe ovn	Detektor temp	Slit ratio	Solvent Washes
20081208A.M	50°C/1 min	25°C/min til 175°C, 1 min 4°C/min til 230°C, 5 min	280°C	50:1	Hexan
20081208B.M ¹⁾	50°C/1 min	25°C/min til 175°C, 1 min 4°C/min til 230°C, 5 min	280°C	50:1	Methylenchlorid
20081211A.M	100°C/1min	4°C/min til 240°C, 1 min	250°C	25:1	Hexan
20081211AB.M	100°C/1min	4°C/min til 240°C, 1 min	250°C	25:1	Methylenchlorid
20081211B.M	140°C/5min	4°C/min til 240°C, 1 min	250°C	50:1	Hexan
20081211BB.M ²⁾	140°C/5min	4°C/min til 240°C, 1 min	250°C	50:1	Methylenchlorid
20081211C.M	100°C/1min	4°C/min til 240°C, 1 min	250°C	50:1	Hexan
20081211CB.M	100°C/1min	4°C/min til 240°C, 1 min	250°C	50:1	Methylenchlorid

Tabel 13. Oversigt af opsatte metoder med tilhørende temperaturer, slit ration og solvent.

¹⁾ Metode tilsvarende Agilent Technologies/kolonne SB-23

²⁾ Metode tilsvarende Sigma Aldrich med kolonne SP2560

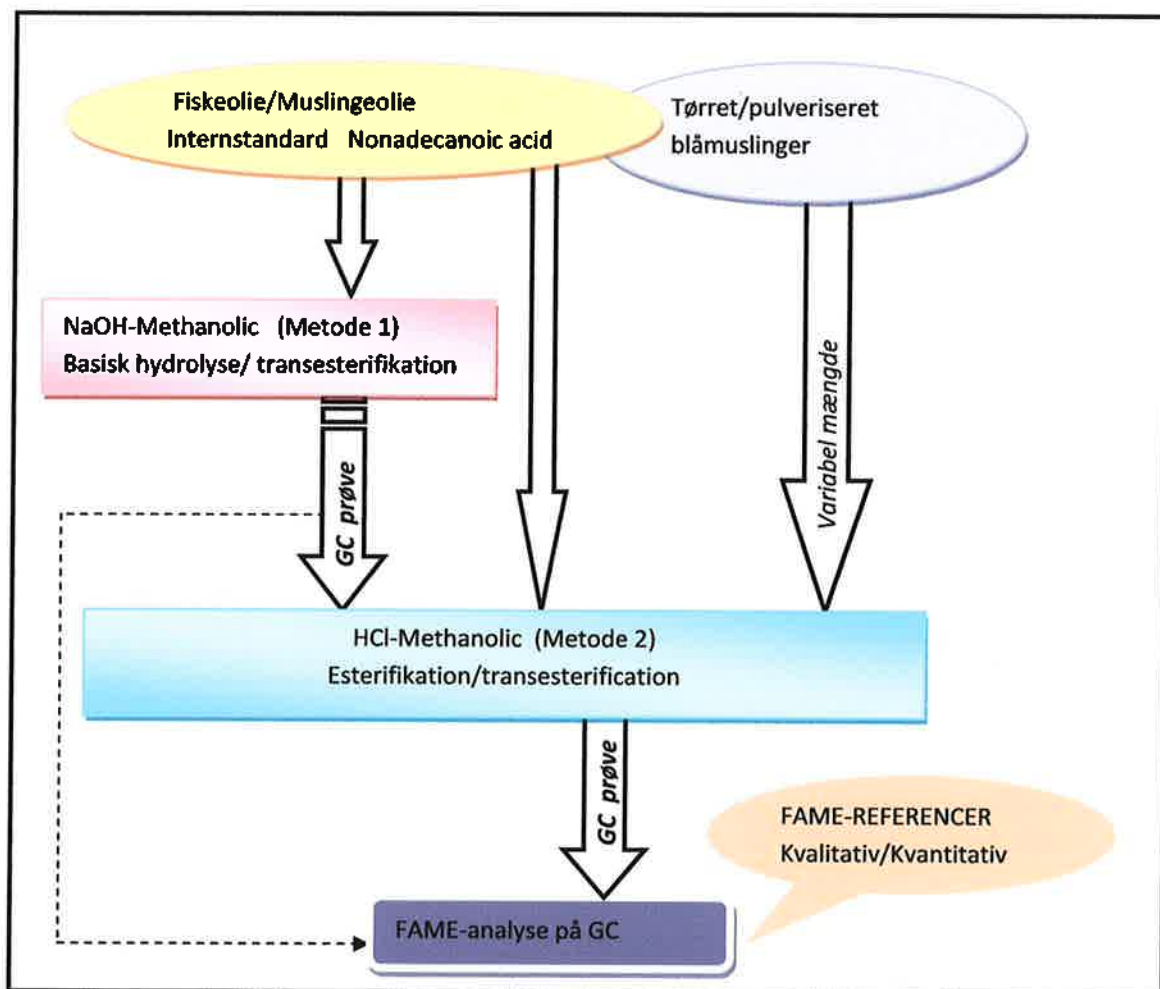


Figur 25. Kromatogram af PUFA No.3 (from menhaden oil) opløst i hhv MeCl og Hexan målt lige efter fremstilling samt efter henstand i 4 dg ved stuetemperatur.

FAME-metode og test af prøver

Der henvises til Bilag VI, 2.prøveoversigt og dertilhørende tabeller.

Der blev udarbejdet forsøgsplan, se figur 26, for test og vurdering af to udvalgte methyleringsreagenser med hver tilhørende teori for hydrolyse/saponifikation, transesterificering og esterificering (se afsnit "Fedtsyrestemmelse i muslinger og marine olier" for bagvedliggende teori). Der tilsigtes afprøvning af sur- og basisk-reagens af hhv. HCl-methanol og NaOH-methanol, både hver for sig og kombineret.



Figur 26. Forsøgsplan for FAME-metode på marine olier og tørret muslinge pulver. Der henvises til vejledninger i protokol for Metode 1 og Metode 2. Se bilag IV protokol D.

Der blev målt på 4 udvalgte olieprøver testet ved metode 1, 2 og 1+2, samt på tørret blåmuslinger ved metode 1. Til samtlige prøver og referencer blev tilsat 4 mg C19-syre (Nonadecanoic acid) som internstandard, med undtagelse af blind. Ud fra referencestandard Supelco®37 Component FAME Mix og PUFA No.3 (from menhaden oil) blev bestemt RT for relevante fedtsyrer. Samtlige prøver analyseret på GC foregik ved valgte metode; AH20081208A.M.

Ved vurdering af de to methyleringsmetoder, fås i overensstemmelse med teorien at der ingen transesterificering sker af FFA* ved anvendelse af basisk-reagens, men disse kan esterificeres ved en sur-reagens.

GC-resultaterne af methyleret internstandard C19 (ses Bilag VI, tabel 2a-c ved RT 11.16) viser sig efter metode 2 og metode 1+2, men ikke metode 1. En enkelt prøve afviger ved metode 1, A1(Tobis fiskeolie), med top for C19, dette grundet tilsat 2 mg C19-ester før start og er derefter ikke indikation af methyleret C19-syre.

For samtlige olieprøver og muslingeprøver blev bestemt gennemsnit og spredning af areal % for C19-syre for hhv. metode 2 og 1+2.

Metode 2: $x=0.19$, $s=0.01$, $CV=5.3\%$ **Metode 1+2:** $x=0.24$, $s=0.04$, $CV=16.5\%$

Metode 2 udviser bedst repeterbarhed, jf. metode 1+2 der resulterede med højere middelværdi. Det bør bemærkes at der under denne procedure ved metode 1+2 blev udtaget 1 ml til GC-analyse i trin mellem metode 1 og 2, se figur 26, medførende koncentrationsændringer i slutproduktet.

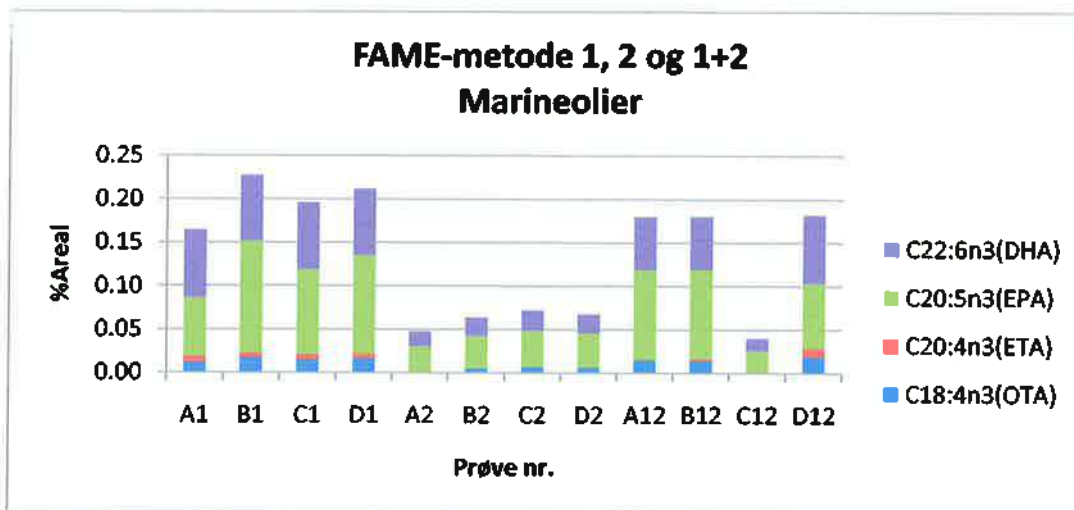
Test af prøver

Der ønskes testet de tre metoders anvendelighed til fedtsyrebestemmelse i marine olieprøver. For hver olieprøve sammenholdes relative % arealfordeling ved udvalgte relevante fedtsyrer, tilsvarende indhold angivet i varedeklaration. Se tabel 14 og figur 27.

Prøve nr	A	B	C	D
% Indhold	TOBIS Omega 3	Fiskeoliekapsler	Muslingeolie	Menhaden oil
C18:4n3(OTA*)	0	0	1.22	3.66
C20:4n3(ETA*)	0	0	0.11	0
C20:5n3(EPA*)	8.9	18	3.3	13.3
C22:6n3(DHA*)	9.6	12	2.7	11.96

Tabel 14. % indhold af forskellige omega 3 fedtsyrer jf. varedeklaration, se bilag II. For prøve nr. henvises til 2.prøveoversigt i bilag VI.

Det er valgt ikke at beregne koncentration ved internstandardmetode af areal % grundet usikkerhed vedrørende prøveudtagning under metode 1+2, samt manglende data for internstandard ved metode 1. Trods ønsket om test ved enkeltbestemmelse af de tre metoder gav resultaterne et overordnet pæn billede i overensstemmelse med tilsvarende teorier. Sammenligning af fedtsyresammensætning i prøverne ud fra areal % antages med forbehold som et estimat. Der ses relative højere indhold af fedtsyrer ved metode 1(TAG* → FAME*) og metode 1+2 (TAG* → FFA → FAME), i forhold til metode 2(FFA → FAME).

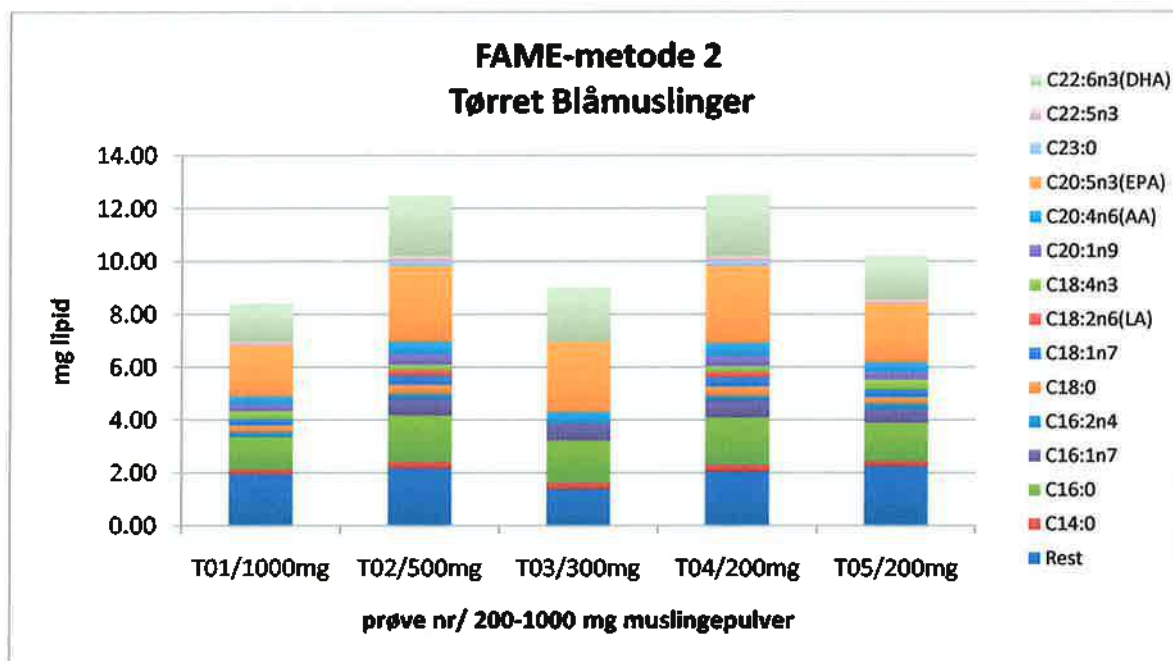


Figur 27. % Areal af relevante fedtsyrer i marine olier
Prøve nr. er angivet ved bogstav for prøven, se tabel 14, efterfølgende nummer for metode 1, 2 og 1+2.

Der ønskes testet for anvendt mængde tørret muslingepulver ved de tre metoder ud fra muslinger i størrelsen 4-5 cm. Der var på daværende tidspunkt planlagt opstart af frysetørring til frysetørring af muslinger. Grundet opstartsproblemer af frysetørring blev der i stedet valgt at tørre muslingerne i i varmeskab ved 105°C (fra tørstofbestemmelse) og herefter pulveriseret i morter. Dette med forbehold for evt. degradering af lipider/fedtsyrer efter udsættelse ved knap så skånsom tørring end den anvendt ved frysetørring. Der blev yderligere valgt at begrænse methylering til metode 2 og udeladt metode 1 og 1+2 ud fra planlægning af GC-kørsler inden for afsatte tidsramme.

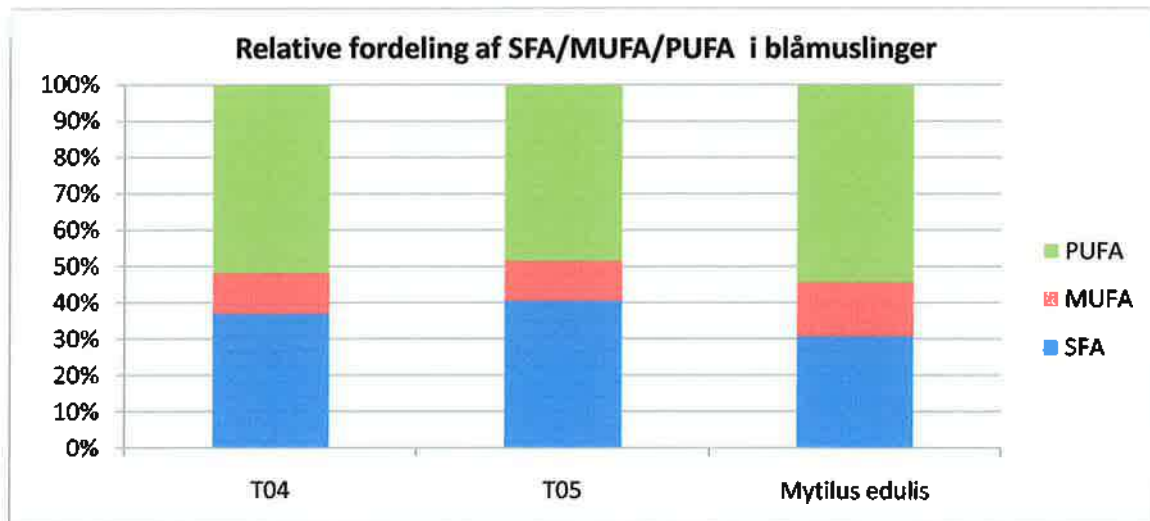
Ud fra samtlige muslingeprøver, methyleret ved metode 2, blev den relative fordeling af fedtsyrer beregnet ved internstandardmetode af areal %, uden korrektion for responsfaktor. Dette gav med forbehold et estimat af fedtsyresammensætning i prøverne ud fra samlede lipidindhold. Se figur 28. Der ses ingen umiddelbar sammenhæng mellem mængde muslingepulver og mængde lipid. Der genfindes ca. samme mængde total lipid indhold uafhængig af mængde muslingepulver, hvilket kunne indikere for store mængder afvejet prøve, i forhold til mængde methyleringsreagent. Et anslået estimat jf. teorien; muslinger indeholder ca. 2 % lipid i vådvægt, med en tørvægt omkring < 20 %, svarende til ca. 10 lipid/100mg tørrede muslingepulver. Her blev genfundet op til 6 mg lipid/100 mg prøve med forbehold for anvendte beregningsmetode og tørringsproces.

Trods ringe genfundne total lipid ses der en vis genkendelighed prøverne i mellem for den relative fordeling af de enkelte komponenter fedtsyrer angivende højt indhold af EPA og DHA.



Figur 28. % Areal af identificerede fedtsyrer ved prøve med variabel mængde muslingepulver
Prøve nr. angiver bogstav for prøve, se 3.prøveoversigt i bilag VI.

De respektive fedtsyrer inddeles i grupper af mættede(SFA*), mono-(MUFA*) og flerumættede(PUFA*) til sammenligning af lignende værdier fundet jf. litteratur[A17; MCLEAN & BULLING,2005]. Se figur 29. Dette samlingsgrundlag skal dog tages med anselige forbehold mht. flere variabel faktorer som f.eks anvendte metode(sur methylering af FFA), prøvebehandling (tørret v. 105°C), begrænset antal bestemmelse (kun dobbeltbestemmelse ved 200mg prøve), samt beregningsmetode (usikkerhed ved internstandardmetode ved areal %). Trods disse forbehold, indikerer resultaterne et potentiel alternativ for FAME-fremstilling ved anvendelse af hurtig metode OSM* til bestemmelse af fedtsyre i muslinger uden forudgående lipidoprensning.



Figur 29. Relativ fordeling af SFA/MUFA/PUFA bestemt ved 200mg tørret blåmuslingepulver jf. undersøgelsen af blåmuslinger i New Zealand [A17; MCLEAN & BULLING,2005],[A18; K. Y. CHAN et al. 2004].

Håndtering af muslinger

Muslinger blev rensset, sorteret, bestemt vådvægt og tørstof samme dag som de blev afhentet ved SydFyns linemuslinger. Der var normalfordeling i størrelsesintervaller af 1 cm. Resultater fra sortering i størrelser samt vådvægt og tørstofbestemmelse, fra denne forsøgsrunde (uge 50 /2008) er samlet ved resultater fra næste forsøgsrunde(uge 6/2009). Tabel 21 og 22, samt figur 39.

Konklusion

Ud fra indledende forsøgsrunde blev følgende vurderinger taget

- Ud fra visuel vurdering blev der valgt at køre alle GC-analyser med valgte parameter ved metode AH20081208.A.M(ved Hexan) og AH20081208.B.M(MeCl).
- Sammenligning af fedtsyrer i prøverne ud fra areal % antages med forbehold som et estimat. Responsfaktor fra valgt da korrektioner er af mindre betydning for kædelængder mellem C14-24.[17;p.111-114]
- Internstandard C19-ester viste ikke overensstemmelse mellem koncentration(10-50 mg/ml) og % Areal. Dette kunne måske være bevirket af for høje koncentrationer. Der ønskes undersøgt linearitet af internstandard indenfor anvendte måleområde af prøver.
- Uden tilsætning af antioxidater vil der muligt kunne ske oxidation af fedtsyrer. Der vægtes at udelade tilsætning af antioxidater såfremt prøver og standarder bliver målt hurtigst muligt efter fremstilling(max 12 timer).
- Jf. teori ses ingen transesterificering af FFA*(≈C19-syre) ved anvendelse af basisk-reagens, men FFA vil esterificeres med sur-reagens. Der ses relative højere indhold af fedtsyrer ved metode1(TAG→FAME) og metode 1+2 (TAG*→FFA → FAME), i forhold til metode 2(FFA*→ FAME*).
- Grundet opstartsproblemer af frysertørring blev valgt at tørre muslinger i varmeskab 105°C. Der planlægges efterfølgende afprøvning af frysetørring med homogeniserede muslinger.
- Der konkluderes ud fra resultater af den indledende forsøgsrunde et potentiale for anvendelse af hurtig metode OSM* til bestemmelse af fedtsyre i muslinger med de forbehold det kunne indebære.

Forsøgsrunde til bestemmelse af fedtsyre i muslinger og marine olier

Efter de indledende forsøg i uge 50/2008 og efterfølgende afprøvning og test af frysetørreren med virkningsfuld metode til frysetørring af homogeniserede muslinger, udarbejdes forsøgsplaner til uge 6/2009. Der ønskes at se nærmere på nedenstående punkter med de begrænsninger der måtte ligge inden for projektets praktiske tidsramme.

- Kalibreringskurver af internstandard
- Referencestandarder
- Optimering af metode 2
- Afprøvning af metode 1+2
- Valg af internstandard
- Bestemme fedtsyrer i valgte olieprøver
- Bestemme fedtsyrer i valgte muslingeprøver
- Størrelsessortering af muslinger, våd- og tørvægtbestemmelse

Der henvises til afsnit "Kemikalier, materialer og prøver", samt protokoller med metodevejledninger i Bilag IV. For oversigt af GC-analyser og dertilhørende rådata henvises til bilag VII og bilag VIII for resultater og udvalgte kromatogrammer. Ud fra indledende forsøg blev valgt faste parameter for GC jf. metoder i bilag V. Beregninger vedrørende kvalitativ og kvantitativ bestemmelse henvises til Appendix A og for statistiske beregninger henvises til Appendix C. Vedrørende frysetørring af muslinger er udarbejdet protokol, se bilag IV protokol C, for grundlæggende frysetørringsteorier og metoder henvises til Appendix B

1.forsøgsplan

Afklare linearitet indenfor benyttet måleområde for internstandard ved anvendte opløsningsmiddel til hhv. prøver(Hexan) og standarder(MeCl*). Der blev udvalgt to internstandarder.

Kalibreringskurver af internstandard C19-ester (methyl nonadecanoate) i område 0-25mg/ml og C13-ester (methyl tridecanonate) i område 0-10mg/ml hhv. opløst i enten Hexan eller MeCl(Methylenchlorid). Der blev valgt enkelt bestemmelse.

2.forsøgsplan

GC-kørsel af på forhånd udvalgt relevante referencestandarder til kvalitativ og kvantitativ fedtsyrebestemmelse i prøver af olier og muslinger.

3.forsøgsplan

Afklare optimal anvendte mængde HCl-Methanol og reaktionstid. Effekten af esterificering af C19-syre (Nonadecanoic acid) ved anvendelse af metode 2 med 2-4 ml HCl-Methanol (Methanolic HCl, 3 N) efter 0,5 og 2 h ved 70^o C. C19-ester (Methyl nonadecanoate) anvendes som reference. Der blev valgt dobbeltbestemmelse.

4.forsøgsplan

Forforsøg med afprøvning af valgte metode 1+2 på hhv. marine olie og frysetørret blåmusling, samt referencer ved metode 2 og metode1+2. Samtidig ses på valg af internstandard. Metode 1+2 afprøves på referencestandard(Menhaden fish oil) og frysetørret blåmuslinger i forskellige mængder. Der blev valgt internstandarder C19-syre (Nonadecanoic acid) og C13-syre(tridecanoic acid). Der blev valgt dobbeltbestemmelse.

5.forsøgsplan

Fedtsyrebestemmelse i marine olier. Der blev udvalgt 9 olier til tripelbestemmelse ved metode 1+2. Ud fra resultater efter 3. og 4.forsøgsplan afgøres valg af mængder og tid anvendt til metode 1+2, deslige valg af internstandard.

6.forsøgsplan

Fedtsyrebestemmelse af frysetørret muslinger ved metode 1+2 jf. anvendte ved 5.forsøgsplan. Prøver; blåmuslinger(friske) fra Sydfyns Linemuslinger sorteret efter størrelse, konsum blåmuslinger(frosne) fra Vilsund og konsum grønblæbede muslinger(blancherede/frosne) fra Nordic Seafood. Der blev valgt tripelbestemmelse for hhv. prøver af 100 og 200 mg. Internstandard blev valgt jf. 5.forsøgsplan.

Resultater

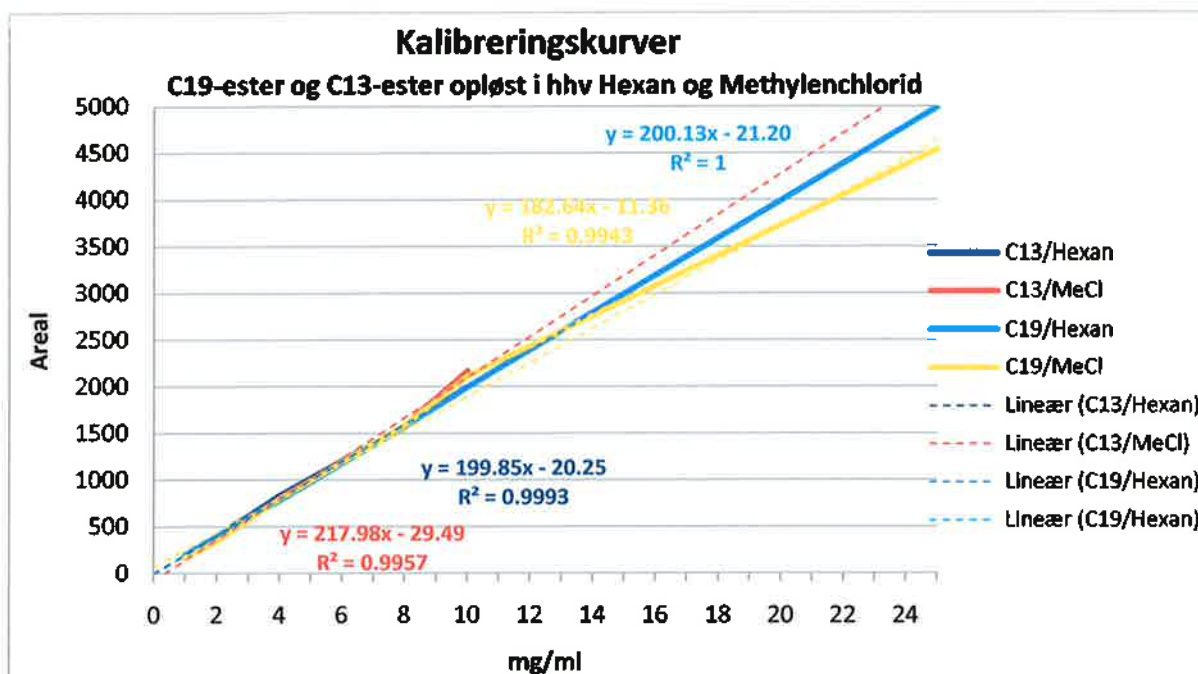
Kalibreringskurver for internstandarder

Der fås følgende **retentionstider** for Hexan(Blind A) RT: 1,65, MeCl(Blind B) RT:1.89, C19-ester(4mg/ml)RT:12.81 og C13-ester(4mg/ml)RT:7.55. Det blev bemærket at retentionstiderne var ændret/øget en anelse fra foregående GC-kørsel i uge50/2008.

Der var i den mellemliggende periode foretaget kolonne skift og GC parameter i forbindelse med opsætning til andre studieforsøg. En efterfølgende øgede retentionstid kan afledes ved ændringer i parameteren, som gasflow og temperatur, men også fra kolonnes almene tilstand. Der blev opsat selv samme parameter som anvendt ved sidste forsøgsrunde, men en af- og påmontering af kolonnen kunne påvirke ændringer i retentionstider. Dette havde ingen betydning for kvalitativ bestemmelse, kørt ved samme kolonne tilstand og parameter, ud fra denne forsøgsrundes kørsler af referencestandarder.

For begge internstandarder, uanset anvendt solvent, øges elueringstiden(retentionstiden) en gran ved stigende koncentration. Der ses udpræget **leading** ved C19-ester, både opløst i Hexan og MeCl (asymmetrifaktor <0.7), men knap så fremtrædende for C13-ester (asymmetrifaktor 0.7-1.0) . Leading er mest udpræget ved høje koncentrationer i MeCl og kunne bero på overbelastning af kolonnen ved for store prøvemængder. Se bilag VIII, figur 1 og 2a-d for kromatogrammer.

Der blev foretaget **lineær regression** på alle fire kalibreringsrækker og fundet tilfredsstillende linearitet for C19-ester og C13-ester i hhv. Hexan og MeCl(korrelationsfaktor $R \approx 1$). Se figur 30. Med beskedne forskelle ses bedste resultater for C19-ester i Hexan, dette til trods for den udprægede leading. Ringeste korrelationsfaktor findes for C19-ester i MeCl, men kan lige såvel ligge i måleusikkerhed ved fremstilling af enkeltstående kalibreringsrække. For yderligere afklaring kan der anbefales udførsel af tredobbelbestemmelse for hver kalibreringsrække, evt. i område af lavere koncentrationer.



Figur 30. Kalibreringskurver med tilhørende lineær regression for internstandard C19-ester(methyl nonadecanoate) i område 0-25mg/ml og C13-ester(methyltridecanonate) i område 0-10mg/ml, hhv. opløst i Hexan eller MeCl(Metylenchlorid).

Referencestandarder

Der blev målt på 5 udvalgte enkeltstående standarder (10mg/ml Heptan), samt referencestandard Supelco®37 Component FAME Mix(10mg/ml MeCl) og PUFA No.1 (50mg/ml Hexan)for retentiontider og koncentrationer, se bilag VIII figur 3a-c for kromatogrammer. Retentionstider og areal blev aflæst for relevante fedtsyre, jf. tabel 15, anvendt til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse. Der blev antaget god repeterbarhed(max. 0.5 %CV) ved fundne retentionstider for selv samme komponent indeværende i to/tre forskellige standarder.

Prøve	Supelco®37 Component FAME			Single- standard			PUFA No.1
	Komponent ¹⁾	RT	Konc/mg	Areal ²⁾	RT	Konc/mg	
C16:0		9.64	0.6	123			9.70
C18:0		11.60	0.4	85			11.68
C18:1n9c(OA)		11.90	0.4	85(2125)	11.99	10	2281
C18:2n6c(LA)		12.48	0.2	43(2150)	12.58	10	2272
C18:3n6(GLA)		12.85	0.2	42			
C18:3n3(ALA)		13.25	0.2	41			
C18:4n3(STD)							13.67
C20:3n6(DGLA)		15.45	0.2				
C20:4n6(AA)		15.71	0.2	43(2150)	15.81	10	1610
C20:4n3(ETA)							16.37
C20:5n3(EPA) ³⁾		16.65	0.2	133(6650/2217 ³⁾)	16.71	10	2146
C22:5n3(DPA)							19.62
C22:6n3(DHA) ⁴⁾		19.79	0.2	97(4850/2425 ⁴⁾)	19.91	10	2127

Tabel 15 ¹⁾Forkortelser i parentes forefindes i ordliste. ²⁾Areal i parentes tilsvare areal 10mg/ml single-standard ³⁾ 0.4mg C22:0 indgår i samme top. ⁴⁾ 0.2mg C24:1 indgår i samme top.

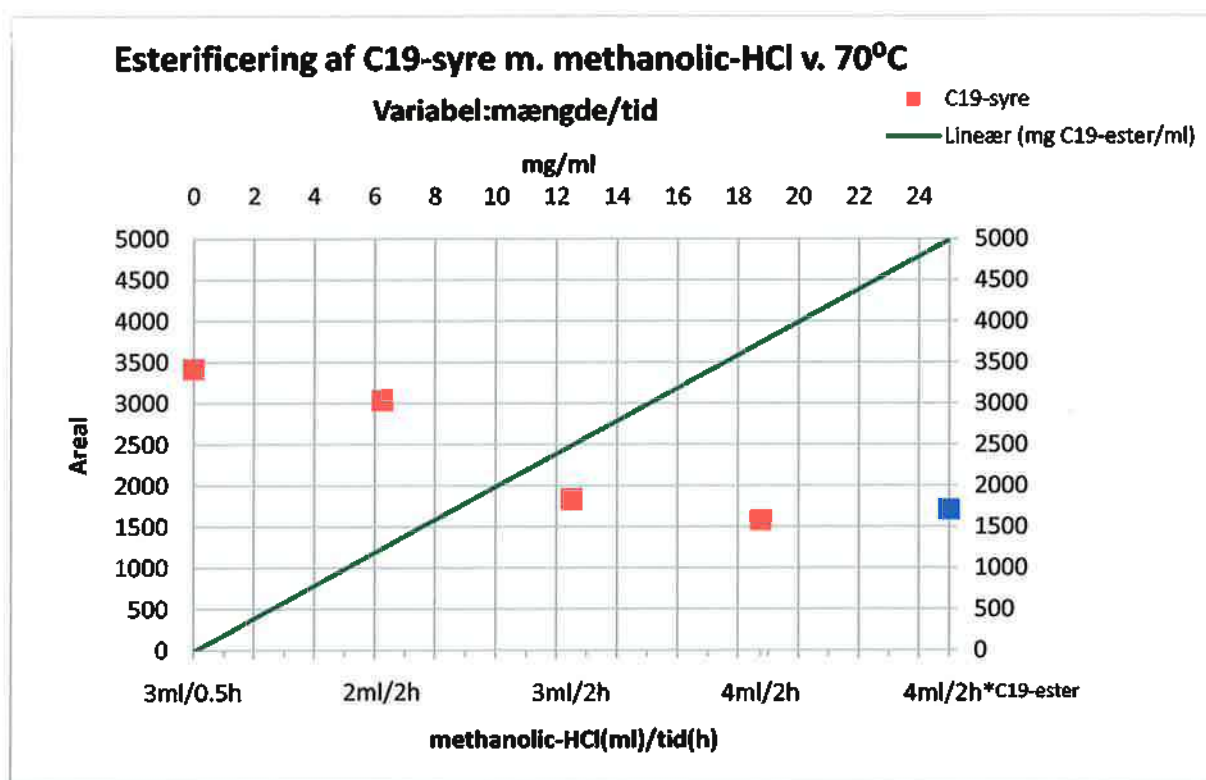
Optimering af metode 2

Der blev konkluderet misvisende resultater fra dette forsøg, grundet afdampning af solventer under opvarmning ved 70°C (≈ kogepkt for Hexan og Methanol). En afdampning af solventer burde i sig selv medføre øget koncentration af C19-ester, dette strider mod forsøgsresultater. Her viste sig faldende værdier ved øget tid og mængde HCl-methanol. Se figur 31.

Mulige årsager blev bla. vurderet

- Ringe esterificering grundet hydrolyse og manglende fjernelse af vand
- Afdampning sket pgra. for løst påsat låg
- Degradering af C19-syre og manglende esterificering
- "Medrivning" af C19-syre og C19-ester under afdampningen
- For lidt tilsat K_2CO_3 til neutralisering af øget mængde HCl-methanol
- Dårlig faseadskillelse for tilsatte mængde mellem Hexan og methanol/vand
- Afdampning af HCl-methanol medførende ringe esterificering
- Ujævn temperatur i opvarmningsblok

Yderligere undersøgelser af temperatur/tid og mængde kan anbefales, men er udeladt inden for dette projekts tidsramme. Der blev vægtet fremover at anvende 3 ml HCl-methanol under opvarmning ved max. 70°C i 0.5h for optimal esterificering af FFA. Dette vurderes ud fra resultater, se figur 31 og bilag VII, samt jf. litteraturhenvisninger under afsnit "Metodevalg".



Figur 31. Primær x-akse viser måleværdier fra forsøg, sekundær x-akse angiver forhold mellem mg/ml og areal fundet ved kalibreringskurve for C19-ester i Hexan (jf. figur 30).

Afprøvning af metode 1+2 og metode 2 med to forskellige internstandarder

Valg af internstandard til kvantitativ bestemmelse

Ud fra erfaring af foregående forsøg blev der forsøgt at minimere fordampning af solventer under opvarmning i varmeblokken. Der blev lavet en estimeret sammenligning af samtlige resultater for indhold/arealbestemmelse af internstandard. Middelværdier blev beregnet inden for hver "kategori" af internstandard og mængde, se tabel 16. Sammenholdes topareal-værdier, dog med forbehold af stor spredning(20-30 % CV), ved metode 2 og metode 1+2, virker C19 mere stabil end C13 der under anvendelse af NaOH-methanol enten degraderes eller fordamper næste helt væk. C13-syre som internstandard vurderes umiddelbart som værende ikke egnet grundet meget lave værdier(topareal). C19-topareal benyttes til efterfølgende kvantitativ beregning af total lipid indhold i kendt olieprøve: Mehaden oil for hhv. 10, 20 og 40 mg. Alle beregninger angav værdier påfaldende under afvejet total mængde lipid (svarende til 70-85 % af reelle værdi). Se tabel 17.

Der vurderes at anvendte metode 1+2 til kvantitative bestemmelser for muslinger og marine olier ikke angiver umiddelbart troværdige resultater. En nærmere undersøgelse bør foretages af metoden for at anskueliggøre uoverensstemmelse mellem praktiske og målt værdier af lipid(ved internstandardmetoden). Yderligere undersøgelser blev udeladt inden for dette projekts mulige tidsramme. Efterfølgende vægtes kvalitative bestemmelser ud fra referencestandarder.

Prøve/Internstandard	4mg C19	2mg C19	4mg C13	2mg C13
Mehaden olie ¹⁾	197	72	12	6
FT blå musling ¹⁾	104	-	66	-
ref. NaOH-HCl-MeOH ¹⁾	232	114	12	13
ref. HCl-MeOH ²⁾	227	99	185	84
ref. Ester(kal.kurve)	260	130	240	120

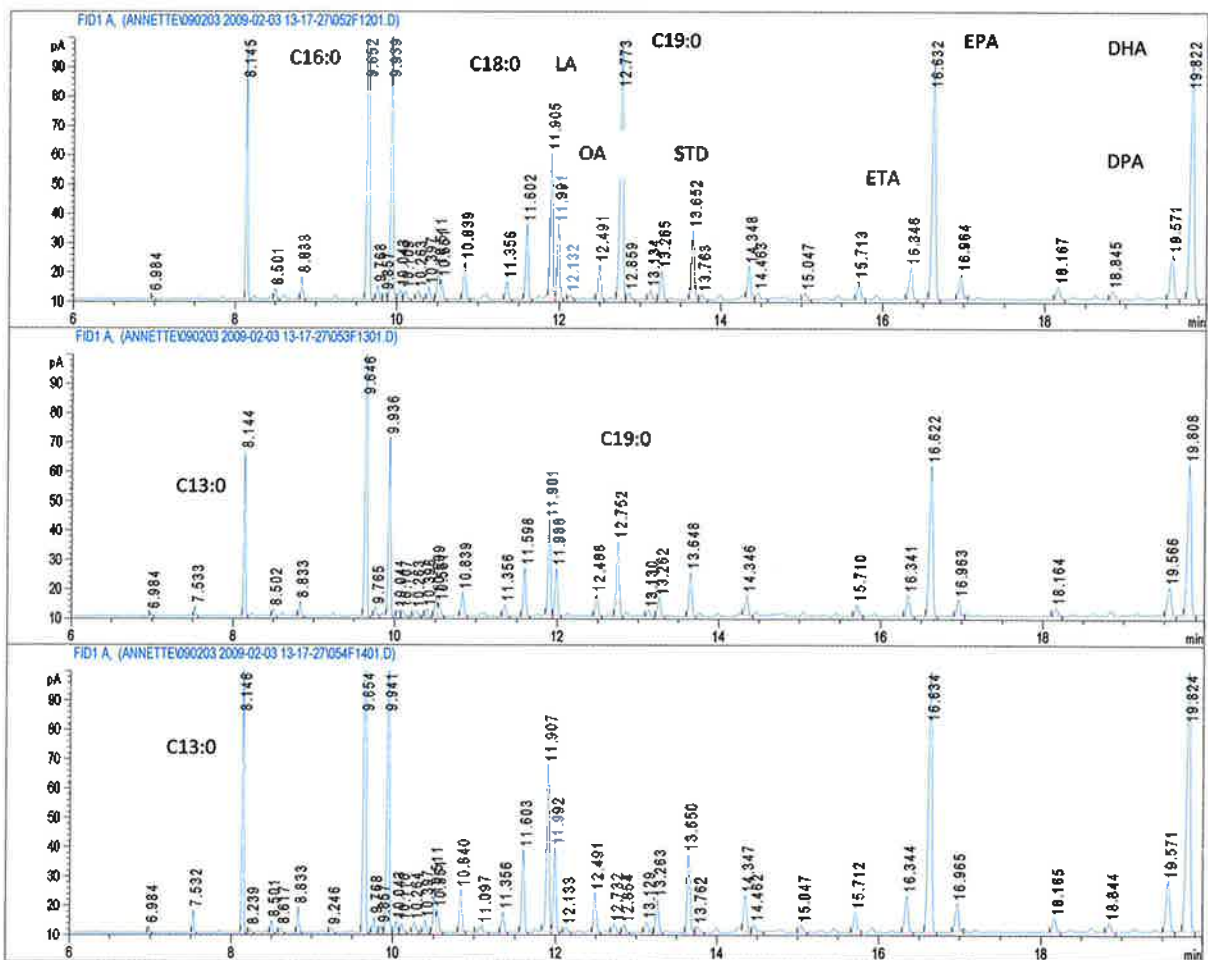
Tabel 16. Areal bestemmelser for C19-ester(RT:12.75) og C13-ester(RT:7.53) i samtlige prøver og referencer efter metode 1+2¹⁾ og metode 2²⁾ jf. arealer ved 2 og 4 mg/3ml(tilsat Hexan) fra kalibreringskurve, se figur 30.

Tilsat C19-syre mg	Beregnet mg lipid	Afvejet mg mehaden oil
4	8.7	10.31
2	8.4	10.31
4	15.7	20.62
2	16.7	20.62
4	30.0	43.12
2	34.6	43.12

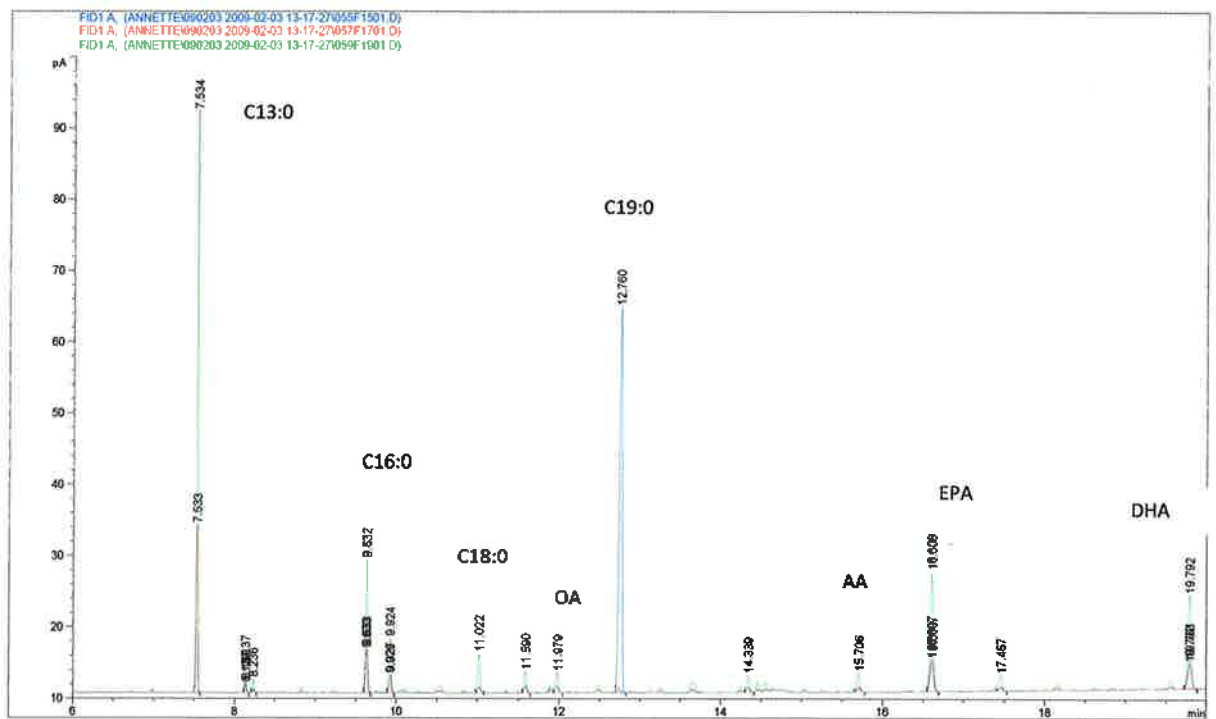
Tabel 17. Beregnet gennemsnit mg lipid i prøve ud fra internstandardmetoden, ved tilsat 2 og 4 mg C19-syre, dette sammenholdt med afvejet mængde prøve.

Metode 1+2 til kvalitativ bestemmelse

Ifølge produktinformation af standardreference Mehaden oil (methyleret), se bilag III, blev samtlige toppe/RT identificeret til kvalitativ bestemmelse, se figur 32. For frysetørret muslinger blev deslige identificeret relevante fedtsyrer jf. teori om indhold af omega 3 fedtsyrer, se figur 33. Metoden anses være velegnet til videre kvalitative bestemmelser.



Figur 32. 40mg Menhaden oil ved internstandard:4mg C19-syre,2mg C19-syre + 2mg C13-syre og 4mg C13-syre



Figur 33. 25 mg frysetørret blåmuslinger ved 4 mg C19-syre(RT 12.75) og 50 og 100 mg frysetørret blåmuslinger ved 4 mg C13-syre(RT 7.53)

Fedtsyrebestemmelse i olieprøver og muslinger

9 udvalgte olieprøver

Der blev beregnet indhold af **total lipid** i samtlige prøver, samt **EPA*** og **DHA*** i 6 udvalgte marine olier af kosttilskud. Koncentrationer blev beregnet ud fra internstandardmetode uden korrektion for responsfaktor, med efterfølgende beregnet middelværdi og tilhørende % CV, se tabel 18

Der opsættes to-sidet t-test for nul hypotese $H_0: \mu = \mu_0$ mod alternative hypotese $H_1: \mu \neq \mu_0$. Hvor statistisk signifikans på 95%,99% og 99,9% kan et bevis mod nulhypotesen accepteres. P-værdi er den beregnede sandsynlighed for at få den fundne værdi x , forudsat H_0 er sand. $P < 0.05$ blev anset værende som signifikant forskellig mellem målt og sand værdi. Beregninger blev foretaget i excel.

Der blev fundet statistisk signifikant forskel ($P < 0.05$) mellem målte værdier (33 ± 3 mg) og sand værdi (afvejning 40 mg) ved anvendte målemetode. Tages målerækkerne hver for sig, adskiller målerække a (35 ± 4 mg) ved at være statistisk signifikant forskellig ($P < 0.05$) fra målerække b og c (32 ± 3 mg). Se tabel 1 og 2 i bilag VIII.

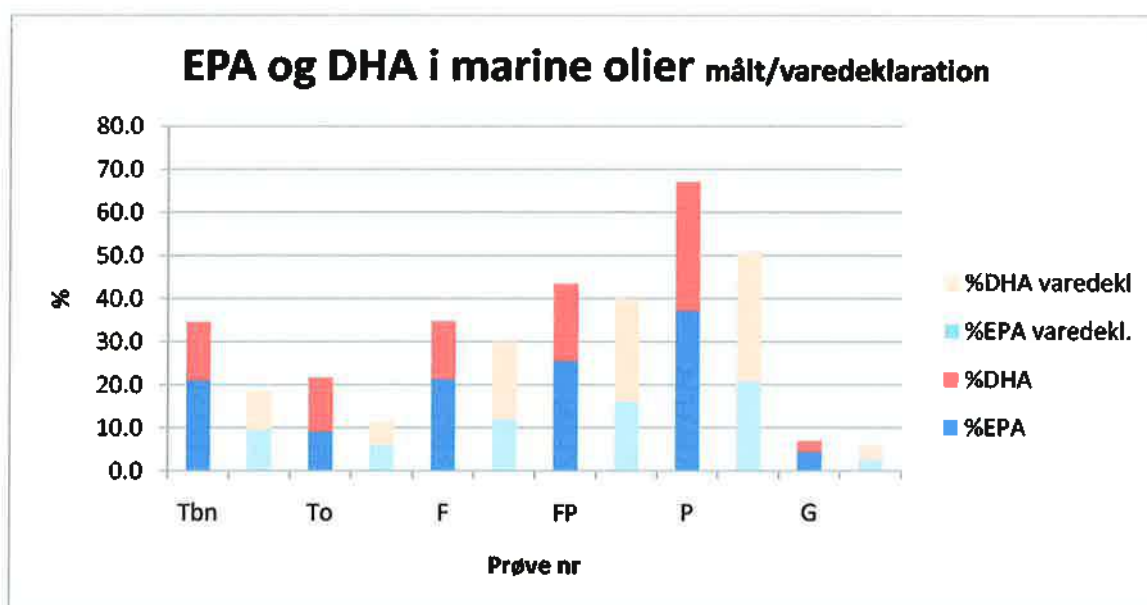
Ved en sammenligning af beregnet % EPA og % DHA i målt total lipid med værdier opgivet jf. varedeklaration blev fundet statistisk signifikant forskel ($P < 0.05$) mellem målte og sande værdier. Trods ringe nøjagtighed, blev der ved 95 % konfidensinterval anset god repeterbarhed mellem selve målingerne (undtagen målinger ved muslingeolie, antagelig afledt af øget usikkerhed ved lavere nettokoncentration). Se tabel 18 og figur 34. Dette kunne indikere **systematisk fejl** ved anvendte metode til kvantitativ bestemmelse. Der konkluderes jf. tidligere at anvendte metode ikke kunne verificeres til kvantitativ bestemmelse ved beregning ud fra internstandardmetoden. Det falder uden for projektets tidsramme at foretage yderligere tiltag og justeringer til afklaring af evt. systematisk fejl. Herefter blev overstående olier vurderet kvalitativ med vægt på identifikation af relevante fedtsyrer i marine olier anvendt som kosttilskud. Se tabel 20 og figur 37A-F, desuden henvises til bilag VIII figur 4a-k for yderligere kromatogrammer af målte olier.

Kvalitativ bestemmelse angiver toppe af EPA og DHA i samtlige marine olier jf. varedeklarationer. **ETA*** og **OTA*(=STD)** angivet i varedeklaration for "Original muslingeolie" kunne ikke genfindes i kromatogram for muslingeolie, men sås i de fleste andre marine olier, skønt dog i relative små mængder. Der bør tages højde for at muslingeolien adskiller sig væsentlig fra de andre fiskeolier ved at indeholde 2/3 del olivenolie (højt indhold af OA*), medførende lavere netto indhold af ETA og STD, givende tilsvarende højere analyseusikkerhed. Der kan på dette grundlag *ikke* konkluderes at muslingeolie *ikke* indeholder ETA og STD, med forbehold af formodet måleusikkerhed ved anvendte metode. Dog med selv samme forbehold for anvendte metode, angav resultaterne at ikke kun muslingeolie, men også fiskeolier kan indeholde omega 3 fedtsyrerne ETA og STD. GLA* blev genfundet i fiskeolie, Fitness Pharma, for dens indhold af Hjulkronefrøolie af omega 6 fedtsyrer.

Der blev medtaget to prøver af "TOBIS fiskeolie" til eftervisning af **holdbarhed** ved tilsætning af antioxidant (alpha-tocopherol) fra fabrikanten side. Prøver blev taget fra hhv. anbrudt (Tbg) og uanbrudt (Tbn) flasker opbevaret i køleskab i >2 md. Kromatogrammer antyder ingen tydelige tegn på oxidation og harskning relateret til vigtig fedtsyrer i olien, fra hhv. anbrudt og uanbrudt flaske. Se figur 4c og d i bilag VIII.

Prøvenavn	Forkortelse	Indhold		Målt		Målt	
		%EPA	%CV	%DHA	%CV	%DHA	%CV
Menhaden oli(ampule)	M	-	-	-	-	-	-
Olive oil (ampule)	Oa	-	-	-	-	-	-
Fiskeolie(TOBIS)gl.	Tbg	-	-	-	-	-	-
Fiskeolie(TOBIS) ny	Tbn	8.9	21.1	1.4	9.6	13.5	1.6
Torskelevertran	To	5.5	9.1	0.4	6.1	12.6	1.5
Fiskeolie(kapsel)	F	18.0	21.3	0.8	12.0	13.5	0.3
Fitness Pharma (kapsel)	FP	23.8	25.6	1.0	16.2	17.9	1.8
Pikasol(kapsel)	P	30.0	37.3	2.2	21.0	29.8	0.9
Grøn muslingeolie(kapsel)	G	3.3	4.5	5.1	2.7	2.5	5.3
Svansø's Olivenolie	Os	-	-	-	-	-	-

Tabel 18. Beregnet middelværdi og % CV, sammenholdt værdier jf. varedeklaration.



Figur 34. Målte værdi af %EPA og %DHA sammenholdt med varedeklaration. Se bilag II

Frysetørret blåmuslinger og grønblæbede muslinger

Der blev ud fra foregående resultater af marine olier afprøvet eftervisning af systematisk fejl ud fra tesen; dårlig nøjagtighed kontra god præcision ved beregning af total lipid, samt EPA og DHA i samtlige muslingprøver. Der opnås ikke samme repeterbarhed mellem resultater indenfor hver kategori af muslinger (>10% CV), lignende dem fundet ved marine olier(<5%CV), indikerende indeværende systematisk fejl i metoden. Se tabel 19.

Følgende kvantitative vurderinger blev foretaget på muslinger, med absolut forbehold for anvendte metodes manglende verificering til pålidelige resultater. Resultaterne skal udelukkende anses som værende oplæg til yderligere undersøgelser og diskussioner omhandlede relaterede emner jf. dem fundet i litteraturen.

Firma	Prøve	Forkort.	mg /100 mg prøve						% af lipid i prøve			
			mg lipid	%CV	mg EPA	%CV	mg DHA	%CV	% EPA	%CV	% DHA	%CV
VILSUND	Blå musling (konsum)	FTBK	6.0	14.3	1.5	8.5	1.5	25.2	23.4	3.7	23.2	23.4
NORD SEAFOOD	Grøn musling (konsum)	FTGK	12.3	26.2	3.4	26.9	2.3	72.9	27.5	1.0	16.9	48.2
SydFyns Linemuslinger NORDSHELL	Blå musling > 7cm	FTB7	7.4	12.7	2.0	22.2	1.8	15.7	26.5	2.0	24.7	10.1
	Blå musling 6-7 cm	FTB6	7.6	19.2	1.9	43.9	1.9	22.3	25.5	3.1	25.0	11.6
	Blå musling 5-6 cm	FTB5	8.0	59.4	2.1	47.1	1.7	66.7	27.5	3.5	22.9	46.5
	Blå musling <5 cm	FTB4	8.4	21.9	2.0	19.3	1.9	18.0	24.6	2.6	22.5	15.1

Tabel 19. Beregnet middelværdi og %CV i målte muslinger.

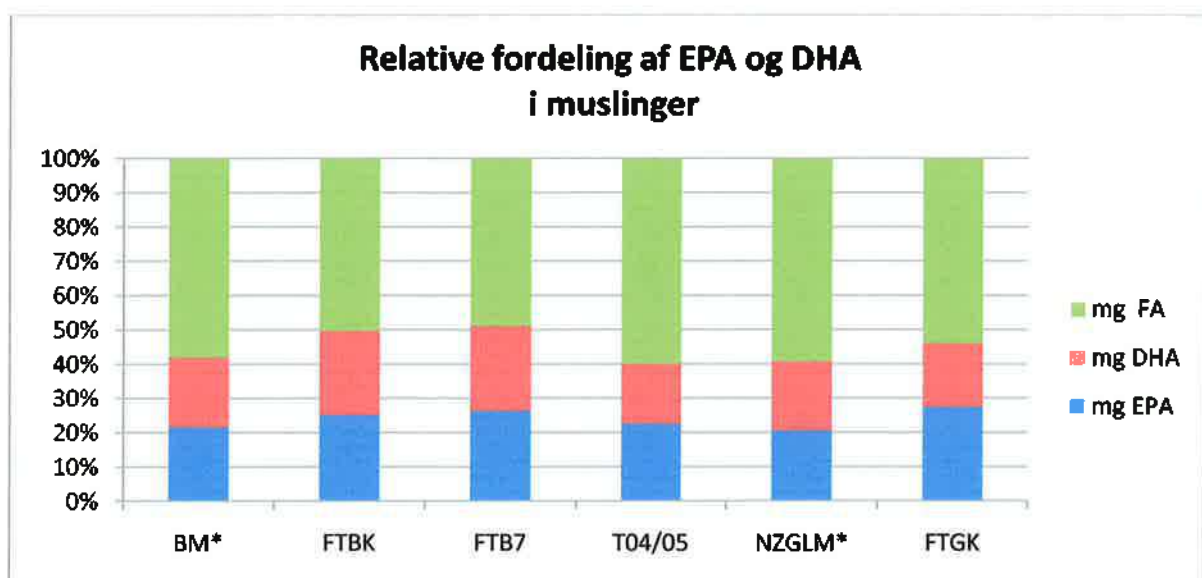
Der blev jf. litteraturen, [A20; Murphy KJ et al. 2002], fundet højere indhold af **total lipid** i grønslæbede muslinger kontra blåmuslinger, deslige blev der fundet højere andel lipid jo mindre størrelse blåmusling. Dette kunne meget vel antages som udtryk for usikkerhed ved metoden, men også vælges som et udtryk for næsten ens lipidmængde i muslinger uafhængig af deres fyldningsgrad (glucagon+protein). Jo større muslinger, jo større fyldningsgrad givende mindre % lipid og vice versa mindre fyldningsgrad jf. større procentvis andel af lipid. En nærmere afklaring af denne tese ville kunne belyses ved måling af *lipidmængde pr. musling*. Ydermere ville en lipidseparation i hhv. neutrale og phosphorlipider belyse fordeling mellem lipider anvendt til energilager og/eller membranlipider jf. [A15; Hong Lin et al.2002]. Sammenholdes lipidindhold for de to udtagningstider blev lipidindhold fundet for blåmuslinger udtaget i dec(uge50/2008) ca. 5-6 mg lipid/100mg tørret muslingepulver og i feb.(uge6/2009) lå det på ca.7-8 mg lipid/100 mg frysetørret. I henhold til litteratur, [A21; Peiters H. et al. 1980], vil der ske en stigning af lipidindhold i muslinger henover vinter op til gydetidspunktet tidligt forår. Denne forskel i lipidindhold fra december til februar kunne indikere denne stigning i lipidindhold hen over vinteren frem til gydetidspunkt. Dog kan det sandsynligvis lige såvel være et udtryk for konkluderet måleusikkerhed ved anvendte metode til kvalitativ bestemmelse, samt forskel i prøveforberedelser og beregningsmetoder. Se figur 28 og tabel 19.

Trods omtalte måleusikkerhed blev der foretaget en estimeret sammenligning for **relativ og absolut fordeling af EPA og DHA** i prøverne jf. dem fundet i litteraturen, [A17; MCLEAN & BULLING,2005]. Se figur 35 og 36. Både for blåmuslinger såvel som for grønslæbede muslinger gav målte værdier højere andel af både EPA og DHA end jf. teorien [A20; Murphy KJ et al. 2002], men samme forhold gør sig gældende; at grønslæbede muslinger indeholder en større andel af EPA hvor det for blåmuslinger er DHA. Dette skal tages med forbehold vedrørende anvendte målemetode, deslige med forskellighed fra anvendte metode jf. litteraturen. Figur 35 angiver forskellene i den relative fordeling af EPA/DHA mellem blåmuslinger og grønslæbede muslinge så vidt det er gældende for egne målinger jf. dem i litteraturen. Resultater af egne målinger viste alle højere indhold af EPA i både blåmuslinger som grønslæbede muslinger jf. litteraturen [A17; MCLEAN & BULLING,2005], [A19; Murphy KJ et al. 2003]. Dette fortolkes ikke umiddelbart som værende reelt, men mere en indikation afledt af anvendte metode (eks. oxidation af fedtsyrer, manglende korrektion af responsfaktor).

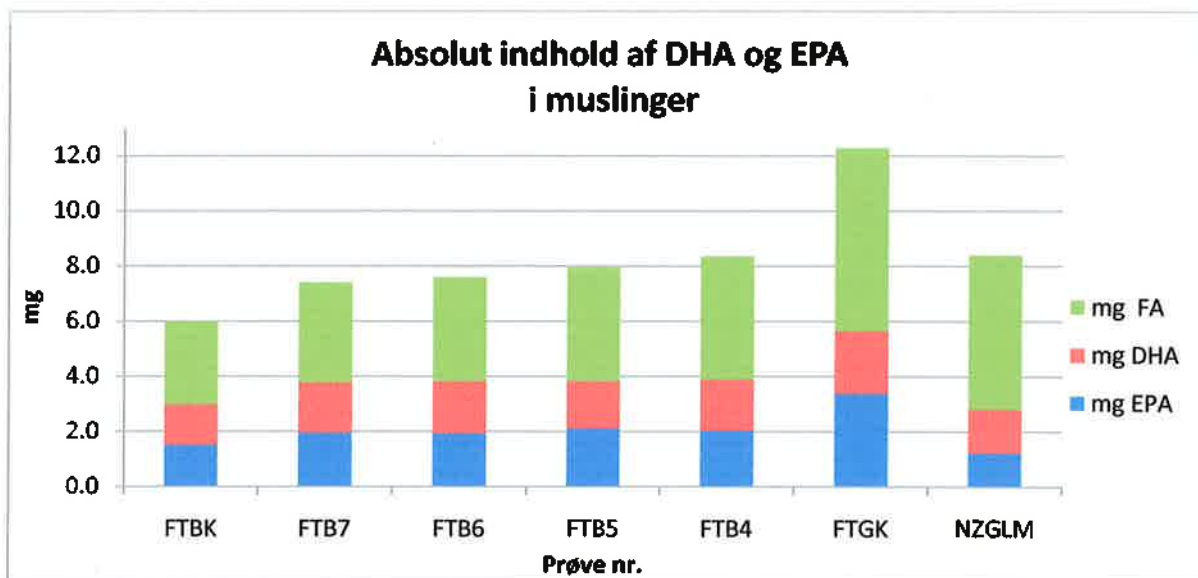
Figur 36 viser absolutte målte værdier af EPA/DHA i total mg lipid/100 mg frysetørret muslinge pulver. Her blev det ikke muligt at finde sammenlignelige værdier af fedtsyrer bestemt ud fra muslingers tørstof, med undtagelse af en enkelt undersøgelse af frysetørret grønslæbede musling, [A19; Murphy KJ et al. 2003]. Der blev ikke fundet variationer af EPA og DHA i mellem størrelse af muslinger uafhængig af stigende andel lipid mængde ved mindre muslinger.

Herefter blev muslingeprøver vurderet kvalitativ med vægt på relevante fedtsyrer jf.fundet i marine olier anvendt som kosttilskud. Se nedenstående tabel 20, samt figur 37a-f og figur 38A-C.

Kvalitativ bestemmelse angav toppe af EPA og DHA i både grønslæbede muslinger som blåmuslinger, desuden OA*, STD* og GLA* i mindre mængder, samt LA* og ALA*(begge essentielle fedtsyrer) og muligvis en antydning af ETA *. Tilsvarende var der ikke nævneværdige kvalitative forskelle mellem blåmuslingernes størrelse, se bilag VIII, figur 5a/b. Der blev også vurderet effekten af tørring kontra frysetørring af blåmuslinger dog med forbehold for anvendte metoder 2 ved tørret muslinger og metode 1+2 ved frysetørret. Overordnet blev genfundet overensstemmelse mellem begge metoder for relevante fedtsyrer, se bilag VIII figur 6a/b. Det kunne ikke umiddelbart vurderes om den ene metode var mere kvalificeret end den anden, kun set ud fra kvalitativ bestemmelse. Hvad angår det proceduremæssige, er tørring af muslinger både hurtigere og betydelig billigere at benytte, dog krævende en grundig mortering til pulver. Frysetørringens fordele er en mere skånsom tørring givende et let porøst materiale med stor overflade medvirkende øget tilgængelig for anvendte methyleringsolventer.



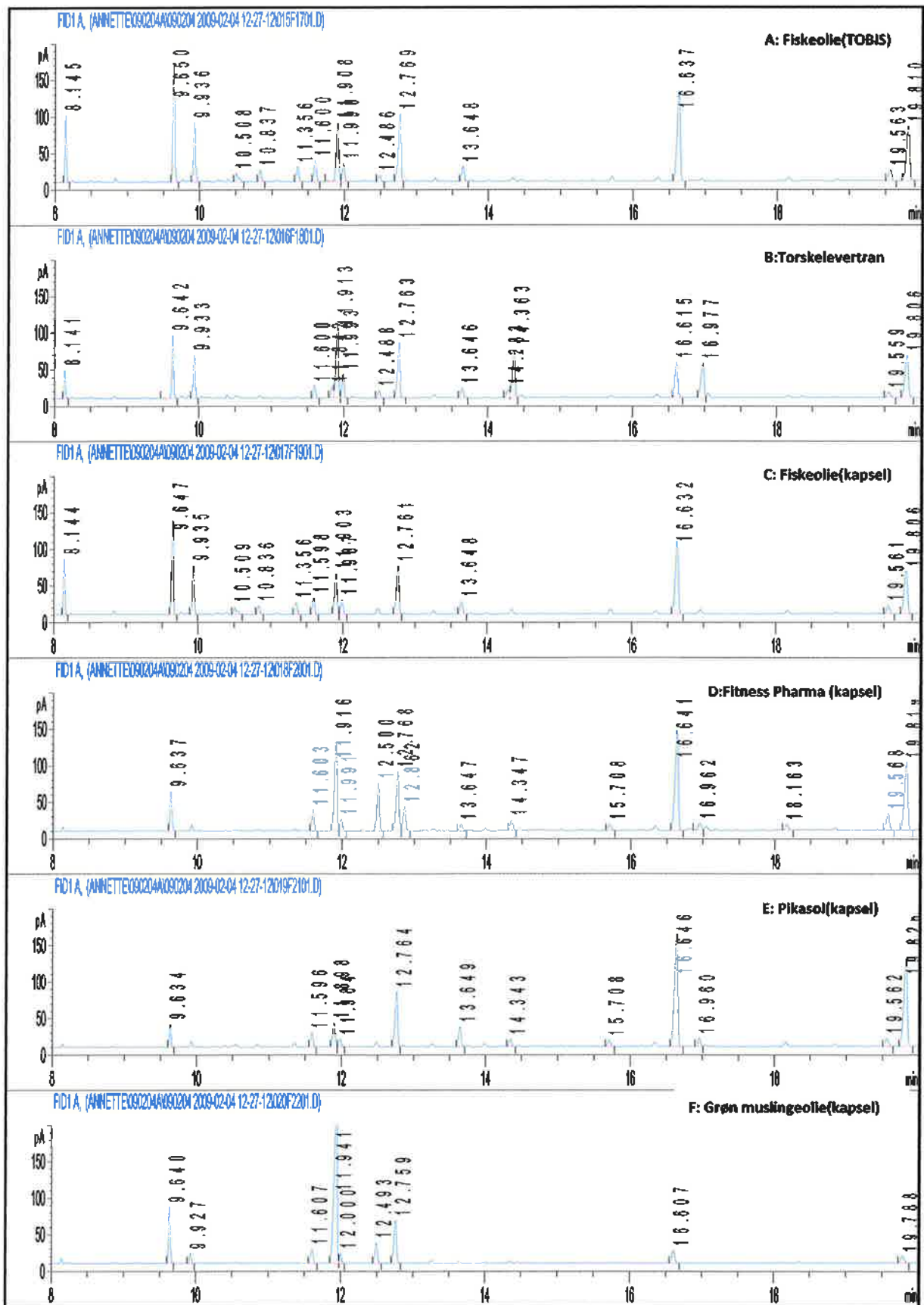
Figur 35. BM*(blåmusling) og NZGLM*(New Zealandske grønslæbede muslinger) angivet som gennemsnitsværdier over et år jf. [A17; MCLEAN & BULLING,2005]. FTGK; grønslæbede muslinger fra Nordic Seafood(9-11cm). FTBK; konsum blåmuslinger fra Vilsund(5-6 cm/feb.). FTB7; blåmuslinger fra Sydfynslinemuslinger (>7cm/feb.). T04/05;blåmuslinger fra Sydfynslinemuslinger(4-5cm /feb.).



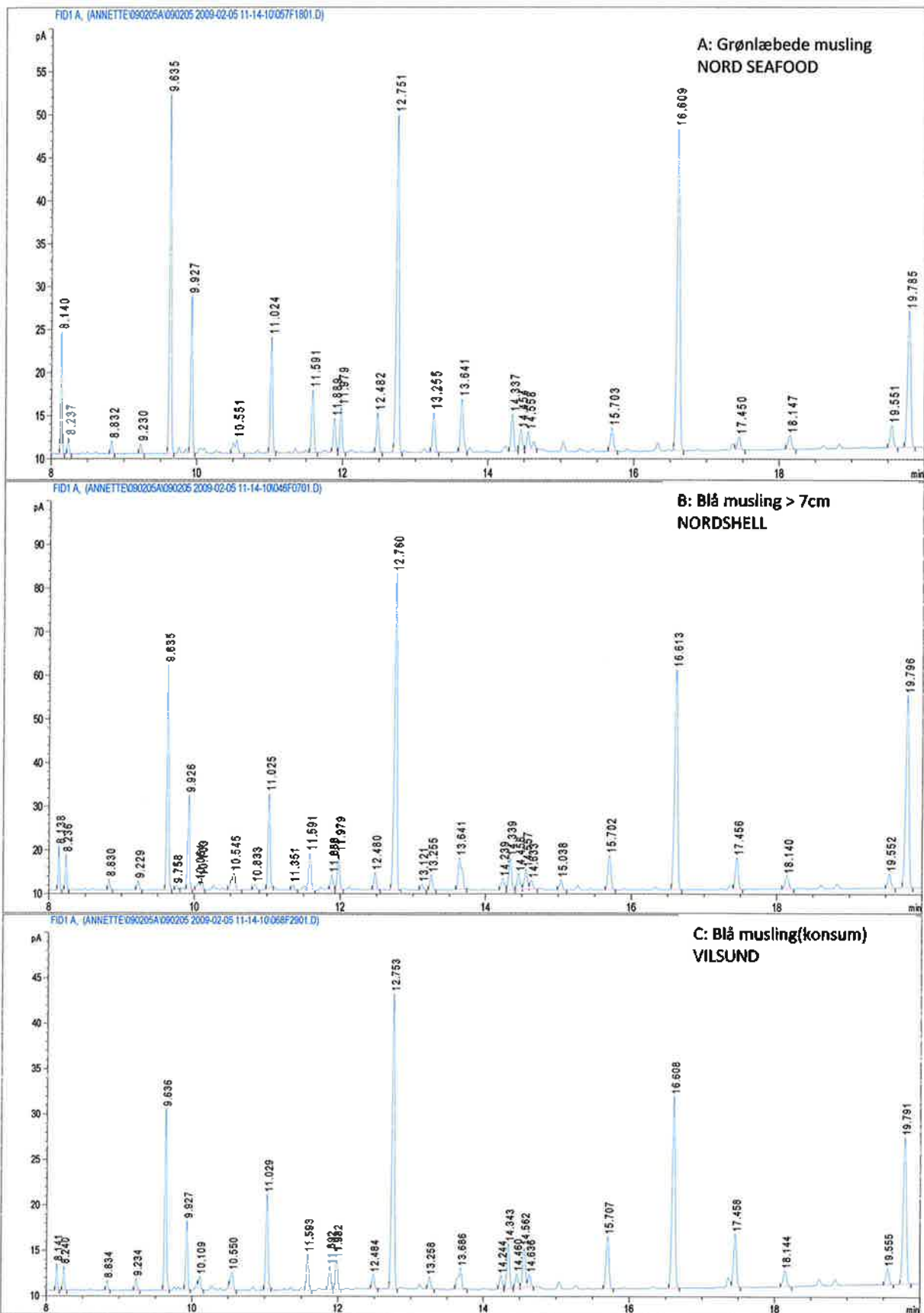
Figur 36. FTBK; konsum blåmuslinger fra Vilsund(5-6 cm/feb.). FTB7/4; blåmuslinger fra Sydfynslinemuslinger(>7-4cm/feb.). FTGK; grønlæbede muslinger fra Nordic Seafood(9-11cm). NZGLM(New Zealandske grønlæbede muslinger) jf. [A19; Murphy KJ et al. 2003].

RT	Prøve nr. Komponent	Olier										Muslinger						
		M	Oa	Tbg	Tbn	TO	F	FP	P	G	Os	FT BK	FT GK	FT B7	FT B6	FT B5	FT B4	
9.64	C16:0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11.60	C18:0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11.91	C18:1n9c(OA)	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12.50	C18:2n6c(LA)	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
12.85	C18:3n6(GLA)							x										
13.25	C18:3n3(ALA)	x										x	x	x	x	x	x	x
13.66	C18:4n3(STD)	x		x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
15.45	C20:3n6(DGLA)																	
15.71	C20:4n6(AA)	x		x	x		x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
16.34	C20:4n3(ETA)	x		x	x	x	x		x									
16.65	C20:5n3(EPA)	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
19.56	C22:5n3(DPA)	x		x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
19.80	C22:6n3(DHA)	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x

Tabel 20. Kvalitativ bestemmelse af relevante fedtsyrer i marine olier og muslinger, der henvises til figur37A-F for markeret prøver af olier og til figur 38A-C for markeret prøver af muslinger.



Figur 37A-F Udvalgte kromatogrammer af 6 marine olier anvendte til kosttilskud. RT jf. komponenter henvises til tabel 20.



Figur 38A-C. Udvalgte kromatogrammer af friske blåmuslinger fra to forskellige firmaer, samt grønløbede muslinger(blancherede). RT jf. komponenter henvises til tabel 20.

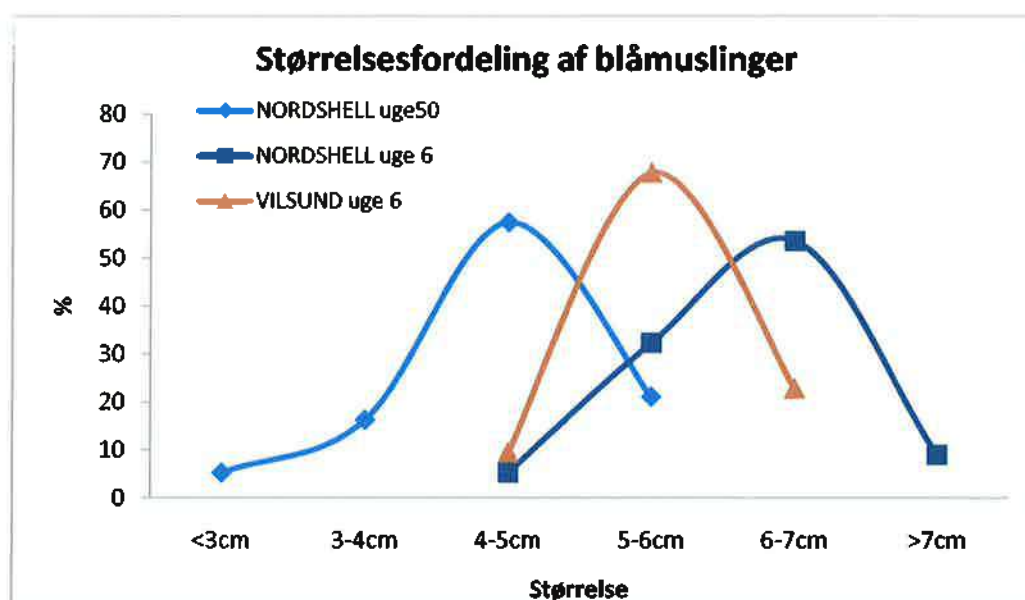
Våd- og tørstofbestemmelse på sorterede muslinger

Der blev ved hver af de to forsøgsrunder modtaget friske urensede, usorterede, blåmuslinger fra Nordshell (SydFyns Linemuslinger), desuden blev der indkøbt til 2.forsøgsrunde(uge6/2009), friske konsum(= rensede og sorterede) blåmuslinger fra Vilsund, samt frosne grønslæbede muslinger fra New Zealand.

Muslinger fra Nordshell blev rensede og sorteret straks efter modtagelsen og opbevarede efterfølgende på køl indtil videre prøvebehandling og analyse samme dag. Desuden blev muslinger fra Vilsund sortere i størrelse til identifikation af spredning ved konsum og herefter opbevarede på frost.

Der blev udtaget 10 stk. fra hver størrelsespulje af friske blåmuslinger til bestemmelse af total vægt, skalvægt, vådvægt og tørstof. Grønslæbede muslinger leveres fra producentens side frosne (efter en blanchering og fjernelse af den ene skal). Pakken indeholdende 16 stk grønslæbede muslinger blev optøet i køleskab og derefter udtaget til stuetemperatur til bestemmelse af total vægt, skalvægt, vådvægt og tørstof. Tørstof blev bestemt på homogeniserede muslinger både efter tørring i varmeskab samt efter frysetørring. Se tabel 21 og 22, samt figur 39.

Jf. teori, [21; Peiters H. et al. 1980], vil muslinger vokse hen over vinteren hvad angår størrelse, samtidig med at der sker en gonadenudvikling. Ændring i størrelsesfordelingen ses tydelig mellem modtagne muslinger i Dec/2008(uge 50) og dem i Feb/2009(uge 6) hvor der var sket udvikling til ekstra flottet og kødfyldte muslinger i deres højsæson. Indkøbte friske muslinger fra Vilsund (Nordøstlige Atlanterhav) havde ikke opnået samme kvalitet hvad angik både størrelse som kødindhold. Denne forskel kan forklares ud fra flere faktorer som føde, temperatur, lokation og produktionsmetode. Grønslæbede muslinger lå i størrelse 9-11 cm indeholdende tilsvarende relative større kødmængde, samt tørstof, muligvis relaterende til deres tilberedning/blanchering før indfrysning.



Figur 39. Størrelsesfordeling af blåmuslinger ved forskellige tidspunkter og lokationer. Muslinger fra Nordshell blev størrelsesfordelt før frasortering af spildmuslinger, hvor muslinger fra Vilsund var indkøbt som konsummuslinger efter frasortering af spildmuslinger.

Blåmuslinger			
Firma	NORDSHELL		VILSUND
Størrelse	Uge 50/2008	Uge6/2009	
<3cm	5	-	-
3-4cm	16	-	-
4-5cm	57*	5*	9
5-6cm	21	32*	68*
6-7cm	-	54*	23
>7cm	-	9*	

Tabel 21. Størrelsesfordeling af blåmusling. * Prøver er udtaget til videre analyse for fedtsyrebestemmelse.

Firma	Blåmuslinger					Grønløbede musling	
	NORDSHELL (uge50/2008)	NORDSHELL (uge6/2009)			VILSUND (uge6/2009)	NORDIC SEAFOOD (efter optøet)	
Størrelse	4-5cm	<5cm	5-6cm	6-7cm	>7cm	5-6cm	9-11cm
g Vægt total	216	114	177	224	293	178	448 ¹⁾
g Vægt skal	90	56	80	120	139	115	262 ¹⁾
g Vådvægt	126	93	73	82	116	63	182
% vådvægt	58.3	81.6	41.2	36.6	39.6	35.4	40.6
% tørvægt varmeskab	14	13.1	14	14.9	12.6	14.6	29
% tørvægt frysetørret	-	13.3	14.1	14.3	14.5	18.41	28.8

Tabel 22. Bestemmelse af muslingers våd- og tørvægt. ¹⁾ Her indgår kun en "skal del".

Konklusion

Ud fra resultater af forsøgsrunder blev følgende vurderinger taget.

- **Lineær regression** af kalibreringskurver fra fire standardrækker blev fundet tilfredsstillende for C19-ester og C13-ester i hhv. Hexan og MeCl(korrelationsfaktor $R \approx 1$).
- Resultater fra **optimering af metode 2** blev overordnet konkluderet misvisende grundet afdampning af solventer. Der blev vægtet fremover at anvende 3 ml HCl-methanol under opvarmning ved max. 70°C i 0.5h for optimal esterificering af FFA.
- Værdier/arealer af **internstandarder** angav stor spredning, ringe repeterbarhed, både efter metode 2 og metode 1+2.
- **C19 mere stabil end C13** der under anvendelse af NaOH-methanol enten degraderes eller fordamper næste helt væk. C19-topareal bruges til efterfølgende kvantitativ beregning af total lipid indhold.
- Alle beregninger angav værdier nævneværdigt under afvejet **total mængde lipid i marine olier** (< 70-85 % af reelle værdi).
- **Kvantitative vurderinger** blev foretaget på muslinger med absolut **forbehold** for metodens manglende verificering af pålidelige resultater.
- Der blev fundet højere indhold af total lipid i **grønlæbede muslinger** kontra **blåmuslinger**,
- For **referencestandarder** blev tilfredsstillende retentionstider og areal aflæst for relevante fedtsyrer til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse.
- **Vægt og fyldningsgrad** i muslinger stiger, jf. litteratur, hen over vinter, afhængig af vækstbetingelser.
- **Frysetørret** kontra **tørret prøver** viste ikke signifikante kvalitative forskelle.
- Længere tids opbevaring af fiskeolie, let tilgængelig for luft/ilt, viste ikke tegn på oxidation ved tilsætning af **antioxidant** (alpha-tocopherol) fra fabrikantens side.

Kvantitativ bestemmelse

Der vurderes at anvendte **metode 1+2** til **kvantitative bestemmelser** af muslinger og marine olier **ikke kunne påvise pålidelige resultater**. En nærmere undersøgelse bør foretages af FAME-metoden for afklaring af uoverensstemmelse mellem praktiske og målt værdier af internstandarder, fedtsyrer og lipidindhold. Yderligere undersøgelser blev undladt inden for dette projekts mulige tidsramme.

Beregnet % EPA og % DHA i olier angav **ringe nøjagtighed**, jf. varedeklaration, men **god repeterbarhed/præcision** mellem selve målingerne. Dette kunne indikere **systematisk fejl** ved anvendte metode til kvantitativ bestemmelse. Samme forhold var dog ikke gældende for **muslinger**, her givende **ringe repeterbarhed /præcision**, for mere tilfældige resultater i mellem indeværende prøver. Dette kunne antyde for metoden en forøget måleusikker hvad angår kvantitativ bestemmelse af fedtsyrer i biologisk materiale frem for på de rene olie.

Indhold af **EPA og DHA** i blåmuslinger og grønslæbede muslinger viste højere andel af EPA end dem fundet jf. litteraturen. Dette fortolkes ikke umiddelbart som værende reelt, men kunne være afledt af benyttede metode (eks. oxidation af fedtsyrer, manglende korrektion af responfaktor).

Der blev ikke fundet variationer af EPA og DHA i mellem størrelse af muslinger uafhængig af stigende lipidindhold ved mindre muslinger. Den relative fordeling af EPA/DHA, for både blåmuslinger og grønslæbede muslinge, afviger ikke signifikant jf. teorien [A20; Murphy KJ et al. 2002] om at grønslæbede muslinger indeholder en større andel af EPA og blåmuslinger en større andel DHA.

Kvalitativ bestemmelse

Ifølge produktinformation af standardreference Mehanden oil (methyleret) og Oliveoil(methyleret), blev samtlige toppe/RT identificeret til kvalitativ bestemmelse efter metode 1+2.

Kvalitativ bestemmelse angav toppe af **EPA*** og **DHA*** i samtlige marine olier jf. varedeklorationer. **ETA*** og **OTA*(=STD)** angivet i varedekloration for **Original muslingeolie** kunne ikke genfindes i tilsvarende krommatogram, men blev identificeret i de fleste andre marine olier, skønt dog i anseelig relative små mængder. Der bør tages højde for at "Original muslingeolie" og fiskeolien "Fitness Pharma" adskiller sig væsentlig fra de andre fiskeolie ved at indeholde en vis andel planteolie(1/3-2/3) angivet ved **OA*** for **olivenolie(omega 9)** og **GLA*** for **hjulkronefrøolie(omega 6)**. Resultatet herfra kunne tolkes som usikker ved bestemmelse af **ETA** og **STD** i mindre mængde, ud fra lavere netto koncentrationer af marine olie i det samlet produkt. Det kan derfor ikke udledes at muslingeolie ej indeholder **ETA** og **STD**, når måleusikkerhed tages i betragtning ved anvendte metode.

Herefter blev muslingeprøver vurderet kvalitativ med vægt på relevante fedtsyrer jf. fundet i marine olier anvendt som kosttilskud.

Kvalitativ bestemmelse angav toppe af **EPA** og **DHA** i både grønslæbede muslinger som blåmuslinger, desuden **OA***, **STD*** og **GLA*** i mindre mængder, samt **LA*** og **ALA***(begge essentielle fedtsyrer) og antydning af **ETA ***. Der var ingen nævneværdige kvalitative forskelle i mellem blåmuslingernes størrelse, ej heller for hhv. tørret kontra frysetørret blåmuslinger. Der blev fundet **EPA/DHA/DPA/STD** i samtlige marine olier jf. dem fundet i muslinger.

Der kan ikke, med forbehold for anvendte metode, konkluderes ud fra analyserede marine olie at kun muslingeolie indeholder omega 3 fedtsyrerne **ETA** og **STD**. Ej heller, at der findes forskel i antal af betydende fedtsyrer mellem grønslæbede muslinger og blåmuslinger.

Diskussion

Metodens anvendelighed

FAME-metoden anvendt til fedtsyrebestemmelse blev indledningsvis afprøvet og fundet anvendelig jf. teorien om TAG* og FFA* transesterificering/esterificering ved hhv. basisk reagens(metode 1) og sur reagens(metode 2). Fedtsyrerne blev identificeret kvalitativt og verificeret ud fra referencestandarder. Den anvendte metode til FAME*(metode 1+2) indebar først basisk hydrolyse til frigørelse af komplekse lipider og transesterificering af TAG, efterfølgende en esterificering af de frie fedtsyrer.[A8],[A12]. Denne proces anses at give det totale resultat af relevante fedtsyrer i muslinger, både som FFA, men også indeværende i TAG og andre sammensatte lipider som eks. phospho- og glycolipider. [10;p.240],[9;p.438-442] [15;p.207].

Internstandard metode blev valgt til kvantitativ bestemmelse og for hver prøverække blev fremstillet en internstandard som reference. Disse værdier/arealer af internstandarder angav ringe præcision og dårlig repeterbarhed i kraft af stor spredning, samt ringe nøjagtighed jf. kalibreringskurve, dette gældende for både metode 1, metode 2 og metode 1+2. Dette blev sammenholdt ud fra to valgte internstandarder, hvor C19 viste sig at være mere stabil end C13, især under anvendelse af NaOH-methanol(metode 1). Der vurderes om årsagen kunne være effekt af nedbrydning og/el fordampning af indeværende internstandarder, ud fra hypotese; at benyttede metyleringsmetoder var for kraftige angående temperatur, tid og koncentrationer. Her især gældende for basisk metylering, der anses som værende en effektiv og kraftig reagent, selv ved lave temperaturer over kort en periode. Hvor HCl-methanol, som sur reagent, er betydelig mildere.[A13]. Fænomenet var som sagt mest udtalt ved C13, frem for C19, måske indikerende lettere afdampning af fedtsyrer med kortere kædelængde med lavere kogepunkt. C19 blev anvendt til efterfølgende kvantitativ beregning. Det var ikke muligt at genfinde de reelle værdier af total lipidindhold i olier, dette som udtryk for tab af prøve og/el internstandard. Beregnet % EPA og % DHA i olier angav ringe nøjagtig, jf. varedeklaration, men god repeterbarhed mellem selve målingerne. Dette kunne indikere systematisk fejl ved anvendte metode til kvantitativ bestemmelse. Samme forhold var dog ikke gældende for muslinger, her så mere tilfældige udsving i resultater givende ringe repeterbarhed. Dog holdt det for både olie, som muslinger, at resultatet angav for høje værdier af EPA jf. DHA, måske som udtryk for manglende anvendelse af korrigerende responsfaktor.

Flere parameter indikerede usikkerhedsfaktorer under selve processen medførende reduktion i samlet lipidindhold og evt. forskydning i mellem sammensætning af de indeværende fedtsyrer. En nærmere undersøgelser bør foretages af metoden for afklaring af uoverensstemmelse mellem praktiske og målt værdier af fedtsyrer(internstandardmetode). Yderligere undersøgelser blev udeladt inden for dette projekts tidsramme. Forslag til mulige undersøgelser der kunne indikere hvilke faktorer der spiller ind ved kvantitativ bestemmelse med metode 1+2 kunne være parameter som mængde, temperatur, tid, solventer(polaritet), samt evt. variabel koncentration af udvalgte fedtsyrer med forskellige kædelængder. Der vurderes at anvendte metode 1+2 til kvantitative bestemmelser af muslinger og marineolier ikke umiddelbart kunne anvendes til gengivelse af pålidelige resultater. Vurderinger af prøveresultater skal udelukkende anses som oplæg til indledende diskussioner og undersøgelser omhandlende relaterede emner jf. i litteraturen.

Kvalitative bestemmelser ud fra referencestandarder indebar ikke tilsvarende problem ved test af metode 1+2 på referencestandard, Mehanden oil (methyleret), hvor samtlige toppe/RT blev identificeret jf. produktinformation. Tilsvarende afprøvning blev lavet på referencestandard af olivenolie(methyleret) og indeværende fedtsyrer blev også her identificeret jf. produktinformation. Metoden anses være velegnet til kvalitative bestemmelser.

Lipidindhold i muslinger

Der blev jf. litteraturen, [A20; Murphy KJ et al. 2002], fundet højere lipidindhold i grønslæbede muslinger kontra blåmuslinger. Lipidindholdet blev bestemt ud fra tørstof(dw*), ca.12 % for grønslæbede muslinger og 5-8 % blåmuslinger. Ved litteratursøgning blev der fundet meget varierende oplysninger angående lipidkoncentration i blåmuslinger, fra 0.5 til 2.5 % i vådvægt, og for grønslæbede blev der ikke fundet højere værdier end ca. 1.8%. Der skal tages højde for variationer af lipidindholdet gældende faktorer som lokation, føde, temperatur og årstid.

Sammenholdes målte lipidindhold for de to udtagningstider, blev der fundet for blåmuslinger udtaget i dec(uge50/2008) 5-6 % lipid (dw/tørret), hvor i feb.(uge6/2009) lå det på ca.7-8 % lipid(dw/frysetørret). Disse forskelle i lipidkoncentrationer kan vægtes som værende et udtryk for selve tørringsprocessen af den fhv. "hårde" tørring i varmeskab med mulighed for nedbrydning af fedtsyrerne, kontra frysetørring som værende mere skånsom ved lavere temperatur. Der var dog ingen nævneværdige kvalitative forskelle mellem hhv. tørret kontra frysetørret blåmuslinger. Variationer i lipidkoncentrationerne kan også vælges at ses som et udtryk for muslingernes reproduktionscyklus og fødetilgængelighed, ud fra nedenstående teser, jf. dem fundet i litteraturen.

Undersøgelsen, jf. [A21; Peiters H. et al. 1980], viser at både indhold af lipid og protein er højest lige før gydning, hvor glycogen er på sit minimum(angivet som mg/musling). Efter gydning ses fald i totale mængder af lipid og protein, samt stigning af glycogen. Her angives at glycogen lagres over sommeren og bruges hen over vinteren, hvor lipid og proteiner anvendes som energi i forbindelse med gydning. Dette sammenstilles med undersøgelse, jf. [A15; Hong Lin et al.2002], hvor der også argumenteres for at både glycogen og (neutral) lipider lagres hen over sommeren hvor fødemængde er størst, topper omkring efterår, og falder ned over vinteren ved ringere fødemængde. Dette kunne tyde på at muslinger anvender både glycogen og neutrale lipider (der ikke indgår i cellemembranen) som energilager. Lignende undersøgelse, jf. [A16; Seiichi Uno et al.1999], angiver ligeledes at lipider i store træk kan opdeles i to kategorier: de neutral lipid (NL), som er lagret fedt primært sammensat af triglycerider, samt phosphorlipider (PL) og kolesterol* der er membranernes byggesten. Det anses at depotlipiderne hovedsagelig består af TAG* og sammensætningen vil ændres afhængigt af tilgængelige næringsstoffer, hvor lipider fra væv/celler hovedsagelig består af PL, hvor sammensætningen ikke ændrer sig nævneværdigt. Undersøgelse angav at muslinger fra lokationer med gode næringsforhold resulterede i højeste TAG/PL* fordeling i indhold, hvor ringere næringsforhold gav lavere TAG/PL fordeling i indhold. Her omtales også hvorledes fedtsyresammensætningen kan være påvirket af føde, sæson/årstid, vandtemperatur og vanddybde ved levested jf. andre undersøgelser.

Dette kunne meget vel antages at fundne variationer af lipidkoncentrationer ud fra egne målinger af muslingerne er et udtryk for usikkerheder ved anvendte metoder, men det kan også gisnes som et udtryk for lipidmængde i muslinger ud fra fyldningsgrad(glucagon+protein) og størrelse. Hvis den største andel af lipider i muslinger anslås at være membranlipider, svarende til næsten konstant

indhold (kun påvirket af evt. lagring af neutrale lipider) vil dette give mindre % lipid ved større muslinger med større fyldningsgrad og vice versa. Denne tese holder ud fra fundne værdier af lipid mellem størrelse udtaget ved samme tidspunkt, svarende til øget % lipid ved mindre størrelse muslinger. Samme antagelser blev afvejet ved højere lipidindholdet i henhold til øget størrelser og fyldningsgrad ved de to udtagnings tidspunkter i december og februar. Denne forskel i lipidindhold, fra 5-6% i december til 7-8 % i februar, kunne indikere stigning i lipidindhold hen over vinteren, frem til gydetidspunktet tidlig forår jf. [A21; Peiters H. et al. 1980]. En nærmere belysning af disse teser ville kunne foretages ved måling af *lipidmængde pr. musling*. Ydermere ville en lipidseparation i hhv. phosphorlipider og neutrale lipider belyse fordeling mellem lipider anvendt som membranlipider og/eller til energilagere, jf. [A15; Hong Lin et al.2002].

Jf. teori, [21; Peiters H. et al. 1980], vil muslinger hen over vinteren vokse hvad angår størrelse, samtidig med at der ske en gonadenudvikling. Ændring i størrelsesfordelingen ses evident mellem muslinger i periode fra dec/2008 til feb/2009, udviklende sig til ekstra flottet og kødfyldte muslinger i deres højsæson. Indkøbte friske muslinger i feb/2009 fra Vilsund(Nordøstlige Atlanterhav) havde ikke opnået samme kvalitet hvad angik både størrelse og kødindhold. Disse forskelle kan om muligt forklares ud fra flere faktorer som føde, temperatur, lokation og produktionsmetode. Grønlæbede muslinger lå i størrelse 9-11 cm indeholdende tilsvarende relative større kødmængde.

Omega 3 fedtsyrer i muslinger

Trods metodens usikkerhedsmomenter blev der fortaget estimeret sammenligning af relativ fordeling mellem EPA* og DHA* i prøverne til sammenligning med dem fundet i litteraturen. Der blev lavet undersøgelser på variationer af EPA og DHA indholdet i hhv. grønslæbede muslinger (NZGLM) og blåmuslinger(BM).

Der argumenteres, jf.[A20; Murphy KJ et al. 2002], at forskellene i FA* (og sterolindhold) sammensætning mellem de to arter kan beror på at føden for NZGLM* mest består af kiselalger/diatom* (høj EPA indhold), hvor føden for BM* primært indeholder dinoflagellater(høj DHA indhold). Lignende argumenter var at finde, jf [A18; K. Y. CHAN et al. 2004], her angives at højt DHA indhold i asiatiske grønslæbede muslinger tillægges fødetilgang i området, der primært består af dinoflagellater indeholdende større mængder DHA, frem for diatom hvor EPA indholdet er mere fremherskende. Dette sidestilles med tesen, jf. [A17; MCLEAN & BULLING,2005], at NZGLM konsumerer føde med højt indhold af diatomer/kiselalger, hvor BM konsumerer føde med højt indhold af dinoflagellater ,selv når begge arter befinder sig ved samme lokation, givende samme tilgængelig fødesammensætning.

Den relative fordeling af EPA/DHA afviger ikke med signifikante forskelle mellem blåmuslinger jf. grønslæbede muslinge, så vidt det er gældende for egne målinger, som dem fundet jf.litteraturen(muslinger fra New Zealand). Her gælder, jf. teori [A20; Murphy KJ et al. 2002], at grønslæbede muslinger indeholder en større andel af EPA, hvor i mod for blåmuslinger er det DHA. Til gengæld viste resultater af egne målinger alle højere indhold af EPA i både blåmuslinger som grønslæbede muslinger jf. dem i litteraturen[A17; MCLEAN & BULLING,2005], [A18; K. Y. CHAN et al. 2004]. Der blev ikke fundet variationer af EPA og DHA i mellem muslingestørrelserne, uafhængigt af lipidmængder. Dette skal tages med største forbehold vedrørende usikkerhed ved anvendte målemetode, deslige med forskellighed fra anvendte metode jf. resultater fundet fra litteraturen.

Resultaterne af EPA/DHA i prøverne fortolkes ikke umiddelbart som værende reelle, men mere en indikation afledt af anvendte metode(eller/og eks. oxidation af fedtsyrer, manglende korrektion af responsfaktor ved beregning) da samtlige målinger viser højere indhold af EPA frem for DHA. Samme tendens sås tilsvarende for marine olier, hvor en anelig andel af resultater viser relative højere indhold af EPA end DHA, tilsvarende dem angivet i varedeklarationen.

Kvalitativ vurdering af fedtsyrer i olier og muslinger

Herefter blev muslingeprøverne vurderet kvalitativ med vægt på relevante fedtsyrer jf. fundet i marine olier anvendt som kosttilskud. Fiskeolie indeholder især to omega-3 fedtsyrer, eicosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA), jf. muslingeolien der udvindes fra den grønslæbede musling (*Perna canaliculus*). Muslingeoliens hovedbestanddele er EPA* og DHA* som det kendes fra fiskeolie, men derudover skulle det indeholde en række andre omega-3 fedtsyrer, som bl.a. STA* og ETA*. [www.fiskolja.se], [www.novasel.dk], [www.langkaer.dk/ocean98]

Kvalitativ bestemmelse angav toppe af EPA* og DHA* i samtlige marine olier jf. varedeklarationer. ETA* og STA*(=STA*) angivet i varedeklaration for "Original muslingeolie" kunne ikke genfindes i tilsvarende krommatogram, men blev identificeret i de fleste andre marine olier, skønt dog i anelige relative små mængder. Der bør tages højde for at muslingeolie og en af fiskeolierne adskiller sig væsentlig fra de andre fiskeolier ved at indeholde en vis andel planteolie(1/3-2/3), angivet ved OA*(omega 9) fra olivenolie og GLA*(omega 6) fra hulkronfrøolie. Resultatet herfra kunne tolkes som usikker ved bestemmelse af ETA og STA i relative små mængde ud fra lavere netto koncentrationer af marine olie. Det kan derfor ikke konkluderes at muslingeolie ikke indeholder ETA og STA ud fra antaget måleusikkerhed taget i betragtning ved anvendte metode. Det antages at muslingeolie indeholder ETA/STA, jf. varedeklaration, men ud fra kvalitativ vurdering antyder resultaterne at der også kan forefindes ETA/STA i almindelige fiskeolier anvendt som kosttilskud

Kvalitativ bestemmelse angav toppe af EPA og DHA i både grønslæbede muslinger som blåmuslinger, desuden OA*, STA* og GLA* i mindre mængder, samt LA* og ALA* (begge essentielle fedtsyrer) og antydningen af ETA. Der var ingen nævneværdige kvalitative forskelle mellem blåmuslingernes størrelse, ej heller for hhv. tørret kontra frysetørret blåmuslinger. Der blev fundet EPA/DHA/DPA/STA i samtlige marine olier jf. dem fundet i muslinger.

Med forbehold for anvendte metode, kan der ikke verificeres postulatet om at kun muslingeolien indeholder ETA og STA jf. lignende fiskeolieprodukter anvendt som kosttilskud. Ej heller, at der findes signifikante forskelle i antal af betydende fedtsyrer mellem grønslæbede muslinger og blåmuslinger. Vægtes kommercielle muligheder for anvendelse af linemuslingers omega fedtsyrer, evt. med henblik på muligheder ved spildmuslingerne, ville yderligere undersøgelse anbefales. Dette være sig en kortlægning omkring mængder af fedtsyrer og deres sammensætning i relation til størrelse, reproduktionscyklus, fødetilgængelighed og temperatur.

Konklusion

Til analyse og bestemmelse af fedtsyrer i marineprodukter blev anvendt hurtigmetoden OSM(One-step-metode) til FAME-fremstilling, uden forudgående lipidekstraktion. Fedtsyrer blev bestemt ved GC-analyse. Metoden ansås værende velegnet til kvalitative bestemmelser ud fra referencestandarder. Kvantitativ bestemmelse ved internstandardmetoden(Nonadecanoic acid), angav resultater med både ringe nøjagtighed og repeterbarhed. Kvantitative vurderinger af prøverne blev foretaget med absolut forbehold for anvendte metode og dens manglende verificering for angivelse af pålidelige resultater. Der henvises til de enkelte del-konklusioner i afsnit "Litteraturstudie vedrørende fedtsyrer i muslinger", "Eksperimentelle fedtsyrerbestemmelser i muslinger og marine olier", samt afsnittet "Diskussion". Ved forkortelse af fedtsyrer, henvises til ordliste.

Kvalitativ bestemmelse angav fedtsyrerne EPA* og DHA* i samtlige marine olier. Muslingeoliens (udvundet fra den New Zealandske grønslæbede musling, *Perna canaliculus*) hovedbestanddele er EPA og DHA som det kendes fra fiskeolie, men derudover skulle den indeholde en række andre vigtige omega-3 fedtsyrer, som bl.a. ETA* og STD*. ETA og STD kunne ikke genfindes i muslingeolie, men blev identificeret i de fleste andre marine olier, dog i relative små mængder. Det kunne ej konkluderes at muslingeolie ikke indeholder ETA og STD ud fra antaget måleusikkerhed taget i betragtning ved anvendte prøvemængde og metode.

EPA og DHA blev identificeret i både grønslæbede muslinger (*Perna canaliculus*) og blåmuslinger (*Mytilus edulis*), deslige OA*, STD og GLA* i mindre mængder, samt begge essentielle fedtsyrer LA* og ALA*, og en antydning af ETA. Der var ingen nævneværdige kvalitative forskelle mellem blåmuslingernes størrelse, ej heller for hhv. tørret kontra frysetørret blåmuslinger. Der blev fundet EPA/DHA/DPA*/STD i samtlige marine olier jf. dem fundet i muslingerne. Med forbehold for anvendte metode, kan der ikke verificeres postulatet, at kun muslingeolien indeholder ETA og STD jf. lignende fiskeolieprodukter anvendt som kosttilskud. Ej heller, at der kan findes signifikant forskel i antal af betydende fedtsyrer mellem grønslæbede muslinger og blåmuslinger.

Fra litteraturen blev fundet argumentationer for varierende indhold af lipider i muslinger mht. deres reproduktionscyklus og fødetilgængelighed. Der blev angivet højere lipidindhold i grønslæbede muslinger kontra blåmuslinger, men også antagelse af hvorledes fedtsyresammensætningen kan påvirkes af fødetilgængelighed, sæson/årstid, vandtemperatur, og vanddybde ved levested. Efter gydning ses fald i totale mængder af lipid og protein og stigning af glycogen. Her angives at glycogen lagres over sommeren og bruges hen over vinteren, hvor proteiner og lipider bruges som energi i forbindelse med gydning. Dette antyder at muslinger anvender både glycogen og neutrale lipider (der ikke indgår i cellemembranen) som energilagere. Lignende undersøgelse angav lipider i to kategorier: de neutrale lipider, som er lagret fedt primært sammensat af triglycerider, samt phosphorlipider og kolesterol* der indgår som membranernes byggesten. Det anses at depotlipiderne hovedsagelig består af triglycerider(TAG) og deres sammensætning vil ændres afhængigt af tilgængelige næringsstoffer, hvor lipider fra væv/celler hovedsagelig består af phosphorlipider(PL) og deres sammensætning ændrer sig ikke nævneværdigt. En undersøgelse af TAG/PL forholdet i muslinger fra lokationer med gode næringsforhold viste højeste TAG*/PL* fordeling, hvor ringere næringsforhold medførte lavere TAG/PL fordeling.

Deslige blev fundet forskel i fedtsyrersammensætning i hhv. blåmuslinger og grønslæbede muslinger afhængig af fødesammensætning. Hvor et relativt højere indhold af EPA i grønslæbede muslinger afledes af primærføden bestående af diatomer/kiselagler, indeholdende højere andele af EPA. For blåmuslinger gælder det et relativt højere indhold af DHA jf. primærføde bestående af dinoflagellater med tilsvarende højt indhold af DHA.

Perspektivering

For mulige potentielle anvendelser af linemuslinger og deres indhold af omega fedtsyrer er her ikke vægtet de økonomiske omstændigheder i dette projekt. Dog kunne det antages at være visse valide aspekter set ud fra allerede eksisterende produktion af olie udvundet fra grønslæbede muslinger i New Zealand anvendt til kosttilskud. Anvendelse af muslingernes indhold af omega fedtsyrerne kan også ses i et lidt bredere perspektiv, eks. anvendt som foder til akvakulturer eller landbruger.

Vægtes der kommercielle muligheder for linemuslinger og deres indhold af omega fedtsyrer, evt. med henblik på anvendelse af spildmuslingerne, ville yderligere undersøgelse anbefales. Dette være sig en kortlægning omkring mængder af fedtsyrer og deres sammensætning i relation til størrelse, reproduktionscyklus, fødetilgængelighed og temperatur.

Hvad angår anvendte metode er denne afprøvet i tilsvarende varianter ved bestemmelse af fedtsyrer i marineprodukter, jf. lignende studier. Der blev ikke mulighed inden for projekts afgrænsede tidsramme at belyse usikkerhedsfaktorerne ved videre undersøgelser af evt. fejl og mangler i foreliggende metodeanvendelse. OSM, til fremstilling af FAME ved fedtsyrebestemmelse på GC, er en hurtig og effektiv metode, der ved sin anvendelse, jf. mere traditionelle metoder, begrænser mængden af toksiske solventer. Der anses at være gode muligheder for optimering af metode med videre studier af f.eks. parameter som temperatur, mængde og reaktionstid, deslige variation af mere eller mindre polære solventer. Der ses også alternativer i prøveforberedelse, måske med mulighed for optimering af forudgående tørringsprocesser.

Ordlister: Forkortelser og definitioner

Ord/forkortelse	Ordforklaring
AA	Arachidonic acid/ Arakidonsyre C20:4n6
Acetyl-CoA	Pyruvat, som kommer fra glykolysen, omdannes til Acetyl-CoA, som går ind i citronsyrecyklus.
ALA	Alfa- Linoleic acid/alfa-linolensyre C18:3n3
Alkoxy	Alkoxy gruppen er en alkyl(kulstof og brint kæde) gruppe knyttet til ilt; RO
Amfifilt	Et molekyle, der både har hydrofile og hydrofobe dele.
Antioxidant	Naturligt forekommende eller syntetisk fremstillet stof, som forhindrer eller svækker ødelæggende iltning (oxidation)
Apoproteiner	Et protein som mangler en karakteristisk prostetisk gruppe. Selve apoproteinet består kun af aminosyrer, og det er ikke fuldt funktionsdygtigt før det binder sin prostetiske gruppe til sig og bliver til et så kaldt holoprotein.
Auto-oxidation	Spontan oxidation ved tilstedeværelsen af ilt, peroxider og hydroperoxider.
BM	Blåmusling
CE	Cholesterol ester
Derivatisering	Et derivat er en forbindelse der er afledet af en anden. I gaskromatografi (GC) anvendes derivatisering ofte til at gøre stofferne egnede til separering fx kan fedtsyrer methyleres for at gøre dem flygtige nok til separering.
Desaturase	Et enzym, som fjerner to hydrogen atomer fra en organisk forbindelse, hvilket skaber en carbon dobbeltbinding. Delta og nr - angiver placering af dobbeltbinding fra carboxylgrupper (f.eks Δ^9 desaturase skaber en dobbeltbinding v. 9. position).
DGLA	Dihomo gamma-linolenic acid/dihomo-gamma linolensyre C20:3n6
DHA	Docosahexaenoic acid/Docosahexaensyre C22:6n3
Diatom	Diatom = Kiselalger er en af de mest almindelige typer af planteplankton.
Dinoflagellater	Algegrupper der udgør sammen med kiselalger(Diatom) de vigtigste primærproducenter af organisk stof i havets plankton.
DPA	Docosapentaenoic acid/ docosapentaenoicysyre C22:5n3
Dimerisering	Kemisk forbindelse, hvor identiske molekyler er bundet sammen i par
dw	Drye weight/tør vægt
Elongase	Enzymer som forlænger fedtsyrer ved at tilføje to carbon atomer til fedtsyren's carboxylsyrende
EPA	Eicosapentaenoic acid/ Eicosapentaensyre C20:5n3
ETA	Eicosatetraenoic acid/ Eicosatetraensyre C20:4n3
Eutrofiering	Overgødsning af søer og havområder med plantenæringsstoffer, især nitrat og fosfat, der forårsager, at der kommer flere planktonalger.
FA	Fatty acid/ fedtsyre
FAME	Fatty acid methyl ester/fedtsyre-methylester
FFA	Free fatty acid/frie fedtsyre
GLA	Gamma-linolenic acid/gamma-Linolensyre C18:3n6
Glykogen	Meget stort, forgrenet molekyle opbygget af glukoseenheder, der findes i dyr som energidepot især i lever og skeletmuskulatur.
GC	Gas chromatografi
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Hydrofobiske	Hydrofob er en betegnelse for egenskaber ved stoffer eller grupper, der skyr vand, i modsætning til hydrofil.

Hydrolyse	Kemisk reaktion eller proces, hvor et molekyle reagerer med vand og bliver opdelt i mindre molekyler
IS	Internstandard
Iodtal	Et mål for indholdet af dobbeltbindinger i et fedtstof.
IR	Infrarød spektroskopi
Kolesterol	Kolesterol er en sterol og et lipid der indgår som en nødvendig bestanddel af cellevæggen hos dyr og mennesker, desuden findes kolesterol i blodets fedtholdige proteiner(lipoproteiner)
LA	Linoleic acid/Linolsyre C18:2n6
Lipolytisk aktivitet	Udvinding af energi ved nedbrydning af fedt
Lipooxygenase	Et enzym der medvirker til dannelse af leucotriener ved oxidation af fedtsyre.
Methylering	Kemisk proces, hvorved en methylgruppe (CH ₃ -) indføres i et organisk eller uorganisk molekyle.
Miceller	Elektrisk ladede partikler af kolloid størrelse, dvs. ca. 1-100 nm.
Mitochondrie	Et organel der medvirker ved energistofskiftet i celler. I mitokondriets matrix nedbrydes fedtsyrer, der stammer fra fødens indhold af fedtstoffer
MS	Massespektroskopi
MUFA	Monounsaturated fatty acid/ monoumættede fedtsyre
NL	Neutral lipid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance –spektroskopi
NZGLM	New Zealand Green-Lipped Mussel/ New Zealand grøn læbede musling
O-Acyl	Er en kemisk funktionel gruppe i form RC (= O)- afledt fra carboxylsyre
OSM	One-Step-Methylering
OTA	Octadecatetraenoic acid/ octadecatetraenoic syre C18:4n3
PC	Phosphatidylcholine, en gruppe af phosphorlipider sammensat af fosforsyre, cholines, estere af glycerol og to fedtsyrer
Peroxisomer	Små celleorganeller indeholdende enzymer, bl.a. peroxidase og katalase, som indgår i forskellige stofskifteprocesser, hvori molekyler reagerer m. ilt under dannelse af hydrogenperoxid, som udnyttes til oxidation af andre molekyler.
PL	Phosphorlipid
Plankton	Fællesbetegnelse for mikroorganismer der lever frit svævende i havet.
PUFA	Polyunsaturated fatty acid/ flerumættede fedtsyre
SFA	Saturated fatty acid/ mættede fedtsyrer
SFC	Supercritical Fluid Chromatography/Superkritisk væskekromatografi
ST	Sterol
STD	Stearidonic acid/stearidonic syre C18:4n3
Steroler	En vigtig gruppe blandt steroider der er sammensat af fire kondenserende ringe
Syretal	Et mål for de frie syrer i 1 g fedt eller olie
Sæbe-tal	Et gennemsnitligt mål for længden af carbonkæder for bundne /frie fedtsyrer
TBM	Tasmansk blåmusling
TG/TAG	Triglycerider, mere korrekt kaldet triacylglyceroler
TLC	Thin-Layer Chromatography/ Tyndt lags kromatografi
UFA	Unsaturated fatty acid/umættet fedtsyrer
UV	Ultraviolet spektroskopi

Referencer: <http://da.wikipedia.org/wiki>, <http://www.denstoredanske.dk> <http://www.biosite.dk/leksikon>

Litteraturliste

Monografier

- [1] Biologibogen. N.S. Hansen, G. Hestbech, I Kahl, L. Marcussen, H. Marker.1.udgave, 1.oplag 2001. Gads Forlag.
- [2] Analyseteknik, instrumentering og metoder, Flemming Simonsen, 1.udgave, 1.oplag, 2003 Ingeniøren | bøger.
- [3] Apparatteknik, Flemming Simonsen, Fysik og Laboratorieteknik III,2.udgave, Erhvervsskolernes Forlag Odense 1986.
- [4] Skjell biologi og dyrkning. Peter Hovgaard,Stein Mortensen, Øivind Strand. Kystnæringen Forlag & bokklubb AS.
- [5]"AMU-kursus i fødevarekemi". Donwloadet 2009.08.01;
<https://materialeplatform.emu.dk/amu/materiale/Foedevarekemi%20Deltagermateriale.pdf>
- [6] Biokemi og bioteknologi, Bodil Stilling, Ingeniøren | bøger, 1.udgave, 1.oplag, 2003.
- [7] Elementær biokemi, D. Moe og E.C. Munksgaard, Nyt Nordisk Forlag Arhold Busck, 6.udgave, 1991.
- [8] Levnedsmiddelkemi, Lisbeth Skjøde Jeppesen, Erhvervsskolernes Forlag 1994.
- [9] Handbook of food analytical chemistry, Water,Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates, Ronald E. Wrolstad *et al.*, Wiley-Interscience, Published by John Wiley & Sons,Inc., 2000-2005.
- [10] Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis. Volumen 1. 2nd edition, revised and expanded. Leo M.L. Nollet. New York, Marcel Dekker, 2004.
- [11] Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology. 2nd edition, revised and expanded. Casimir C. Akoh and David B. Min. New York, Marcel Dekker, 2002.
- [12] Official methods of Analysis of AOAC international. 16th Edition, 4th Revision, 1998. Volumen II, Food Composition; Additives; Natural Contaminants,Chapter 25-50. Published by AOAC International.
- [13] Analytical Chemistry of Foods,C.S. James, First edition 1995, Published by Blackie academic and Professional, an imprint of Chapman & Hall.
- [14] The Lipid Handbook with CD-ROM, 3th Edition, Edited by Frank D. Gunstone, John L. Harwood and Albert J. Dijkstra. 2007,Taylor & Francis Group. CRC Press.
- [15] LIPID ANALYSIS, Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis Of lipids. 3th Edition 2003,William W Christie. The Oily Press, volume 15.

[16] Cellebiologi, cellens organisation og livsprocesser. 2. reviderede udgave. Poul Vagn Jensen og Poul Prentetø. Gads forlag, 2003.

[17] Methods of analysis for Functional Foods and nutraceuticals. 2th Edition, 2008. Edited by W. Jeffrey Hurst. CRC Press,

[18] Handbook of Derivatives for Chromatography. 2th Edition, 1993. Edited by Karl Blue and John Halket. John Wiley & Sons Ltd.

[19] Handbook of Food Analysis Instrument. Edited by Semih Ötles. 2009, CRC Press

Artikler

[A1] Comparison of Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue, Sara J. Iverson, Shelley L.C. Lang, and Margaret H. Cooper. 2001. Lipids, Vol. 36, no. 11:1283-1287. Springer Berlin/Heidelberg.

[A2] A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Jordi Folch, M. Lees, and G.H Sloane Stanley. 1957. The Journal of Biological Chemistry. 226:497-509.

[A3] Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. F. Smedes. 1999. The Analyst 124(11): 1711-1718.

[A4] A rapid method of total lipid extraction and purification. E.G. Bligh, W.J. Dyer. 1959. Canadian journal of biochemistry and physiology. 37:991-917.

[A5] A simple and rapid solvent extraction method for determining total lipids in fish tissue. C.M. Lee, B. Trevino, and M. Chaiyawat. 1996. JAOCS International 79:487-492.

[A6] A comparison of procedures to determine free fatty acids in rat heart. J.K.G. Kramer and H.-W. Hulan. Journal of Lipid research, Volumen 19, 1978. *Notes on Methodology*.

[A7] One-Step Extraction/Methylation Method for Determining the fatty Acid Composition of Processed Foods. Franz Ulberth and Monika Henninger. JAOCS, Vol. 69, no. 2 (February 1992)

[A8] Determination of the Fatty Acid Profile of Fish by a One-step Extraction/Methylation Method. Franz Ulberth and Monika Henninger. Fat Sci. Technol. Vol .97, 1995, nr.2, p.77-80

[A9] Dichloromethane as a Solvent for Lipid Extraction and Assessment of Lipid Classes and Fatty Acids from Samples of Different Natures. Elena Cequier-Sanchez, Covadonga Rodriguez, Angel Ravelo and Rafael Zarate. Journal of agricultural and food chemistry. Vol.56, No.12, 2008.

[A10] Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Marine Lipids: Insight Studies. Ana P. Carvalho and F. Xavier Malcata. Journal of agricultural and food chemistry. Vol.53, No.13, 5049-5059, 2008.

[A11] Alcoholysis, Saponification and the Preparation of Fatty Acid Methyl Esters. R.L. Glass. LIPIDS, vol.6, No.2, 919-925, 1971.

[A12] Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials. Ke Shun Liu. JAOCS. Vol.71, No.11, 1179-1187, 1994.

[A13] Development in Lipid Analysis: Some New Extraction Techniques and *in situ* Transesterification. Ana I. Carrapiso and Carmen Carcia. LIPIDS, Vol.35, no.11, 1167-1177, 2000.

[A14] One-step method for quantitative and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. S. Abdulkadir and M. Tsuchiya. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol.354, Del.1-8, 2008

[A15; Hong Lin et al. 2002] Seasonal changes in phospholipids of mussel (*Mytilus edulis* Linne). Hong Lin, Jie Jiang, Chang-hu Xue, Bin Zhang and Jia-chao Xu. Journal of the Science of Food and Agriculture. 83:133-135, 2002.

[A16; Seiichi Uno et al. 1999] Lipid class and fatty acid composition of mussel, *Mytilus trossulus*, in Vancouver Harbour., Yun, Ji Hyun, Masaki Kaneniwa, Jiro Koyama, Hisashi Yamada and Kumiko Ikeda. http://www.pices.int/publications/scientific_reports/Report16/BiochemicalPhysiological.pdf

[A17; MCLEAN & BULLING, 2005] DIFFERENCES IN LIPID PROFILE OF NEW ZEALAND MARINE SPECIES OVER FOUR SEASONS. CARLENE H. MCLEAN and KIM R. BULLING. Journal of Food Lipids, Volume 12, Number 4, December 2005, p. 313-326(14). Blackwell Publishing

[A18; K. Y. CHAN et al. 2004] LIPID CONTENT AND FATTY ACID COMPOSITION IN THE GREEN-LIPPED MUSSEL *PERNA VIRIDIS* (L.), Q. F. GAO, K. M. YIP, W. H. WONG, P. K. S. SHIN, S. G. CHEUNG. Journal of food lipids 11 (2004) 123-130.

[A19; Murphy KJ et al. 2003] Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-dried New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) from three sites in New Zealand. Murphy KJ, Mann NJ, Sinclair AJ. Asia Pacific J Clin Nutr. 2003;12(1):50-60

[A20; Murphy KJ et al. 2002] Lipid, FA, and sterol composition of New Zealand green lipped mussel (*Perna canaliculus*) and Tasmanian blue mussel (*Mytilus edulis*). Mooney BD, Mann NJ, Nichols PD, Sinclair AJ. Lipids, 2002 Jun;37(6):587-95

[A21; Peiters H. et al. 1980] Tissue Composition and reproduction of *Mytilus edulis* in relation to Food Availability. H. Pieters, J.H. Kluytmans, D.I. Zandee and G.C. Cadee. Netherlands Journal of Sea Research. 14(3/4):349-361(1980)