

ARBEIDSBESKRIVELSE
Institutt for husdyr - og akvakulturvitenskap, NMBU

Metodenavn: Fettsyresammensetning (FAME)

BIOVIT-nr.: Arb1046

1. Innledning

Å kunne analysere fettsyrer/fettsyresammensetning har blitt mer og mer viktig på grunn av en økt bevissthet om deres ernæring- og helsemessige innvirkninger (1).

Lang-kjedede fettsyrer eksisterer naturlig som tri-estere med glyserol i oljer, fett og voks fra planter og dyr. Gass kromatografi (GC) er den mest egnede metoden for rutine-analyse av fettsyrer, men først må fettsyrene frigjøres fra glyserol-delen (ved forsåpning) og deretter derivatiseres til flyktige fettsyre metyl-estere (FAME), før de kan ekstraheres over i heptan.

Med denne metoden (1) syntetiseres og ekstraheres fettsyrene direkte fra ulike rå-prøver og tørre prøver, uten at det trengs å gjøres en organisk løsemiddel-ekstraksjon først. Resultatene oppgis både som relative arealprosent (fettsyreprofil) og kvantitativt i g/kg.

Metoden er standardisert for ca. 40 µL fett/olje.

2. Reagenser

- Heptan: HPLC- kvalitet
- 10 N KOH: 561,1 g/L vann
- MeOH: HPLC-kvalitet
- 24 N H₂SO₄: 663 mL konsentrert/L vann
- Internstandard etter valg: 0,5mg/mL - C13:0, C19:0, C23:0

3. Risikovurdering

Heptan: Helsekadelig, meget brannfarlig, miljøskadelig.
Bruk egnede hansker, arbeid i avtrekk.

KOH: Farlig ved svelging, Sterkt etsende.
Bruk hansker, vernebriller

Metanol: Meget brannfarlig, giftig.
Fare for alvorlige helseskader ved innånding, hudkontakt, svelging.

H₂SO₄: Reagerer voldsomt med vann. Sterkt etsende, irriterer luftveiene.
Vann må ikke tilsettes.
Skyll straks med mye vann hvis man får det i øynene. Kontakt lege. Bruk egnet verneutstyr. Se datablad.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Halldis Tingstad/Elin F. Johnsen (2018)	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 06.2018	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn Arb 1046 Fettsyreprofil.d ocx	Side 1-3

4. Utstyr

- Vannbad
- Reagensrør med tette skrukorker 10 – 12 mL
- Vortex mixer
- Swing- out sentrifuge
- Trace GC Ultra med auto-injektor

5. Prøvemateriale

Gras, kraftfôr, surfôr, melk, kjøtt og oljer.

Rå-prøver kan være ferske eller fryste og det trengs ca 0,8 g. For rene oljer veies det inn mindre (< 0,05 mL). For tørre prøver veies det inn ca 0,3 g.

6. Spesielle merknader

Metoden kan også brukes på mindre prøvemengder- se detaljer i neste avsnitt

7. Arbeidsbeskrivelse

Metoden er modifisert. Volumene er nedskalert i forhold til referansen (1).

- 1) Prøven veies direkte i reagensrør, 0,3 g tørr prøve eller 0,8 g rå prøve
- 2) Tilsett 4,25 mL MeOH
Hvis ikke IS skal tilsettes, økes volumet av metanol tilsvarende
- 3) Tilsett intern standard: 0,3 mL (tørr prøve) eller 0,8 mL (rå prøve)
(normalt C13:0, alt: C19:0 eller C23:0) – konsentrasjon: 0,5 mg/mL
- 4) Tilsett 0,56 mL 10 N KOH
- 5) Kork rørene og rist kraftig i 1min på vortex-mixer
- 6) Plasser rørene i vannbad på 55° C i 1,5 time
- 7) I løpet av inkuberingstiden skal rørene ristes kraftig 5 ganger, ca. hvert 20. min
- 8) Avkjøles i rennende vann, (evnt. isbad)
- 9) Tilsett 0,464 mL 24N H₂SO₄
- 10) Plasser rørene i vannbad på 55° C i 1,5 time
- 11) I løpet av inkuberingstiden skal rørene ristes kraftig 5 ganger
- 12) Avkjøl i rennende vann, (evnt. isbad)
- 13) Tilsett 2,4 mL Heptan
- 14) Rist kraftig i minst 1,5 min på vortex-mixer
- 15) Sentrifuger i Swing-out sentrifuge: 5 min v/3000 rpm, (romtemperatur)
- 16) Ca 1,5 mL av heptan-sjiktet overføres til 2mL GC- vials og korkes

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Halldis Tingstad/Elin F. Johnsen (2018)	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 06.2018	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn Arb 1046 Fettsyreprofil.d ocx	Side 2-3

Små prøver

Analysen kan utføres på meget små prøver: lever, tarm, muskel fra fisk (0,05 - 0,2g)

Prøvene ekstraheres og metyleres som vanlig, men med reduserte volumer:

- 0,1 mL intern standard
- 0,28 mL 10 N KOH
- 2,1 mL MeOH
- 0,232 mL 24 N H₂SO₄
- 1,2 mL heptan

Heptan-sjiktet overføres til 3mL glassrør, dampes inn til tørrhet under nitrogen og re-løses i 0,2 mL heptan. Overføres til 0,3 mL GC- vials og korkes.

Analyse av fettsyresammensetningen på GC-FID

- GC-system: Trace GC Ultra med auto-injektor (Thermo Scientific)
- Software: Chromeleon 7.2 (Thermo Scientific)
- Kolonne: Rt - 2560, 100 m, 0,25 mm ID, 0,20 µm dt (Restek, Cat# 13198)
- Injektor temp: 250 °C
- Splitt injeksjon: 1:40 splitt ratio
- Injeksjonsvolum: 1 µL
- Bæregass: Helium
- Konstant trykk: 2,70 bar
- Ovn temp: 140 °C (5 min) til 240 °C med 4°C/min
- Detektor: FID; temp. 250 °C
- Analysetid: 50 min

Instrumentmetode: FAME_Trace

Prosesseringsmetode: supelco37_jan 2016

For å lage en sekvens i Chromeleon se Arb 1050 aminosyreanalyse.

Start sekvens med blank (heptan) og standard (Supelco37 comp.Mix – ligger i -20° C).

Ta med en standard per 10ende prøve. Om det skal analyseres veldig mange prøver, bør presisjon og følsomhet kontrolleres underveis + følg med at vaskeløsninger ikke går tomme. Om følsomheten synker mye må kolonnen bakes ut ved 200 °C over natt.

Kommer det mye «spikes» i kromatogrammet må detektoren re-startes.

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Halldis Tingstad/Elin F. Johnsen (2018)	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 06.2018	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn Arb 1046 Fettsyreprofil.d ocx	Side 3-3

8. Utregning

Chromeleon gir ut resultatene i relativ areal %.

For å beregne resultatene i g/kg legg «relativ areal %» inn i excel-ark: Beregning FAME (*labmal-diverse analyser-FAME*)

$$\frac{\text{Mengde intern standard (mg)} \times \text{Relativ areal\% fettsyre}}{\text{Relativ areal\% intern standard}} = \text{Mengde fettsyre (mg)}$$

$$\frac{\text{Mengde fettsyre (mg)}}{\text{Innveid mengde prøve (g)}} = \text{g/kg}$$

Referanse:

1. O'fallon, J.V., 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils and feedstuff. *Journal of Animal Science*, 85:1511-1521
-

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Halldis Tingstad/Elin F. Johnsen (2018)	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 06.2018	Revisjon 02.2020	Erstatter 06.2018	Dokumentnavn Arb 1046 Fettsyreprofil.d ocx	Side 4-3