

# **Analyse av transfettsyrer i marine lipider**

## Risiko for falske positive

Svein A. Mjøs og Bjørn Ole Haugsgjerd





Nofima er et næringsrettet forskningskonsern som sammen med akvakultur-, fiskeri- og matnæringen bygger kunnskap og løsninger som gir merverdi. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked, og har om lag 470 ansatte. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy.

Hovedkontor Tromsø  
Muninbakken 9–13  
Postboks 6122  
NO-9291 Tromsø  
Tlf.: 77 62 90 00  
Faks: 77 62 91 00  
E-post: [nofima@nofima.no](mailto:nofima@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

Forretningsområdet ingrediens leverer forskning, analysetjenester og pilotproduksjoner til ingrediens-, havbruks-, næringsmiddel- og farmasøytisk industri. Kjerneområdene er råstoffkunnskap, biproduktutnyttelse, fôr og ernæring samt prosessering av ingredienser og fôr.

Nofima Marin AS  
Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen  
Tlf.: 55 50 12 00  
Faks: 55 50 12 99  
E-post: [ingrediens@nofima.no](mailto:ingrediens@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

# Rapport

 ISBN: 978-82-7251-880-5 (trykt)  
 ISBN: 978-82-7251-881-2 (pdf)

 Rapportnr:  
 21/2011

 Tilgjengelighet:  
 Åpen

<i>Tittel:</i> <b>Analyse av transfettsyrer i marine lipider – Risiko for falske positive</b>	<i>Dato:</i> 6. mai 2011
<i>Forfatter(e):</i> Svein A. Mjøs og Bjørn Ole Haugsgjerd	<i>Antall sider og bilag:</i> 5
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond	<i>Prosjektnr.:</i> 20771
<i>Tre stikkord:</i> Transfettsyrer, Gasskromatografi, Marine lipider	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900195
<i>Sammendrag: (maks 200 ord)</i> <p>Transfettsyrer analyseres i dag nesten utelukkende ved hjelp av gasskromatografi på polare kapillærkolonner. Ved de betingelser som normalt anvendes for analyse av transfettsyrer vil fettsyrer som er naturlig tilstede i marine lipider kunne overlappes med C16 og C18 transfettsyrer. Dette kan lede til falske positive identifikasjoner.</p> <p>Elueringsmønsteret av transfettsyrer og fettsyrer i marine lipider ble studert ved å spore retensjonsindekser under varierende kromatografiske betingelser innenfor det området som normalt benyttes til analyse av transfettsyrer. Dette ble gjort på to forskjellige polare kapillærkolonner med cyanopropyl som den polare gruppen i stasjonærfasen.</p> <p>Totalt 17 mulige interferenter ble identifisert og mengdene av disse i utvalgte varer ble bestemt. De fleste av de kromatografiske overlappene som leder til falske positive kan unngås ved riktig optimalisering av de analytiske betingelsene, men det var ikke mulig å finne en enkelt tilstand som fullstendig eliminerer risikoen for falske positive. Fettsyrene som sannsynligvis vil bidra mest til for høye nivåer av transfettsyrer ved analyse med tradisjonelle metoder er 18:3 n–4 og 18:1 n–11.</p>	
<i>English summary: (maks 100 ord)</i> <p>At conditions commonly applied for trans fatty analyses by gas chromatography, fatty acids naturally occurring in marine lipids may overlap chromatographically with C16 and C18 trans fatty acids and lead to false positives. Elution patterns were studied by tracking retention indices at shifting temperature conditions on two cyanopropyl coated capillary columns. Most overlaps can be avoided by selecting the right chromatographic conditions, but it was not possible to find a single condition that eliminates the risk of overlap between trans fatty acids and interferents.</p> <p>In total, seventeen compounds were identified as potential interferents, and the amounts of these compounds were quantified in various samples of marine origin. The interferents that will most likely contribute to incorrect assessments of trans fatty acids in marine lipids are probably 18:3 n–4 and 18:1 n–11.</p>	

## **Innhold**

<b>1</b>	<b>Bakgrunn.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Oppsummering.....</b>	<b>2</b>
	2.1 Metodikk.....	2
	2.2 Resultater.....	2
<b>3</b>	<b>Referanse til publisert artikkel .....</b>	<b>5</b>

# 1 Bakgrunn

Prosjektet ble initiert fordi lakseprodusenter og fôrprodusenter fikk påvist høyere mengder transfettsyrer i sine produkter enn forventet ved bruk av standard gasskromatografisk metode. Nærmere undersøkelse av de samme produktene ved hjelp av gasskromatografi med massespektrometrisk deteksjon viste at nivåene var svært lave, og i noen tilfeller var transfettsyrer ikke påviselige. Med andre ord gir standard metodikk for transfettsyrer opphav til falske positive når den anvendes på marine lipider.

På bakgrunn av dette ble det igangsatt et forskningsprosjekt med følgende formål:

- 1) Identifisere hvilke betingelser som gir opphav til falske positive
- 2) Kartlegge kromatografiske egenskaper til de falske positive for å finne ut ved hvilke betingelser de kan bli feilidentifisert som transfettsyrer.
- 3) Bestemme mengden av de falske positive og reelle nivåer av transfettsyrer i utvalgte produkter
- 4) Benytte resultatene til å utarbeide veiledning for bestemmelse av transfettsyrer i marine lipider
- 5) Publisere resultatene internasjonalt.

## 2 Oppsummering

Resultatene er presentert i "Trans Fatty Acid Analyses in Samples of Marine Origin: The Risk of False Positives", Svein A. Mjøs & Bjørn Ole Haugsgjerd, J. Agric. Food Chem., 2011, 59 (8) 3520–3531. Et sammendrag av metodikk og resultater er gitt under.

### 2.1 Metodikk

Transfettsyrer bestemmes normalt ved gasskromatografi på polare kolonner med cyanopropyl-grupper i den stasjonære fasen. Polaritet til fasen varierer først og fremst med mengde cyanopropyl, men også temperaturbetingelsene betyr en del. Siden valg av kolonne og temperaturbetingelser vil variere mellom forskjellige metoder for bestemmelse av transfettsyrer betyr det at et bredt område av betingelser må kartlegges for å påvise hvilke forbindelser som kan overlape kromatografisk med transfettsyrer.

Etter en innledende kartlegging av hvilke forbindelser som eluerer i samme område som vanlige transfettsyrer ble de kromatografiske egenskapene kartlagt på to cyanopropyl kolonner med forskjellig polaritet, og ved varierende temperaturbetingelser på de to kolonnene (6 og 5 programmer). I tillegg ble prøvene analysert på en medium polar kolonne med polyetylenglykol som stasjonærfase. Massespektrometri ble benyttet som detektor for å få sikrere identifikasjon enn hva en oppnår med flammeionisasjonsdetektor, som er standard detektor ved fettsyreanalyser. Elueringsmønstrene er karakterisert ved hjelp av retensjonsindekser (equivalent chain lengths, ECL).

Mengdene av de forskjellige interferentene ble deretter bestemt i utvalgte prøver med marint opphav (11 fileter og 7 oljer). Til dette arbeidet ble det benyttet gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor for nøyaktig kvantifisering, og gasskromatografi med massespektrometrisk detektor for sikker identifikasjon. Prøvene ble analysert på en av cyanopropylkolonnene, samt på polyetylenglykol-kolonnen.

### 2.2 Resultater

Det ble påvist at i alt 17 forskjellige fettsyrer som er vanlige i marine lipider kan feilidentifiseres som transfettsyrer. Disse er: 16:1  $n-11$ , 16:1  $n-9$ , 16:3  $n-4$ , 16:3  $n-3$ , 16:4  $n-3$ , 16:4  $n-1$ , iso-17:0, anteiso-17:0, Fytansyre, 18:1  $n-11$ , 18:3  $n-6$ , 18:3  $n-4$ , 19:0, 20:0, 20:1  $n-11$ , 20:1  $n-9$  og 20:1  $n-7$ . Av disse er det kun 18:3  $n-6$ , 20:0 og 20:1  $n-9$  som er til stede i referanseblandinger som vanligvis benyttes til fettsyreidentifikasjon i matvarer.

De fleste av overlappene kan unngås ved å velge riktige kromatografiske betingelser, men noen er uunngåelige med den metodikken som i dag anvendes til analyse av transfettsyrer. Dette gjelder først og fremst 18:1  $n-11$  og 18:4  $n-3$ . Det vil si at det ikke er mulig å bestemme transfettsyrer i marine lipider med dagens standardmetodikk uten at en får falske positive. De offisielle standardmetodene presiserer også at de ikke gjelder marine lipider, men de benyttes i dag av mangel på alternativer.

Totalmengden av mulige interferenter varierte fra 4-20% i de undersøkte produktene, men det vil aldri være slik at alle disse identifiseres som transfettsyrer med den samme metoden. Fettsyren 20:1  $n-9$  er den av interferentene som ble funnet i klart størst mengde (0.3-16.8%), men det er sannsynligvis liten risiko for at den vil bli feilidentifisert som transfettsyrer siden denne også er til stede i vegetabiliske oljer. 18:1  $n-11$  og 18:4  $n-3$  representerer sannsynligvis det største problemet siden overlapp med transfettsyrer er uunngåelig og fordi disse er til stede i moderate mengder i de fleste marine produkter. Summen av disse to varierte fra 0.4 til 2.3%.

I noen av laksefiletene og i ørretfilet ble det funnet små mengder *trans* 18:2  $n-6$  (0.05-0.11%). Samtlige av prøvene der transfettsyrer ble påvist hadde høye nivåer av 18:1  $n-9$  (12.7-30.3%) og 18:2  $n-6$  (2.9-10.3%), noe som indikerer høy innblanding av vegetabilisk olje i foret og at det er denne som er kilden til transfettsyrene. Grad av isomerisering (andelen *trans* isomerer i forhold til *cis* isomerer) for 18:2  $n-6$  varierte fra 0.5 til 2.9%. Dette er verdier som typisk finnes i vegetabiliske oljer. Eventuelle problemer med små mengder transfettsyrer i laks kan sannsynligvis unngås med en enkel sjekk for transfettsyrer i fôroljene.

Følgende tiltak kan være mulige løsninger for å redusere problemet med falske positive i gasskromatografiske analyser av transfettsyrer:

- 1) I større grad benytte kunnskap om prøvetype til å bestemme hvilke transfettsyrer som skal rapporteres
- 2) Optimalisere dagens metodikk for å minimere overlapp
- 3) Benytte massespektrometrisk deteksjon
- 4) Analysere prøven på to eller flere kolonnetyper
- 5) Fraksjonering av prøven forut for gasskromatografisk analyse
- 6) Bruk av spektrofotometriske teknikker
- 7) 2-dimensjonal gasskromatografi (GCxGC).

Tiltak 1 og 2 er sannsynligvis det enkleste og billigste, men det stiller store krav til den som skal utføre analysen. Det vil også kunne stilles spørsmål ved objektivitet siden hver enkelt prøvetype må vurderes. Enkle regler som kan benyttes er for eksempel at en skal se mer enn en isomer for positiv identifikasjon (transfettsyrer forekommer sjelden alene).

Tiltak 3, eventuelt kombinert med 1 og 2, vil medføre en moderat kostnadsøkning da det må benyttes dyrere utstyr. Det er også begrenset hvor mye ekstra informasjon en får ut av et massespektrometer. Det vil f.eks. være vanskelig å skille mellom 18:3  $n-4$ , 18:1  $n-11$  og transfettsyrene de interfererer med utelukkende basert på et massespekter.

Bruk av to kolonner (tiltak 4) vil kunne gi mye informasjon, men det vil kreve to analyser med høy oppløsning. En mer komplisert tolkning av data vil også være fordyrende.

Tiltak 5 vil sannsynligvis være svært fordyrende og kan derfor vise seg uegnet for rutineanalyser. IR-spektrofotometri (Tiltak 6) kan benyttes til bestemmelse av total mengde transfettsyrer, men følsomheten til denne metoden kan være et problem i forhold til dagens grenseverdier.

Tiltak 7 kan være en god løsning og skal i teorien kunne løse de fleste problemene med interferenter, men GCxGC er i dag ikke rutinemetode ved de fleste laboratorier. Det er også en ny teknikk og det er usikkerhet rundt hvor god separasjon det er mulig å få til mellom cis og trans isomerer.



### **3 Referanse til publisert artikkel**

Detaljerte resultater fra arbeidet er publisert i artikkelen “Trans Fatty Acid Analyses in Samples of Marine Origin: The Risk of False Positives”, Svein A. Mjøs & Bjørn Ole Haugsgjerd, J. Agric. Food Chem., 2011, 59 (8) 3520–3531. Artikkelen kan lastes ned fra: <http://dx.doi.org/10.1021/jf104156v>. Kopi kan fås ved henvendelse til Nofima eller artikkelforfatterne.

