



Karotenoider i gonadene til drøbakkråkebollen, *Strongylocentrotus droebachiensis*.

Ida Jørgensen

Masteroppgave

August 2006



Avdeling for fiskeri- og naturfag
Høgskolen i Bodø



Abstract

The thesis documents the natural variation of the composition of carotenoid pigments, and investigates the correlation between the content of pigments in the food and the composition of pigments in the gonads of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*.

The results include a description of the natural variation in colour and carotenoids content of sea urchin gonads in monthly samples from two locations in Bodø, Northern Norway. The feeding experiment had eight different treatments: two natural diets, the blue mussel, *Mytilus edulis*, and kelp, *Laminaria digitata*; and five formulated feed containing different levels of β,β -caroten and a control treatment with no added pigment.

The gonad samples were analyzed with a high performance liquid chromatograph (HPLC).

The results from the monthly samples showed that male sea urchin contains approximately 100 $\mu\text{g/g}$ more carotenoids than the female sea urchin (male average 300 $\mu\text{g/g}$, female average 200 $\mu\text{g/g}$).

The reference sample taken at the start of the experiment had significantly higher level of carotenoids than the experimental treatments. All experimental treatments had significantly higher levels of carotenoid pigments than the control. The natural diets had intermediate carotenoid level, between the reference sample and the experimental diets. There was no added effect of increasing β,β -caroten levels in the experimental feed from 250 $\mu\text{g/g}$ to 350 $\mu\text{g/g}$. There was a significant correlation between the colour-measurement (L^* , a^* and b^*) and carotenoid content in the gonads.

The gonad index had doubled in all experimental treatments except mussels, from approximately 12,5 % to approximately 25 %. Gonad index in the muscle treatment did not increase significantly.

Forord

Dette er en masteroppgave i havbruk, studieretning sjømat og kvalitet ved Avdeling for fiskeri- og naturfag (AFN), Høgskolen i Bodø (HBO). Oppgaven er på 60 studiepoeng som tilsvarer 1 år av det 2-årige studiet.

Hoveddelen av oppgaven besto i å undersøke karotenoidinnholdet i gonadene til de norske kråkeballen *Strongylocentrotus droebachiensis*.

Oppgavedelen inneholdt også opplæring i isolering og analyse av karotenoidinnholdet i kråkebollegonader.

Først vil jeg takke hovedveilederen min Nils T. Hagen for å ha vært veldig tålmodig, for å ha hjulpet meg med statistikken på resultatene mine, gjennomgått oppgaven min og kommet med god og velbegrunnet veiledning.

Jeg vil også takke Erik Tryggestad og Heidi Ludvigsen for hjelp under prøvetakingene. Det hadde ikke vært mulig å gjennomføre uten dere.

En stor takk til medveilederne mine Einar Skarstad Egeland og Ellen Sirnes for gode råd og innspill.

Jeg vil takke NTNU og Synnøve Liaen-Jensen for standardprøvene som ble gitt til AFN.

Bodø, 1. august 2006

Ida Jørgensen

Sammendrag

Målet med oppgaven var å analysere gonadeprøver fra drøbakkråkebollen, *Strongylocentrotus droebachiensis*, for å finne pigmentsammensetningen. Den naturlige variasjonen i pigmentinnholdet ble dokumentert med månedlige prøver fra to nærliggende lokaliteter.

Sammenhengen mellom innhold av karotenoider i forskjellige dietter og karotenoidinnholdet i gonadene ble dokumentert med prøver fra et fôringsforsøk. Gonadeprøvene ble analysert med en høypresisjonsvæskeskromatograf (HPLC).

Resultatet av de månedlige prøvene viste at karotenoidinnholdet minket fra juli og fram til oktober, og økte igjen til mars. Det var forskjell på karotenoidinnholdet i hunn- og hannkråkebollene. Hannkråkebollene innholdt gjennomsnittlig 100 µg/g mer karotenoider enn hunnkråkebollene. I gjennomsnitt 200 µg/g for hunnkråkebollene og 300 µg/g for hannkråkebollene. Regresjonsmodellen som viser sammenhengen mellom fargemålingene og total mengde karotenoider i gonaden forklarte 59 % av variasjonen. Gonadeindeksen var lavest i juli og økte fram til gytingen i februar/mars.

Total mengde karotenoid og mengde ekinenon i prøvene fra fôringsforsøket viste at innholdet i 0-prøvene, som ble tatt i forkant av fôringen, er signifikant høyere enn alle diettene. For de kunstige diettene var det ingen signifikant forskjell på total mengde karotenoid og mengde ekinenon, unntatt for kontrolldietten uten tilsatt pigment (diett 5). Det vil si at mengde β,β-karoten, mer enn 250 mg/kg, tilsatt i fôret ikke er en begrensende faktor. Kontrolldietten, uten tilsatt pigment, ga signifikant forskjell i karotenoidinnhold i forhold til de øvrige diettene samt 0-prøvene. De naturlige diettene, blåskjell og tare, viste ikke signifikant forskjell fra 0-prøven og de kunstige diettene unntatt kontrolldietten uten tilsatt pigment. Regresjonsmodellen som viser sammenhengen mellom fargemålingene og total mengde karotenoidinnhold forklarte 79 % av variasjonen. Gonadeindeksen var lavest for 0-prøvene og dietten med blåskjell. Alle de kunstige diettene samt taredietten hadde fått fordoblet gonadestørrelsen i forhold til 0-prøven, fra ca. 12,5 % til ca. 25 %.

Innholdsfortegnelse

ABSTRACT	I
FORORD	II
SAMMENDRAG	III
INNHOLDSFORTEGNELSE	IV
1 INNLEDNING	1
2 MATERIALER OG METODER	8
2.1 MÅNEDLIGE PRØVETAKINGER	8
2.2 FØRINGSFORSØK	9
2.3 PRØVETAKING	12
2.3.1 <i>Prøvetakingsprosedyre</i>	12
2.3.2 <i>Fargemåling: spektrofotometrisk og visuell</i>	13
2.4 PRØVEOPPARBEIDELSE	15
2.4.1 <i>Frysetørking av det ferske materialet</i>	18
2.4.2 <i>Ekstraksjon av karotenoider</i>	20
2.5 KJEMISK ANALYSE	22
2.5.1 <i>HPLC</i>	22
2.5.2 <i>UV/VIS-spektrofotometer</i>	27
2.6 KALIBRERING AV HPLC-METODEN	31
2.7 KROMATOGRAMMENE FRA HPLCEN	35
2.8 KJEMIKALIER	36
2.9 DATAANALYSE OG STATISTIKK.....	36
3 RESULTAT	37
3.1 MÅNEDLIGE PRØVETAKINGER	37
3.1.1 <i>HPLC-Karotenoidsammensetningen</i>	37
3.1.2 <i>Fargemålingene</i>	41
3.1.3 <i>Gonadeindeksen</i>	44
3.2 FØRINGSFORSØK	46
3.2.1 <i>HPLC-karotenoidsammensetningen</i>	46
3.2.2 <i>Fargemålingene</i>	51
3.2.3 <i>Gonadeindeksen</i>	54
4 DISKUSJON	56
4.1 KAROTENOIDSAMMENSETNINGEN	56
4.2 GONADEINDEKSEN	58
4.3 FARGEMÅLINGENE.....	60
4.4 VIDERE ARBEID.....	60
5 KONKLUSJON	61
6 LITTERATURLISTE	62
APPENDIKS A: KRÅKEBOLLER	65
APPENDIKS B: STRONGYLOCENTROTUS DROEBACHIENSIS.....	67
APPENDIKS C: FORSØKSPROSEDYRE FOR PRØVETAKING	68
APPENDIKS D: FORSØKSPROSEDYRE FOR EKSTRAKSJON	69
APPENDIKS E: FORSØKSPROSEDYRE FOR KALIBRERING AV HPLC	70
APPENDIKS F: EKSEMPEL PÅ BEREGNING AV MG KAROTENOID FRA UV/VIS-SPEKTROFOTOMETER	71

1 Innledning

I Japan og Frankrike er kråkebollegonader ansett som en delikatesse, og kvalitetsgonader kan oppnå relativ høy pris på markedet (Hagen 1996). Fargen på gonadene er en viktig kvalitetsfaktor. Det er viktig å vite hvor stor naturlig variasjon det er i karotenoidinnholdet og karotenoidfordelingen, da dette er med på å bestemme gonadenes farge. Riktig farge gir best pris.

Denne oppgaven handler om å analysere den naturlige variasjonen, og variasjon som følge av ulik pigmentsammensetning i fôret, på fargen og karotenoidsammensetningen på gonaden til *Strongylocentrotus droebachiensis*, drøbakkråkebollen. Månedlige prøver ble analysert fra juli 2005 til mars 2006. Fra august 2005 til november 2005 ble et fôringsforsøk gjennomført. Appendiks A beskriver kråkeboller generelt og appendiks B beskriver drøbakkråkebollen.

Størrelsen, fasongen og fargen er avgjørende faktorer for det visuelle inntrykket av kråkebollegonader (Hagen 1999). Avhengig av markedets preferanser kan fargen på gonaden gå fra lys gul til mørk oransje eller nesten rød. Gonader som er lyse, bleke, brunaktige eller misfargede er ikke ønsket på markedet (Robinson et al. 2002) og har derfor liten verdi (Hagen 1999).

Det er betydelig interesse i å kunne forbedre fargen på gonadene til kråkebollene for å oppnå bedre markedspris (Hagen 1999). Egenskapen til gonadene som hovedlagringsorgan for næringsstoffene i kråkeboller og deres evne til å reagere på mat av forskjellig kvalitet, kan utnyttes til kvalitetsforbedring ved oppforing av villfangende kråkeboller (Pearce et al. 2002), eller ved intensivt kråkebolleoppdrett (Hagen 1999).

Karotenoider er vidt utbredt og naturlig forekommende, vanligvis røde, oransje eller gule i farge (Britton et al. 1995a). De er ofte funnet blant sjø-innvertebrater og gir dem fargen deres (Borisovets et al. 2002). En av hovedrollene til karotenoider i organismer er lysabsorpsjon slik som i fotosyntesen, lysbeskyttelse, vekstrespons til plantedeler ved påvirkning av lyset, fotoresepsjon og kamuflasjeeffekter for å skjule seg for fiender (Britton et al. 1995a).

Karotenoider dannes ved at åtte molekyler, av en grunnleggende enhet med 5 karbonatomer (isopren-enheten), sammenkobles og danner et skjelett med 40 karbonatomer. Dette C 40-skjelettet er symmetrisk om midten. Det asykliske hydrokarbonet lykopen kan bli sett på som prototypen til karotenoidene. Andre karotenoider kan bli dannet etter strukturelle forandringer eller modifikasjoner på en halvdel eller begge halvdelene til molekylet. β,β -karoten er for eksempel et resultat fra syklisering av begge endegruppene til lykopen (Britton et al. 1995a).

Karotenoider får farge på grunn av absorpsjon av lys. Dette kommer av et karakteristisk element som kalles kromoforen. Alle karotenoider, for eksempel lykopen og β,β -karoten, har et konjugert system av karbon-karbon dobbeltbindinger, det vil si en sekvens av alternerende dobbelt- og enkel- karbon-karbon bindinger. Det er mulig å ha opptil 15 konjugerte dobbeltbindinger i kromoforen til et C 40 karotenoid, men strukturer med 7 til 11 slike bindinger er mer vanlig (Britton et al. 1995a).

De fleste karotenoidene inneholder en eller flere oksygenfunksjoner. Alle karotenoidene som inneholder oksygenfunksjoner kalles xantofyller. Hydroksygrupper (OH) er vanlig, spesielt i 3-posisjon eller 4-posisjon. Mange karotenoider inneholder en epoksygruppe, vanligvis i 5,6-posisjon. Det går også mulig å finne aldehyd (CHO), ketoner (C=O), karboksylsyrer (CO₂H), metoksider (OMe) og acetater (OCOMe) (Britton et al. 1995a).

Karotenoider kan også bestå av geometriske isomere, det vil si *cis/trans*-isomere (Z/E). Karotenoider kan altså eksistere i to former. En annen type isomeri er optisk isomere. Der kan et molekyl som inneholder et asymmetrisk karbonatom, det vil si et karbonatom der fire forskjellige atomer eller grupper er festet, eksistere i to forskjellige stereoisomeriske former. Disse to konfigurasjonene er speilbildeformer av hverandre (Britton et al. 1995a).

Alle systematiske navn er basert på stammenavnet "karoten". Navnet på et spesifikt karotenoid blir dannet ved å sette to greske bokstaver som prefikser til stammenavnet. De greske prefiksene skal stå i alfabetisk rekkefølge og være separert fra hverandre med komma. Prefiksene er satt sammen med stammenavnet med en bindestrek, for eksempel β,β -karoten. Elles så gjelder vanlige navnssettingsregler for organiske komponenter (Britton et al. 1995a).

Karotenoider har spesielle egenskaper som reflekter den kjemiske strukturen. Disse egenskapene bestemmer hvilke forholdsreglene som må tas i alt arbeid med karotenoider (Britton et al. 1995a).

- a) Farge: Det mest karakteristiske strukturelle trekket, som er ansvarlig for den observerte fargen til karotenoidet er konjugerte polyenkjeder. Deres sterke lysabsorpsjon gjør at karotenoider er synlig i kun μg for menneskets øye. Tap eller forandring i farge gir en umiddelbar og følsom advarsel om dekomponering eller strukturell modifikasjon. Den intense absorpsjonen gir også grunnlag for kvantitativ bestemmelse av karotenoider.
- b) Stabilitet: Polyenkjeden er i stor grad ansvarlig for ustabiliteten til karotenoider, deres følsomhet for oksidasjon av luft eller peroksider, tiltrekning av elektrofiler inkludert H^+ og Lewissyre, og E/Z isomerer forårsaket av varm, lys eller kjemikalier. Noen karotenoider er ustabile i tilstedeværelse av syre. Noen karotenoider er ustabile mot baser.
- c) Løselighet: Karotenoider har generelt god løselighet i aceton eller aceton/metanolblandinger. Siden aceton og metanol er blandbar med vann er disse de løsemidlene som blir mest brukt til ekstraksjon fra biologisk materiale som inneholder vann. Ellers, så gjelder regelen likt løser likt. Karotenoider er også løselige i løsemidler med lav polaritet slik som heksan og toluen. Karotenoider er løselig i mer polare løsemidler inkludert etanol og pyridin. Dietyleter, aceton, karbondisulfat og etylacetat er gode løsemidler for karotenoider generelt. Krystallinske karotenoider kan være vanskelig å løse i disse løsemidlene, men løses generelt i benzen og diklormetan.

Skadelige effekter for karotenoider er oksygen, varme, lys og syre. Generelle forholdsregler som følges ved arbeid med karotenoider er (Britton et al. 1995a):

- a) Atmosfære: utestengning av oksygen. Inert atmosfære er ønskelig og fåes ved å erstatte atmosfærisk luft med vakuüm eller inert gass (N₂ eller Ar). Alle løsninger blir blåst over med en inert gass. Det er vanligvis ikke nødvendig å boble gass gjennom løsningen.
- b) Antioksidanter: Tilsetninger av antioksidanter i løsninger for lagring kan noen ganger være fordelaktig. Flere antioksidanter, for eksempel butylert hydroksytoluen (BHT), pyrogallol eller ascorbylpalmitat, er vanlig å bruke for å beskytte karotenoider under forsåpning.
- c) Temperatur: Uønskede reaksjoner, spesielt E/Z isomering, blir fremmet under høye temperaturer. Derfor bør analysen foregå under lavest mulige temperatur. Ekstraksjon utføres ved romtemperatur eller lavere. Løsemiddel med lavt kokepunkt foretrekkes. Store volumer av løsninger blir konsentrert under redusert trykk i en rotasjonsfordamper med vannbadtemperatur under 40 °C og aldri ved vanlig destillasjon. Små volum konsentreres eller fordampes ved en direkte svak strøm med nitrogen eller argon. Løsninger bør lagres ved – 20 °C.
- d) Lys: Sollys må unngåes, og alle operasjoner bør gjøres i diffust dagslys eller dempet kunstig lys. Utstyr som kromatografikolonner, kammer for TLC-kromatografi og rotasjonsfordamperen bør bli dekt av svart tøy eller aluminiumsfolie. Reaksjoner bør gjøres i mørke, inne i et skap.
- e) Syre og base: En generell regel er at kontakt med syre bør bli unngått hvis ikke syre er nødvendig for en bestemt reaksjon. Sterke syrereagenter bør ikke bli brukt i laboratorier som har med karotenoider å gjøre. Baser bør også bli unngått når det er en risiko at noen karotenoider kan bli basestabil.

Den gul-oransje fargen til kråkebollegonaden kommer hovedsakelig fra ekinenon (Robinson et al. 2002), som også er det viktigste karotenoidet i kråkeboller (Lawrence et al. 2003). Ekinenon var det første karotenoidet som ble isolert fra kråkeboller (fra kråkebollearten *Paracentrotus lividus*), og det finnes i gonadene til mange kråkebollearter. Ekinenon sammen med β,ϵ -karoten-4-on har blitt isolert som hovedkarotenoid i gonadene til de fleste kråkebollene (Matsuno & Tsushima 2001). Men β,β -karoten er det dominerende karotenoidet i gonadene til *Prionocidaris baculosa*, *Phyllacanthus dubius* og *Eucidaris metularia*, den mest primitive kråkebollegruppen som ikke har noen spiselige arter (Tsushima et al. 1993a). Det høye innholdet av karotenoider i gonadene bekrefter behovet for karotenoider i den reproduktive syklusen. Blant annet har ekinenon vist seg å være viktig i modning av egg og overlevelse av larver (Borisovets et al. 2002).

I tarmen til kråkebollene er β,β -karoten, fukoxantin, fukoxantinol og fukoxantinolestere de vanligste hovedkarotenoidene (Matsuno & Tsushima 2001).

Vanligvis vil dyr få deres karotenoider enten ved selektivt opptak av karotenoidene gjennom maten, eller ved å omgjøre karotenoidene i maten til relaterte karotenoider. Ekinenon kan bli utledet fra karotenoidet β,β -karoten via isokryptoxantin i gonadene. Metabolismen til karotenoidene i kråkebollene har blitt undersøkt ved hjelp av fôringsforsøk der individer ble foret med en kontrolldiett uten karotenoider eller eksperimentelle dietter innholdende enten β,β -karoten, kantaxantin eller astaxantin. I gruppene som ble foret med karotenoider økte den totale mengden med karotenoider i gonaden per individ med hhv. 6.3, 3.8 og 2.3 ganger i forhold til kontrollen. Resultatene av forsøket viste en oksidativ metabolsk overgang av β,β -karoten til ekinenon via isokryptoxantin i tarmen til *Pseudocentrotus depressus*. Det var ikke en slik overgang for gruppene som ble foret med kantaxantin og astaxantin (Tsushima et al. 1993b).

En kunstig diett med tilsats av β,β -karoten og ekinenon oppnådde maksimalt utbytte av høykvalitetsgonader med gul-oransje farge foretrukket av markedet og med en positiv effekt på overlevelse av larvene og voksne kråkeboller (Matsuno & Tsushima 2001). McLaughlin & Kelly (2001) viste ved et fôringsforsøk med tre kunstige dietter, tilsatt forskjellige alger, at fargen på gonaden ble forbedret og i tillegg økte gonadeindeksen. Et annet fôringsforsøk med arten *Paracentrotus lividus* ga lysere gonader ved bruk av kunstige dietter enn for kråkeboller som var fôret med en algediett. Også i dette forsøket økte gonadeindeksen for de som var fôret med kunstige dietter (Shpigel et al. 2005). Utvikling av kunstige dietter med kjente næringsstoffer som forbedrer eggkvaliteten, larveutviklingen, yngelstørrelsen og kvalitet vil bli et viktig gjennombrudd i kråkebolleakvakultur og bruken av kråkebolleegg som modeller i utvikling og molekylære studier (George et al. 2001).

I tillegg til karotenoidene som finnes i gonade og tarm hos kråkeboller finnes det en annen type pigmenter i skallet. Disse pigmentene kalles naftakinoner. Pigmentene forekommer prinsipielt som kalsium- og magnesiumsalter, og kan isoleres med behandling med hydrogenklorid og eter. De fleste arter inneholder opptil 6 pigmenter, men spor av andre komponenter kan være tilstede. Innhold kan variere mye fra dyr til dyr, noen som resulterer i store variasjoner innenfor populasjonen. De mest vanlige naftakinonene i kråkeboller er spinokrom A-E og ekinokrom A (Thomson 1971). I følge resultater fra Anderson, H. A., et al. (1969) inneholder *S. droebachiensis* spinokrom A, C, D og E. Kol'stova, et al. (1978) har også funnet ut at *S. droebachiensis* inneholder spinokrom A, C, D og E, samt en forbindelse som er identifisert som etyliden-6,6'-bis(2,3,7-trihydroksynaftazarin).

Hovedpigmentet i gonadene til *S. droebachiensis* er karotenoidene β,β -karoten og ekinenon (> 70 %, (Griffiths & Perrott 1976). Hos *S. droebachiensis* er ikke ekinenon påvist i tarmen, men både isokryptoxantin og ekinenon er påvist i ovariene. Dette tyder på at ekinenon hos denne kråkebollen blir dannet fra β,β -karoten i ovariene og ikke i tarmen (Tsushima et al. 1993b).

I en artikkel av Lamare & Hoffman (2004) ble gonader til *S. droebachiensis* analysert med HPLC for å finne karotenoidsammensetningen. I samme artikkelen ble det benyttet metoder for isolering av karotenoider som kan ha påvirket resultatene de kom fram til. Hovedproblemet med metoden var at det var brukt kaliumhydroksid under opparbeidelsen, samt at prøvene ble oppbevart i romtemperatur. Dette vil kunne endre karotenoidsammensetningen og resultatene fra HPLC-analysene.

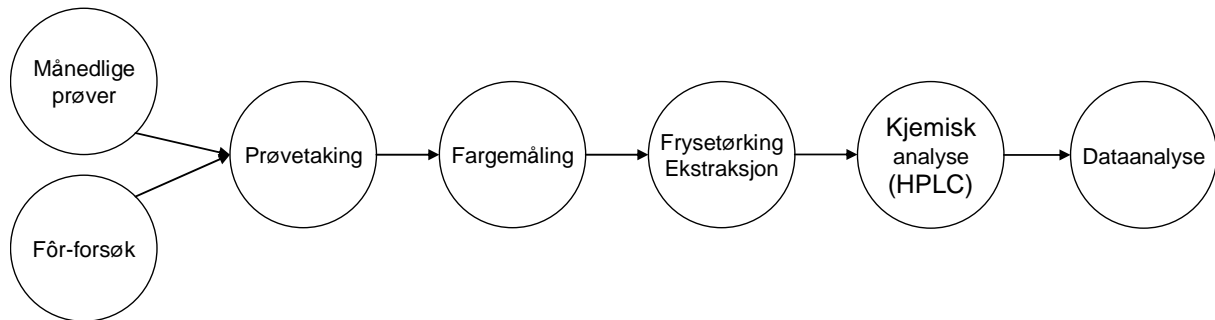
Lamare & Hoffman (2004) tok prøver av 10 individer per måned, men skiller ikke mellom hann og hunn. Senere i artikkelen tar de et prøveuttak der de skiller mellom kjønnene. I denne analysen kommer de fram til at det er store forskjeller mellom kjønnene. I tillegg sier de at det er høyere total karotenoidkonsentrasjon i hannkråkebollene enn i hunnene. Dette bidrar til at det var mye uforklart variasjon i resultatene.

Hensikten med denne oppgaven er å dokumentere den naturlige variasjonen i pigment-sammensetningen til kråkebollene, og undersøke sammenhengen mellom pigmentinnholdet i fôret og pigmentsammensetningen i gonadene.

Prosjektet med månedlige prøver beskriver den naturlige sesongvariasjonen i farge og karotenoidsammensetningen i gonadene hos hann og hunn kråkeboller fra to nærliggende lokaliteter i Nord-Norge. I prosjektet med fôringsforsøket analyseres resultatene fra kontrollert fôring med 6 ulike tørrfôrblandinger og to naturlige dietter (tare og blåskjell).

2 Materialer og metoder

Gonader og tarm ble tatt ut fra kråkebollen *S. droebachiensis*. Det ble tatt både månedlige prøvene og prøver fra et føringsforsøk. Figur 2.1 viser en oversikt over hva som gjøres med prøvene. Under prøvetakingen ble fargen på gonadene målt mot et fargekart og med et Minolta Chromameter CR-300.

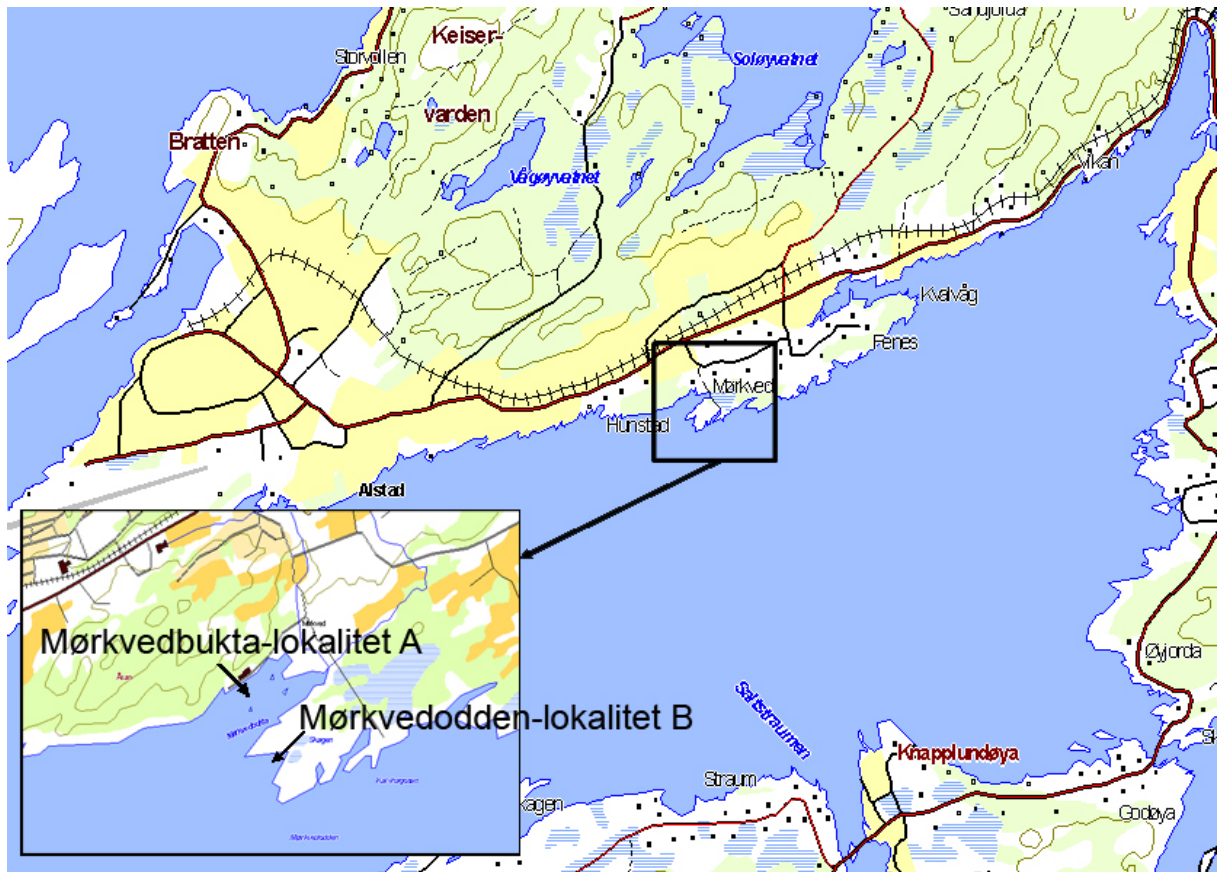


Figur 2.1 Elementer i prøvetaking og bearbeiding av prøvene.

Etter prøvetakingen ble prøvene frosset ned ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, og deretter ble prøvene frysetørket. Karotenoider fra gonadene ble ekstrahert ved å bruke aceton. Ekstraktet fra ekstraksjonene ble analysert med høypresisjonsvæskeskromatografi (HPLC). Dataen fra Minolta Chromameter og HPLC ble videre analysert med statistikkprogrammet JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc. 2005).

2.1 Månedlige prøvetakinger

Prøvetakingen for de månedlige prøvene startet i juli 2005 og siste prøvetaking var i mars 2006. For hver prøvetaking ble det tatt opp kråkeboller fra 2 nærliggende lokaliteter, A og B. A-lokaliteten var inne i Mørkvedbukta og lokalitet B var litt lenger ut, på Mørkvedodden. Lokalitet A lå i et beskyttet område innenfor en molo, mens lokalitet B lå mer utsatt til. Figur 2.2 viser hvor lokalitetene ligger.



Figur 2.2 Kart som viser lokalitetene (A og B) der de månedlige prøvene er tatt opp (Med tillatelse fra Bodø Kommune 2006).

Fra hver lokalitet ble det tatt prøver fra 5 hanner og 5 hunner, det vil si totalt 20 kråkeboller. Dersom noen av kråkebollene var infisert med nematoden *Echinomermella matsi* (Jones & Hagen 1987, Hagen 1987) ble det tatt en ny prøve.

I juni 2005 ble det utført et pilotforsøk for å sjekke om systemet for prøvetakingen fungerte. Under dette forsøket ble det glemt å måle farge med Minolta Chromameter fordi at dette punktet manglet i sjekklisten. Etter at dette var justert fungerte oppsettet bra.

2.2 Fôringsforsøk

Fôringsforsøket besto av totalt 8 dietter, 6 av disse var kunstige og besto av pellets. De 2 siste var naturlige og besto av tare (*Laminaria digitata*) og dyrkede blåskjell (*Mytilus edulis*). Diettene ble produsert på Scottish Association for Marine Science (SAMS) og ble laget etter oppskrifter fra Robinson et al. (2002), men med forskjellig lipid og pigmentinnhold (tabell 2.1). Hver diett hadde tre replikater, det vil si at hver diett ble føret i 3 forskjellige kasser med kråkeboller, til sammen 24 kasser.

Tabell 2.1 Oversikt over hvilke dietter som ble brukt i fôringsforsøket.

Diettnr.	Grunddiett	Pigmentkilde	Mengde pigment per kg	Fordeling av diettene i kassene	Kommentarer
1	*SABS	Algro™	100 mg	7, 16 og 23	Lavt nivå av pigment
2	SABS	Algro™	250 mg	3, 15 og 22	Middels nivå av pigment
3	SABS	Algro™	350 mg	11, 19 og 21	Høyt nivå av pigment
4	SABS med høyt lipidinnhold	Algro™	250 mg	4, 13, og 14	Middels nivå av pigment
5	SABS	Ingen	-	1, 10 og 17	
6	SABS	Ingen	-	5, 12 og 18	<i>Laminaria</i> ble fôret i siste tredjedel av fôringsforsøket
7	Tare, <i>Laminaria digitata</i>	Naturlig	-	6, 20 og 24	
8	Blåskjell, <i>Mytilus edulis</i>	Naturlig	-	2, 8, og 9	

* St. Andrews Biological Station (Robinson et al. 2002)

Kassene ble merket med nummer og hvilken diett som skulle brukes, for deretter å bli plassert i randomisert rekkefølge i et stativ på 3 etasjer (figur 2.3). For å finne den randomiserte rekkefølgen ble DOE-modulen til statistikkprogrammet JMP in 5.1 (SAS Institute Inc. 2005, N.T. Hagen personlig kommunikasjon) brukt.

Kasse nummer 1 ble plassert øverst til venstre, og de andre fulgte etter mot høyre. På hver etasje var det 8 kasser. Kassene ble merket med laminerte lapper med nummer til kassen og hvilken diett som skulle brukes.

Hver kasse hadde sin egen vanntilførsel og lufttilførsel ved hjelp av en luftestein. Vannet var sjøvann fra 250 meters dyp, hentet fra HBOs sjøvannsanslegg. Vannet var grovfiltret, med filter på 200 µm, og hadde en stabil temperatur på ca. 7 °C. For å få luft inn ble det brukt en lavrykkskompressor (blower).



Figur 2.3 Oppsett av kassene i stativet for fôringsforsøket. Hver kasse har egen lufttilførsel via luftstein og egen vanntilførsel.

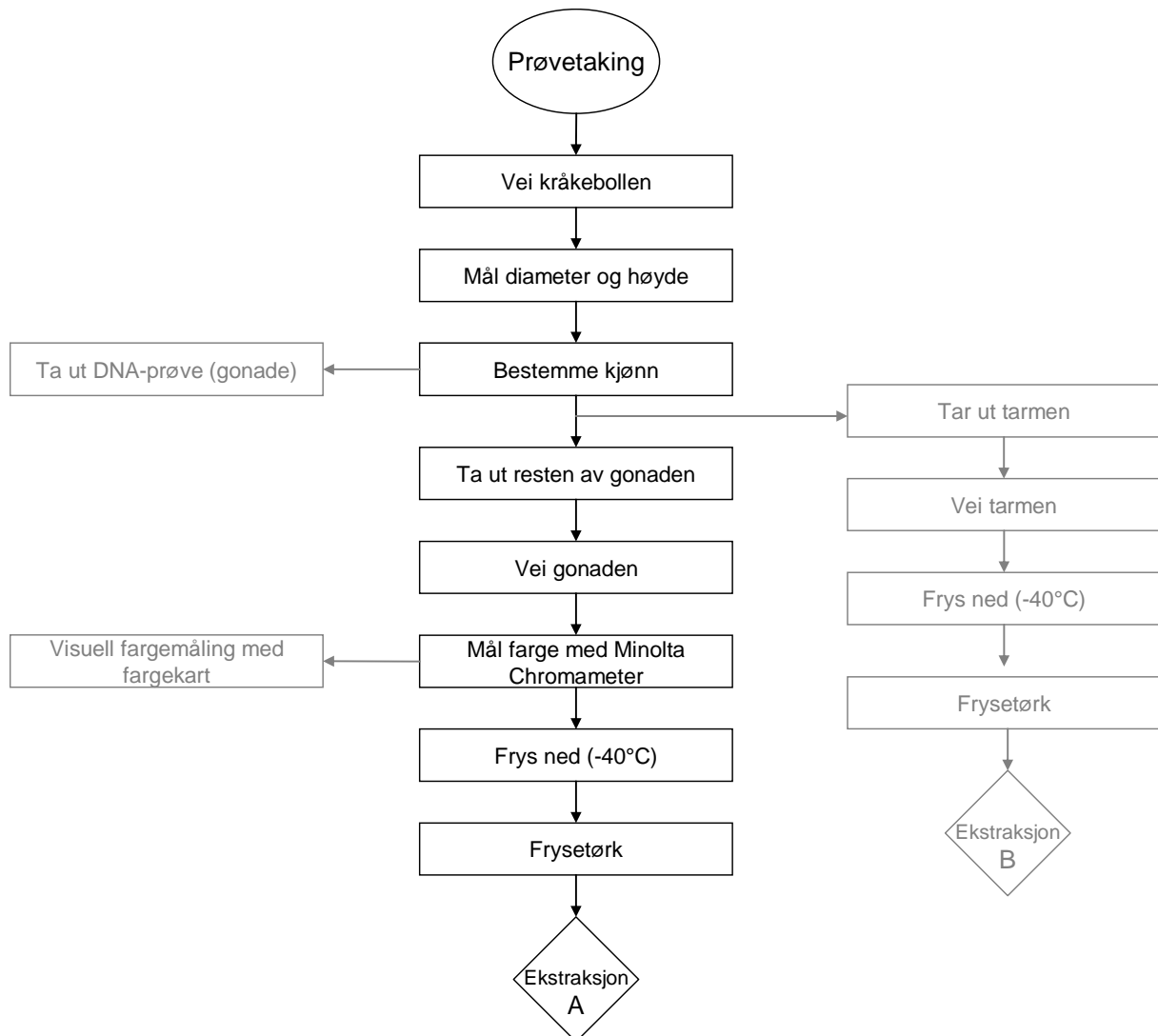
I hver kasse var det 15 stk. kråkeboller, det vil si at det totalt var 360 kråkeboller med på forsøket. Disse var blitt sultet i 14 dager før selve forsøket startet. Selve forsøket hadde en varighet på 12 uker. Kun 3 av 360 kråkeboller døde i løpet av forsøket.

Ved forsøksstart ble det tatt ut 45 kråkeboller som også hadde sultet i 14 dager. Disse utgjorde referansegruppen i fôringsforsøket.

Da forsøket var ferdig og mens prøvetakingen foregikk, fra 1 til 13 dager, ble kassene plassert på kjølerom ved ca. $-1,8^{\circ}\text{C}$. Hver kasse hadde da egen lufttilførsel ved hjelp av en luftstein. Vannet ble byttet ut med jevne mellomrom.

2.3 Prøvetaking

Figur 2.4 viser en oversikt over forløpet i prøvetakingen. Etter prøvetakingen går gonade- og tarmprøvene videre til hhv. ekstraksjon A og ekstraksjon B.



Figur 2.4 Prinsippskisse over prøvetakingsprosessen fram til ekstraksjonen. De grå rutene er blitt utført, men inngår ikke i oppgaven.

2.3.1 Prøvetakingsprosedyre

Hver kråkebolle ble veid og diameter og høyde ble målt. Det ble bestemt kjønn, tatt ut DNA-prøve fra gonaden, samt veid resten av gonaden og tarmen.

Kråkebollen ble veid på en analysevekt med 2 desimaler. Før den ble lagt på vekten fikk den renne av seg sjøvann på et tørkepapir, ca. 30 sekunder. Alle andre veiinger ble også gjort med denne vekten. Diameteren og høyden ble bestemt ved å bruke skyvelære.

Etter at målingene var ferdige ble kråkeballen åpnet. Til dissekeringen ble det brukt pinsetter for å åpne den, og for å ta ut gonade og tarm. I tillegg ble det brukt plastteskjeer for å ta ut gonaden. Etter at munnapparatet (Aristoteles lanterne) var tatt ut ble det tatt ut en liten prøve av gonaden, ca. 0,5 g, som vil bli brukt til DNA-testing i et annet prosjekt. Denne prøven ble veid og vekten notert. Av denne DNA-prøven ble en liten prøve tatt ut for å bestemme hvilket kjønn det var. DNA-prøven ble lagret i absolutt etanol.

Kjønnnet ble bestemt ved å bruke et mikroskop. Det ble brukt 40x forstørrelse for å se hvilket kjønn det var. Den letteste måten å se hvilket kjønn kråkeballen hadde var å se om prøven inneholdt sperm. Hvis den ikke inneholdt sperm ble det sett om det var eggceller i prøven.

Etterpå blir resten av gonade tatt ut. Tarmen ble også tatt ut. Både tarm og gonade blir skylt i sjøvann for å få bort eventuelle rester av avføring. Gonaden ble lagt på et tørkepapir og tarmen ble lagt i en liten sil. Dette var for å få bort vannet på overflaten. Tarmen ble lagt i en liten sil fordi den ble sittende fast i papiret da den var tørr. Appendix C inneholder en prosedyre for prøvetakingen.

2.3.2 Fargemåling: spektrofotometrisk og visuell.

I oppgaven ble det gjort en fargemåling av gonaden, både spektrofotometrisk og visuell. For den spektrofotometriske fargemålingen ble det benyttet en Minolta Chromameter CR-300, og i den visuelle fargemålingen ble det brukt et fargekart.

Minolta Chromameter (figur 2.5) kan måle farge i fem forskjellige fargesystemer, for eksempel Y_{xy} , $L^*a^*b^*$ og Hunter Lab (Minolta Camera Co. 1991). I denne oppgaven er det for fargemålingen brukt $L^*a^*b^*$ Color System som er utviklet av Commission Internationale de l'Eclairage 1976 (CIE 1976). Denne metoden gir tre verdier, L^* , a^* og b^* , der L^* verdien representerer lyshet ($L^*=0$ for svart, $L^*=100$ for hvit), a^* skalaen representerer rød/grønn, $+a^*$ intensiteten er rød og $-a^*$ intensiteten er grønn. b^* skalaen representerer gul/blå, $+b^*$ intensiteten er gul og $-b^*$ intensiteten er blå.



Figur 2.5 Fargemåleren Minolta Chromameter CR-300 som ble brukt for spektrofotometrisk fargemåling av kråkebollejonadene.

Før selve målingen av farge startet ble instrumentet kalibrert mot en hvit plate. Til målingen av fargen på gonaden ble det benyttet et lystett målekammer (figur 2.6), ”Granular-Materials Attachment CR-A50 (Minolta Camera Co. 1991). Målekammeret ble fylt med prøvemateriale og glasset og ringen ble lagt på. I kammeret ble det lagt en innleggsplate på grunn av at det noen ganger er lite materiale. Tidligere målinger av denne platen viste at den ikke har noen betydning for resultatet (N.T. Hagen personlig kommunikasjon). Kammeret måtte være litt overfylt for at det ikke skulle bli luft under glasset. Prøven ble målt fem ganger mens håndtaket samtidig ble dreid rundt. Dette var for å få et mål på variasjonene i fargen på gonadene.



Figur 2.6 Lystett kammer som ble brukt under fargemålingene. Kammeret ble fylt med gonademasse og Minolta Chromameteret CR-300 ble brukt til å måle fargen.

Fargekartet (figur 2.7) som ble brukt for å vurdere fargen visuelt besto av farger med en tallkode på som ble notert i tabellen. Det var bare fargene fra 109 til 121 og 126 som ble brukt. Ingen av fargene på fargekartet stemte helt overens med fargene på gonaden til kråkebollene. Resultatene fra dette er derfor ikke tatt med i denne oppgaven. Det vil i ettertid, av hovedveileder, bli laget et fargekart som stemmer bedre overens med fargene til gonadene.



Figur 2.7 Fargekartet som ble brukt for visuell måling av fargen på gonaden.

2.4 Prøveopparbeidelse

For å finne ut den beste måten å ekstrahere ut karotenoider på ble det gjennomført en serie pilotforsøk. Allerede i januar 2005 ble det begynt med ekstraksjon av ferskt gonademateriale på ca. 3,0 g med 10 ml aceton.

Generelt for alle pilotforsøkene var at ekstraktet etter kort tid (< 1 min) ble farget oransje. Etter ekstraksjonen ble prøven dampet inn ved hjelp av en rotasjonsfordamper (figur 2.8).



Figur 2.8 Rotasjonsfordamperen som ble brukt for å dampe inn prøver med store mengder (> 3 ml) løsemiddel under ekstraksjon av karotenoider fra kråkebollegonader.

Alle prøvene som ble ekstrahert fra ferskt materiale inneholdt mye fett. Prøvene ble derfor filtrert flere ganger, og også oppbevart i fryseren for at fettene skulle felles ut. Disse prøvene ble også analysert på UV/VIS-spektrofotometer for å få et foreløpig estimat av det totale innholdet av karotenoider som finnes i gonadene. For å finne innholdet av karotenoider ble formelen for å beregne mg karotenoider (formel 2.2) brukt.

I mai 2005 ble det testet ut hurtigekstraksjon av karotenoider. Det ble veid ut gonadeprøver på ca. 1,0 g og det ble testet ut ved å bruke 5 ml aceton i ekstraksjonen. Prøven ble ekstrahert 4 ganger, og den siste ekstraksjonen ga ingen farge på ekstraktet. Det var enda litt farge igjen på gonadeprøven etter fjerde ekstraksjon, og det ble tilsatt saltsyre (3M, 1ml) for å sjekke om det kunne være naftakinoner. Ingen farge kom ut.

Det ble også prøvd å ekstrahere ved å bruke 2 ml og 1 ml aceton for samme mengde gonade, ca. 1,0 g. I denne ekstraksjonen ble prøvene satt i fryseren natten over. Ekstraksjonen med 2 ml trengte 8 ekstraksjoner og den med 1 ml ble avsluttet etter 8 ganger fordi det enda var mye farge igjen på gonadeprøven.

Det ble nå bestemt at det skulle brukes frysetørket materiale istedenfor ferskt. Vannet vil da bli borte fra ekstraksjonen, noe som gir en lettere ekstraksjon. Testet først med ca. 0,05 g gonade- og tarmprøve og 1 ml aceton. I tillegg ble det testet ved å skifte aceton hver halv time, hver andre time og å vente til dagen etter. For hver ekstraksjonsmetode ble det også testet å la prøven stå i romtemperatur (ikke for den som står natten over), i kjøleskap og i fryseren. Halvtimesekstraksjon av gonadeprøvene brukte 5 ekstraksjoner for romtemperatur og kjøleskap og 7 ganger for ekstraksjon i fryseren. For 2 timers ekstraksjon ble prøven ekstrahert 3 ganger for romtemperatur og 4 ganger for kjøleskap og fryser. Prøvene som ble ekstrahert over natten trengte 3 ekstraksjoner både for kjøleskap og fryser. For alle de siste ekstraksjonene var fargen blank på siste ekstraktet.

Ved undersøkelser for å ekstrahere karotenoider fra tarm var den beste metoden å ekstrahere 3 ganger med en blanding med 30 % metanol og 70 % aceton og å la den stå natten over i kjøleskap. Ekstraksjon av karotenoider fra tarm er kun gjort for å få en oversikt over hva innholdet av karotenoider er i den. Det viste seg å være veldig komplisert, og derfor er ikke ekstraksjon av karotenoider i tarm en del av min oppgave.

Den beste metoden for ekstraksjon av karotenoider fra gonader var å ekstrahere to ganger med 1 ml aceton, hver gang sto prøvene over natten i kjøleskapet, det vil si at ekstraksjonene tok 2 døgn.

2.4.1 Frysetørrking av det ferske materialet

Etter pilotforsøk med ferskt materiale ble det besluttet at prøvene skulle frysetørkes fordi ekstraksjonen ville bli lettere fordi det første trinnet i en ekstraksjon av ferskt materiale vil for det meste bestå av vann. Prøven ble frysetørket med frysetørkeren Hetosicc CD2,5 (figur 2.9).



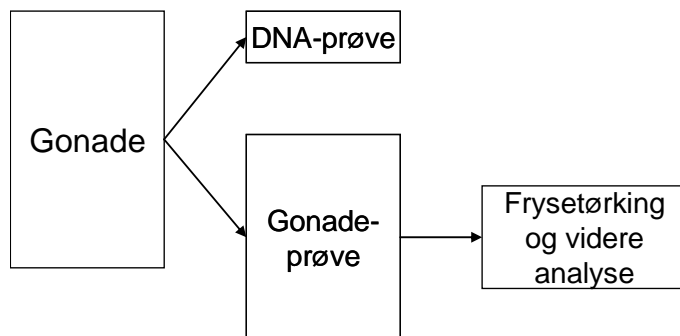
Figur 2.9 Frysetørkeren Hetosicc CD 2,5 som ble brukt for å frysetørke gonadeprovne fra kråkebollene.

Ved å frysetørke prøvene ville vannet bli borte og også første trinn i ekstraksjonen. Alle prøvene ble derfor frysetørket, både gonade og tarm. Ved å veie prøvene etter at frysetørrkingen var ferdig var det mulig å finne tørrvekten til gonadene og tarmen. Prosent vann i gonadene ble bestemt ved å bruke følgende formel (formel 2.1):

Formel 2.1 Formel for beregning av prosentandel vann i gonadeprovne.

$$\% \text{vann} = \frac{(\text{vekt fersk prøve}) - (\text{vekt tørket prøve})}{(\text{vekt fersk prøve})} \cdot 100$$

Av gonaden ble det først tatt ut en DNA-prøve, før resten av gonaden ble tatt ut (figur 2.10). For enkelte av prøvene ble ikke DNA-prøven tatt ut først, før gonaden ble veid. Slik at det ikke er notert en separat vekt for den. For prøvene for juli ble det notert ned separat vekt for nesten alle prøvene. Prøvene der vekten ikke var notert var B032, B034, B035 og B037. Det ble heller ikke notert vekt for DNA-prøven for august-, september-, oktober- og november-uttakene. For desemberprøvene var det kun for A185 at vekten ikke ble notert. I januar var det B214 og B217 og for februar var det B246–B248. For 0-prøver og kasse 1 i fôringsforsøket ble det ikke tatt ut notert separat vekt for DNA-prøven. Deretter ble DNA-prøven tatt ut først og vekten på den skulle noteres separat. Vekten på DNA-prøven ble inkludert i kolonne for gonadevekt i tabellen. For disse prøvene kunne ikke vanninnholdet bestemmes eksakt. Men det ble beregnet en gjennomsnittsverdi for vekten på DNA-prøvene for å få et omtrentlig vanninnhold.



Figur 2.10 Oppdelingen av gonaden fra kråkebollen i DNA-prøve og den gonadeprøven som skal brukes til videre analyse.

Etter prøvetaking ble prøvene frosset ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. De lå på fryseren minimum 3-4 dager før de ble frysetørket. Prøvene ble vanligvis frysetørket i ca. 24 timer, men hvis det var mange prøver samtidig (> 40 stk.) ble de frysetørket opptil 72 timer.

Karotenoider bevares best i det naturlige miljøet for korte perioder. For lengre lagring er det nødvendig å stoppe skadelige enzymatiske reaksjoner som kan lede til ødeleggelse av det biologiske materialet og karotenoidene. Hvis det ikke er mulig å opparbeide det ferske materiale med en gang etter høsting må det bestemmes hvordan materialet skal lagres (Britton et al. 1995a).

Det finnes flere forskjellige metoder: dypfrysing, lufttørring og frysetørring. Ved dypfrysing blir det ferske materialet frosset hurtig i aceton/fast CO₂ eller flytende nitrogen, for å hindre enzymatiske reaksjoner som kan endre karotenoidsammensetningen. Lufttørring blir ikke anbefalt på grunn av mulige oksidative degraderinger og tap av karotenoider. Frysetørring er den metoden som foretrekkes for å dehydrere ferskt materiale for lagring fordi ingen enzymatiske reaksjoner vil skje i tørr tilstand (Britton et al. 1995a).

2.4.2 Ekstraksjon av karotenoider

Gonadeprøver

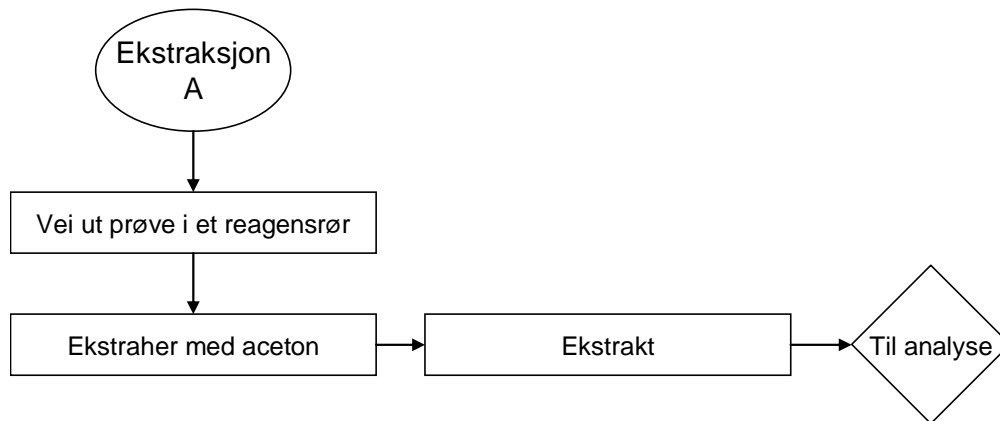
Ekstraksjonen startet med at gonaden ble homogenisert i prøveglasset med en plastteskje, og ca. 0,05 g ble veid ut i et reagensrør.

Til prøven ble det overført aceton (1 ml) ved hjelp av en automatpipette. Prøvene ble plassert i kjøleskapet natten over under ekstraheringen. Ekstraktene fra hver prøve ble samlet opp i et reagensrør. Etter ekstraheringen ble ekstraktet dampet inn med inndamperen, TurboVap[®] LV evaporator (figur 2.11), til den var tørr. Da den var tørr ble den tatt ut av inndamperen og tilsatt aceton (0,5 ml) ved hjelp av en automatpipette. Det er kun prøvene som er analysert fra januar 2006 som er blitt dampet inn. Dette er fordi det var først i januar 2006 det ble anskaffet en inndamper med nitrogengass til avdelingen. Det hadde tidligere vært diskutert om prøvene skulle dampes inn for å gi en høyere konsentrasjon (mAU) ved HPLC-analysene.



Figur 2.11 Inndamperen TurboVap[®] LV evaporator som ble brukt for å dampe av mindre mengder løsemiddel (< 3ml) fra ekstraktet etter ekstraksjon av karotenoider.

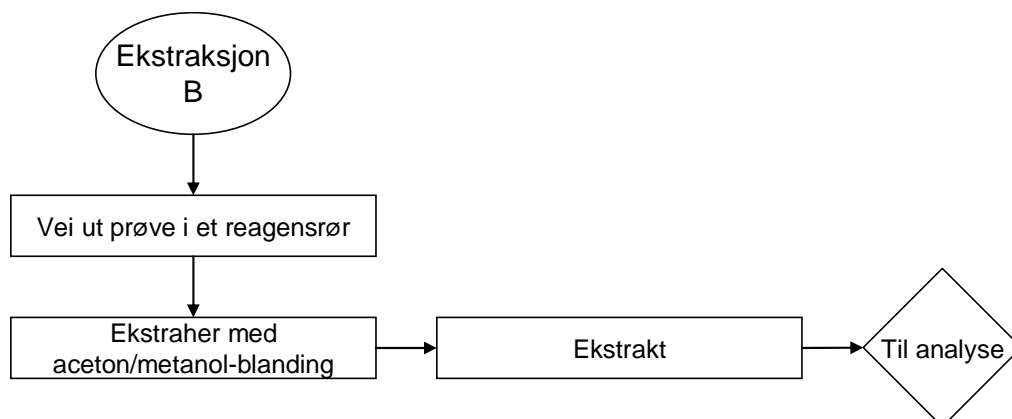
Prøven ble sugd opp i en sprøyte (1 ml) og et sprøytefilter (porestørrelse 2 μm) ble satt på. Deretter ble prøven sprøytet ut i et HPLC-prøveglass. Nitrogengass ble blåst over prøven og en kork ble satt på. Prøven ble oppbevart i fryser hvis den ikke ble analysert med en gang. Figur 2.12 viser en oversikt over hvordan en ekstraksjon av karotenoider fra gonader skjedde.



Figur 2.12 Skisse over ekstraksjonen av karotenoider fra kråkebollegonader.

Tarmprøver

Figur 2.13 viser en oversikt over hvordan ekstraksjon av karotenoider fra tarm ble utført under pilotforsøket. Ekstraksjonene vil skje på samme måte som for gonadeprovne, men acetonen er byttet ut med en aceton/metanol-blanding (70 %/30 %). I tillegg tok ekstraksjonene av karotenoider fra tarm lenger tid, det vil si at det må gjøres flere ekstraksjoner.



Figur 2.13 Skisse over ekstraksjon av karotenoider fra kråkebolletarm.

I appendiks D finnes det en forsøksprosedyre for ekstraksjonen av karotenoider.

Karotenoider blir vanligvis ekstrahert fra biologiske prøver med organiske løsemidler som er blandbare med vann, mest vanlig er aceton. Valg av løsemiddel er avhengig av det biologiske materialet, forbehandling av det, sammensetning av karotenoider og om målet er delvis eller fullstendig ekstraksjon. Det mest vanlige er fullstendig ekstraksjon med påfølgende kvantitativ analyse (Britton et al. 1995a).

Når karotenoidsammensetningen til en prøve er ukjent og karotenoidene har ulik polaritet, kan det være vanskelig å oppnå fullstendig ekstraksjon med et løsemiddel. Ekstraksjon burde repeteres inntil bunnfallet og filtratet er fri for farge eller at ingen pigmenter frigjøres uansett valg av løsemiddel. Når materialet inneholder mye vann vil første ekstraksjon med aceton eller metanol fjerne lite pigment, men vil effektivt tørke vevet, og dessuten effektivisere fjerning av pigmenter ved senere ekstraksjoner. For å fjerne vann eller løsemidler som ikke er blandbar med vann fra ekstraktet av ferske prøver kan det for små prøver (1-2 ml) med lite vanninnhold brukes en strøm av nitrogen for å dampe den inn. For større prøver vil det i de fleste tilfeller være en fordel å overføre lipider + karotenoider til eter eller heksan eller en blanding av begge. Når tørre prøver er ekstrahert med løsningsmidler som ikke er blandbar med vann, kan ekstraktet dampes direkte av i en rotasjonsfordamper. (Britton et al. 1995a).

2.5 Kjemisk analyse

2.5.1 HPLC

Prøvene ble analysert for å finne mengde karotenoider ved å bruke høypresisjonsvæskerkromatografi (HPLC). HPLCen er utstyrt med en reversertfase-kolonne for separasjon av karotenoider og deteksjon med en UV-detektor. Tabell 2.2 viser en oversikt over HPLC-parametre.

Tabell 2.2 HPLC-parametre for HPLCen som ble brukt i oppgaven.

HPLC-type	Agilent 1100 series fra Agilent Technologies
Kolonne	Lenge: 220 mm, ID 4,6 mm (Perkinelmer/Brownlee nr. 0711-0017)
Stasjonærfase	Spheri-5 RP 18 (Reversert fase)
Injektortemperatur	25 °C
Mobilfase	Se Tabell 2.3
Prøvevolum	20 µl
Flow	1,25 ml/min
Trykk	400 bar

Tabell 2.3 viser en oversikt over gradienten som ble benyttet ved HPLC-analysen. Metoden som ble brukt for å finne hvilke karotenoider og mengden av de ble lagret som idakarot.m.

Tabell 2.3 Oversikt over gradienten (mobilfasen) som ble benyttet ved HPLC-analysen. Tabellen viser % væske som brukes i forhold til tid.

Tid	1 M ammoniumacetat	Metanol	Aceton	Heksan
0 min.	20	80	0	0
30 min.	0	70	30	0
50 min.	0	30	50	20
55 min.	0	0	40	60
60 min.	0	100	0	0
65 min.	20	80	0	0

Figur 2.14 viser HPLCen (Agilent 1100) som ble brukt i forsøkene. Den består av et løsemiddelreservoar, en luftfjerner, en pumpe, en injeksjonsautomat, et kolonnekammer med forkolonne og kolonne og en UV/VIS detektor.



Figur 2.14 Agilent 1100 HPLC som ble brukt i oppgaven.

HPLC er i dag den metoden som velges for analyse av karotenoider. Denne metoden gir veldig bra separasjon på kort tid, den er sensitiv og gir mye informasjon. På grunn av sensitiviteten kan HPLCen detektere små mengder av urenheter, spormengder av karotenoider og geometriske isomerer (Britton et al. 1995a).

Resultatene fra HPLCen ble analysert for å bestemme total mengde karotenoider, ekinenon, β,β -karoten og andre karotenoider. For ekinenon og β,β -karoten er det sett på total mengde uavhengig av isomerene. Andre karotenoider er karotenoider som finnes i veldig små mengder, for eksempel zeaxantin, ukjent 1 og ukjent 2.

Måleprinsipp

IUPACs definisjon av kromatografi:

Kromatografi er en fysikalsk separasjonsmetode hvor stoffene som skal separeres blir fordelt mellom to faser, en som er stasjonær og en som beveger seg i en bestemt retning (Braithwaite & Smith 1996).

Kromatografi er en separasjonsmetode hvor ulike prøvekomponenter blir transportert i en mobilfase over en stasjonærfase. Forskjellige komponenter vil bevege seg med forskjellig hastighet fordi de har forskjellig affinitet (tiltrekning) til stasjonærfasen i forhold til mobilfasen (Braithwaite & Smith 1996). Likevektsfordelingen mellom stasjonær- og mobilfasen bestemmer vandrethastigheten til prøvekomponentene (Greibrokk et al. 1984).

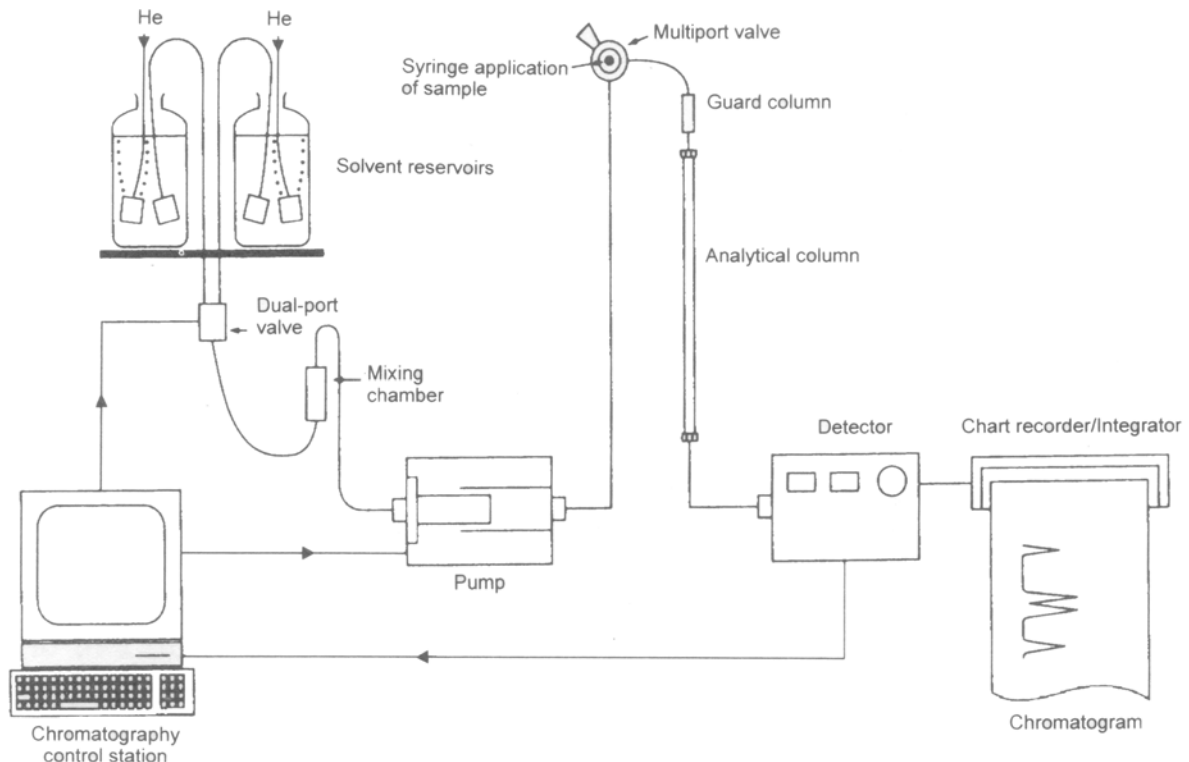
Mobilfasen kan være en væske eller en gass, og stasjonærfasen kan være et fast stoff eller en væske (Braithwaite & Smith 1996).

Høypresisjonsvæskerkromatografi (HPLC) er en teknikk for å separere komponenter i en blanding ved at de blir eluert gjennom en kolonne som inneholder en fast stasjonærfase. Stasjonærfasen består av veldig små partikler. Derfor må prøveløsningene blir transportert gjennom kolonnen med en strøm av mobilfase under trykk. Prøvekomponentene blir detektert ettersom de blir eluert (Britton et al. 1995a). HPLC har mange fordeler sammenlignet for eksempel med gasskromatografi, den kan separere alle typer forbindelser, ikke bare flyktige, det finnes mange flere typer stasjonærfaser og mobilfaser og prøveforbindelsene som separeres kan samles opp og brukes videre, for eksempel i spektroskopiske analyser (Braithwaite & Smith 1996).

Det finnes flere typer av HPLC-kromatografi, f.eks. adsorpsjonskromatografi, kjemisk bundet fase, gel-HPLC og kiral kromatografi (Braithwaite & Smith 1996).

Instrumentering

HPLC-instrumentet som ble brukt hadde et løsemiddelreservoar, en pumpe som pumper løsemiddelet gjennom kolonna, en injektor der prøven sprøytes inn, en kolonne der separasjonen foregår, en detektor som registrerer prøvekomponentene og en integrator eller datamaskin som viser kromatogrammet på dataskjerm eller papir. Figur 2.15 viser en skjematisk tegning av en HPLC.



Figur 2.15 Skjematisk tegning av et HPLC-instrument (Braithwaite & Smith 1996).

1. Løsningsmiddelreservoar

Løsemidlene som ble brukt i HPLC-analysen var metanol, aceton, heksan og 1 M ammoniumacetat. Alle løsningsmiddelelene hadde høy renhet.

2. Luftfjerner

HPLC-instrumentet var utstyrt med en luftfjerner som fjerner evt. luft og andre gasser fra eluenten (Braithwaite & Smith 1996).

3. Pumpe

Fordi det benyttes små partikler som kolonnemateriale må løsemiddelet pumpes gjennom. Det trenges en pumpe som kan klare å lage et høyt nok trykk, opptil 350 atm. To typer pumper er vanligst, det er pumper som bruker konstant volum eller konstant trykk (Britton et al. 1995a). Det kan enten benyttes en pumpe som suger opp flere løsemidler, eller det kan benyttes en pumpe for hvert løsemiddel (Braithwaite & Smith 1996).

Krav til HPLC-pumpen (Braithwaite & Smith 1996):

- i. Må være laget av et materiale som ikke reagerer/blir påvirket av mobilfasen.
- ii. Må kunne pumpe betydelige mengder løsemidler (opptil 10 ml/min).
- iii. Må gi en stabil og eksakt væskefart.
- iv. Pumpehodet må ha et lite volum for å gi rask endring av løsemiddel-sammensetningen.
- v. Må kunne tåle høye trykk.
- vi. Må pumpe mobilfasen uten endringer i væskefart eller trykk.

For pumper med konstant volum finnes det tre stykker som vanligvis brukes i et HPLC-system. Det er stempelpumper, sprøytepumper og membranpumper (Greibrokk et al. 1984).

4. Injektor

Prøven blir injisert inn i det kromatografiske systemet enten ved hjelp av en ventil eller med et automatisk injeksjonssystem (Britton et al. 1995a). HPLCen som ble brukt i forsøkene hadde en injeksjonsautomat.

5. Forkolonne

Forkolonner blir passert enten før prøveinjeksjon eller mellom injektor og kolonne. Den første kalles en "reoverings-kolonne" og den andre kalles en "vakt-kolonne". For denne oppgaven ble det brukt en "vakt-kolonne". Den hindrer urenheter fra å komme inn i kolonnen ((Britton et al. 1995a)).

6. Kolonne

Kolonnene er rette lengder av rustfritt stålrør som er tett pakket med mikropartikkel stasjonærfase. Kolonnepakkingene er kjemisk modifisert silika, umodifisert silika og polymeriske resiner eller geler. De må tåle høyt trykk, være inert for kjemisk korrosjon, innsiden må være glatt, oftest 2-5 mm i indre diameter, og for eksempel 25 cm lange. På toppen av kolonnen er det en distributør som fordeler den injiserte prøven over hele kolonna (Britton et al. 1995a). Kolonne som ble brukt i oppgaven var en reversert fase med modifisert silika.

7. Detektor

En detektor skal registrere prøven på vei ut av kolonnen, og kunne kvantifisere de ulike forbindelsene. Den vanligste detektorene er UV-detektoren, den måler hvor mye UV-lys (eller synlig lys) som absorberes av de oppløste molekylene fra den innfallende strålen (Braithwaite & Smith 1996). Denne detektoren har den viktige begrensingen at forbindelser som ikke absorberer lys ikke blir registrert. Detektor som ble benyttet var en UV/VIS dioderekke-detektor. UV/VIS-spektroskopi er forklart i kapittel 2.5.2.

2.5.2 UV/VIS-spektrofotometer

Karotenoider vil på grunn av deres konjugerte dobbeltbindinger vise sterke absorpsjonsbånd i den synlige regionen og i noen tilfeller UV-regionen. Posisjonen til absorpsjonsmaksimumet og formen til finstrukturen i UV/VIS-spekteret er karakteristisk. UV/VIS-spekteret gir informasjon om kromoforen til molekylet, men forteller ingenting om funksjonelle grupper utenom konjugerte karbonylgrupper som danner en del av kromoforen. Betegnelsen kromofor refererer til den konjugerte umettede delen av molekylet som er ansvarlig for absorpsjonen av lys i den synlige regionen (Britton et al. 1995b).

Måleprinsipp

Ultrafiolett (UV) og synlig lys (VIS) spektroskopi er blant de første spektroskopiske teknikkene som er brukt for å bestemme organiske strukturer. Et UV/VIS-spektrofotometer måler mengden med lys ved hver bølgelengde i UV og synlig lys område i det elektromagnetiske spekteret. Resultatene vises vanligvis som et plot av absorbans (A) på den vertikale aksene og bølgelengde til lyset (λ , i nanometer) på den horisontale aksene (Solomons & Fryhle 1998).

Absorpsjon i det ultrafiolette og synlige området i det elektromagnetiske spekteret samsvarer med overgang mellom elektroniske energinivåer og gir nyttig informasjon for både uorganiske og organiske prøver. Det ultrafiolette og synlige området i det elektromagnetiske spekteret dekker bølgelengder fra 100 nm til omtrent 800 nm. De fleste analytiske målingene i UV-området gjøres mellom ca. 200 og 400 nm. Det synlige området er mellom ca. 400 og 800 nm (Kealey & Haines 2002).

Instrumentering

Essensielle deler for et spektrofotometer:

- **Lyskilde:** Kilden til synlig lys er som regel wolframfilamentlampe eller en wolfram-halogenlyspære. For UV området er kilden som oftest en deuteriumlampe. Innretninger er laget for å kunne bytte mellom disse kildene ved en passende bølgelengde, ofte rundt 380 nm. (Britton et al. 1995b).
- **Spredning av lys:** i konvensjonelle instrumenter er dette oppnådd ved hjelp av en prisme eller en diffraksjonsgitter (avbøyningsgitter), som spredningselement, med et arrangement av spalter for å sikre at bølgelengdeområde som faller på prøven er så lite som mulig. Et sett av optiske komponenter og mekaniske utstyr tillater at bølgelengden til lyset som faller på prøven kan varieres med tiden (Britton et al. 1995b).
- **Detektor:** Etter å ha gått gjennom prøven blir det essensielle monokromatiske lyset mottatt av detektoren, som vanligvis er en type elektronfotomultiplikatorrør, som måler intensiteten til det gjennomstrålte lyset ved hver bølgelengde. Variasjonen i intensiteten til det gjennomstrålte lyset som en funksjon av bølgelengde gir absorpsjonsspekteret (Britton et al. 1995b).
- **Celler/kyvetter:** Nesten alle spektrofotometer er utformet for å normalt kunne bruke celler med 1 cm lysvei. Åpne rektangulære celler med lokk er mest vanlig å bruke, men mikroceller med totalt mindre volum er nyttig for små prøver. For arbeid i den synlig regionen kan glasskyvetter brukes. I UV-regionen må sammensmeltet naturlig kvarts eller sammensmeltet syntetisk silika brukes (Britton et al. 1995b).

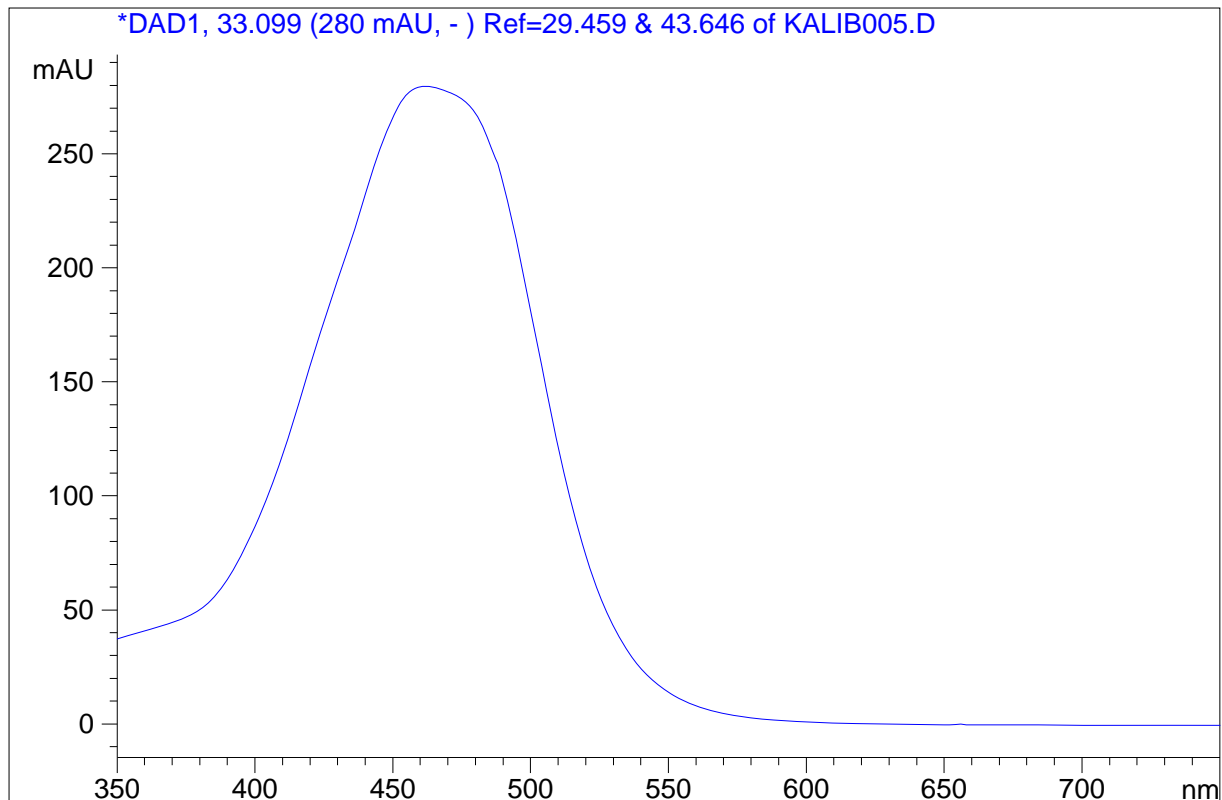
UV/vis-spekteret

Organiske molekyler har den fundamentale egenskapen at de absorberer lys i UV- eller synlig lysbølgelengdeområdet. Absorpsjonen av denne lysenergien produserer et høyere energi- eller eksitert tilstand til molekylet (Britton et al. 1995b).

- Spekteret til et karotenoid: Det viktigste karakteristiske trekket til absorpsjonsspekteret til et karotenoid er hovedabsorpsjonsbåndet i det synlige området (Britton et al. 1995b).
- Mye informasjon kan bli hentet ut fra spekteret:
Posisjonene til hovedabsorpsjonsbåndet, spesifisert med λ_{maks} , gir maksimal absorpsjon og gir strukturell informasjon fordi den er bestemt av kromoforen til molekylet. Intensiteten til absorpsjonen, absorbanse A , er relatert til strukturen og konsentrasjonen til karotenoider i prøven. Dette gir basis for kvantitative analyser. Mange spekter har ikke bare et bånd, men viser tre mer eller mindre tydelige toppe. Denne effekten, kjent som finstruktur, vises i ulik utstrekning for ulike karotenoider og gir en viktig diagnostisk element. Spektral finstruktur til et karotenoid gir informasjon om strukturen til kromoforen. Det er derfor nyttig å sammenligne spekter med hensyn til deres form og posisjonen til absorpsjonsmaksimum (Britton et al. 1995b).
- Posisjonen eller intensiteten til hovedabsorpsjonsbåndet til et karotenoid kan bli påvirket av et antall faktorer slik som forandring i det molekylære miljøet til karotenoidmolekylet (Britton et al. 1995b).

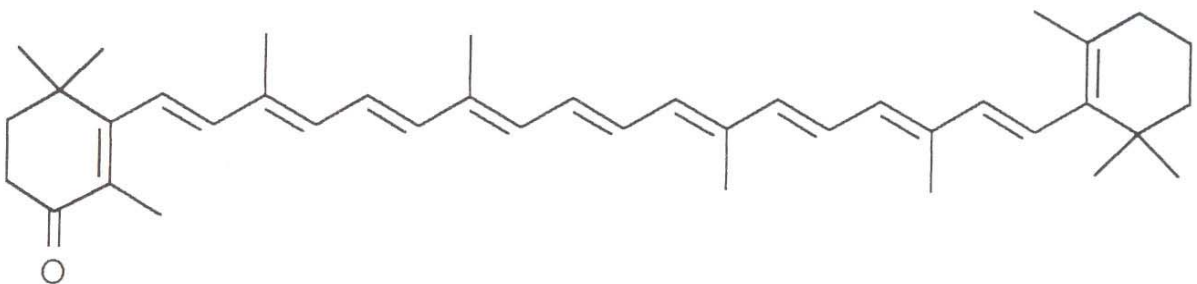
Prøven er generelt en fortynnet løsning av analytten i et løsningsmiddel med en lav absorbanse i det interessante området. Naturen til løsningsmiddelet kan forandre posisjonen til toppen i spekteret. Prøven haes i en tynnvegget silikaglass, vanligvis med en veilegde på 1 cm, mens en lik referansecelle innholder løsningsmiddelet alene. Hvis målingen er begrenset til det synlige området kan vanlig glass- eller plastikkceller brukes, men disse brukes ikke til UV arbeid (Britton et al. 1995b).

UV/VIS-spekteret til ekinenon består av en enkel topp mellom 400 og 500 nm (Figur 2.16). Spekteret vil se slik ut på grunn av lengden på kromoforen og at kromoforen er en del av ringen i tillegg til at ringen har en karbonylgruppe.



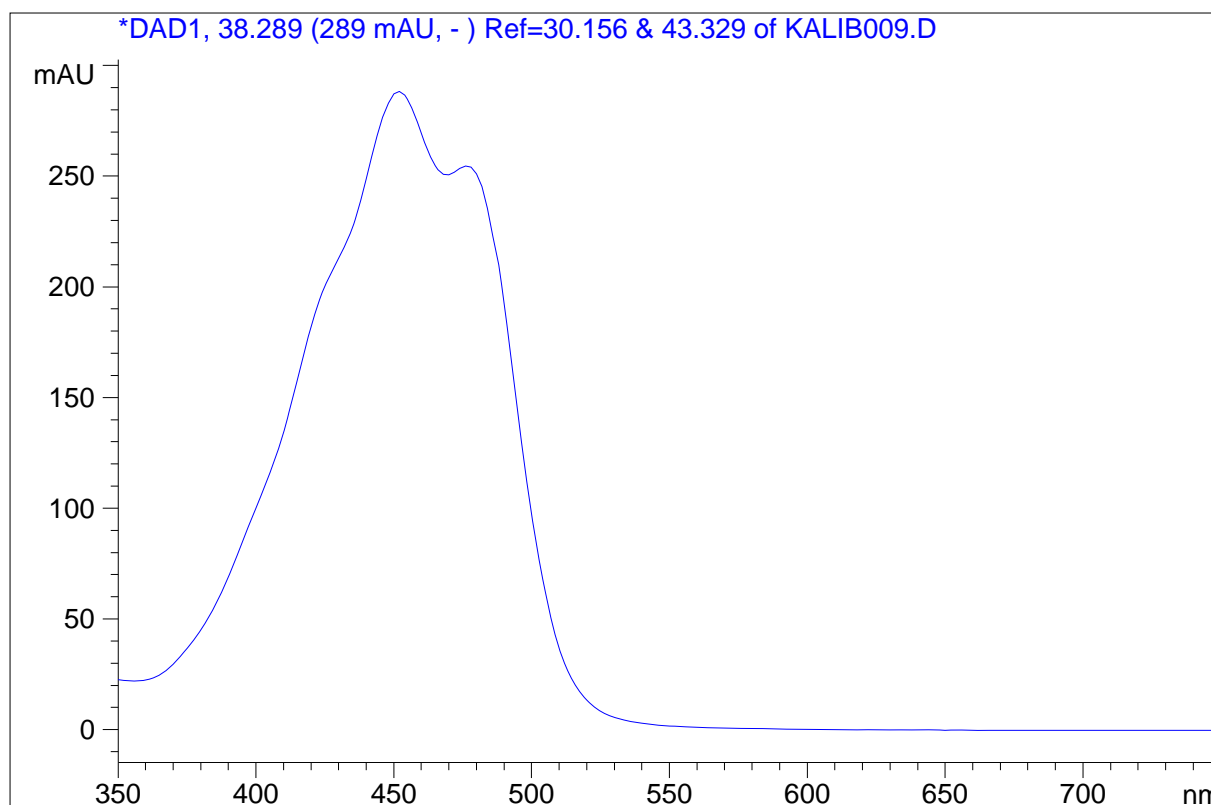
Figur 2.16 UV/VIS-spekteret til ekinenon i HPLC-eluent.

Ekinenon, β,β -karoten-4-on, er et karakteristisk karotenoid i cyanobakterier. Det er også mye funnet i alger, marine invertebrate dyr og bakterier. (Britton et al. 2004). Figur 2.17 viser strukturen til ekinenon.



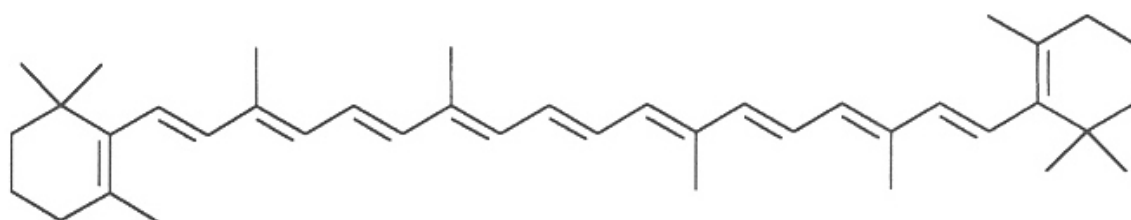
Figur 2.17 Strukturen til ekinenon ((Britton et al. 2004)).

β,β -karoten har en kortere kromofor enn ekinenon, og derfor vil finstrukturen til den komme mer fram (figur 2.18). Både ekinenon og β,β -karoten har ringforbindelser på hver side, men ekinenon har i tillegg et oksygenatom på den ene ringen. Figur 2.19 og figur 2.17 viser strukturen til β,β -karoten og ekinenon. Ekinenon har 12 konjugerte dobbeltbindinger og β,β -karoten har 11 konjugerte dobbeltbindinger.



Figur 2.18 UV/VIS-spekteret til β,β -karoten i HPLC-eluent.

β,β -karoten er det mest vanlige karotenet., med en stor fordelig i planter, alger, sopp, bakterier og dyr. Det er et vanlig hovedkarotenoid i kloroplast til planter og de fleste alger, ofte fulgt av mindre mengder av β,ϵ -karoten. (Britton et al. 2004). Figur 2.19 viser strukturen til β,β -karoten.



Figur 2.19 Strukturen til β,β -karoten (Britton et al. 2004).

2.6 Kalibrering av HPLC-metoden

Det ble gjort en kalibrering ved bruk av ekstern standard. Rene karotenoider, som for eksempel ekinenon og β,β -karoten, ble analysert på HPLCen for å finne hvilken retensjonstid forbindelser har på den kolonnen som skal brukes. Standardprøvene er donert fra Synnøve Liaen-Jensen ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet (NTNU). Forsøksprosedyre for tillaging av prøver til kalibrering finnes i appendiks E.

Å bruke ekstern standard som kalibreringsmetode for HPLCen vil si at standarder av stoffene som skal bestemmes blir analysert på samme måte som prøvene (Greibrokk et al. 1984).

Mengde karotenoid/ml ble beregnet ved hjelp av formel 2.2. Volumet er det volumet til prøven som blir analysert på UV/VIS-spektrofotometeret. Abs_{maks} kommer fra UV/VIS-spekteret. A-verdien er en verdi som kan slås opp i for eksempel Carotenoids Handbook (Britton et al. 2004). Det er der nevnt A-verdier for forskjellige karotenoider analysert i forskjellige løsemiddel. Det er fra disse verdiene det blir bestemt hvilke løsemiddel som skal brukes i opparbeidelsen, jfr. pkt. 3 i forsøksprosedyren. Hvis det ikke finnes en A-verdi for det karotenoidet som skal undersøkes kan det brukes en gjennomsnittsverdi som er:

$A=2500$ med aceton som løsemiddel.

Formel 2.2 Formel for beregning av antall mg karotenoid i prøver som er analysert med UV/VIS-spektrofotometer.

$$ant.mg = \frac{10 \cdot (volum\ prøve(ml)) \cdot abs.maks}{A_{1cm}^{1\%}}$$

Appendiks F viser et eksempel på beregning av mengde karotenoid (mg).

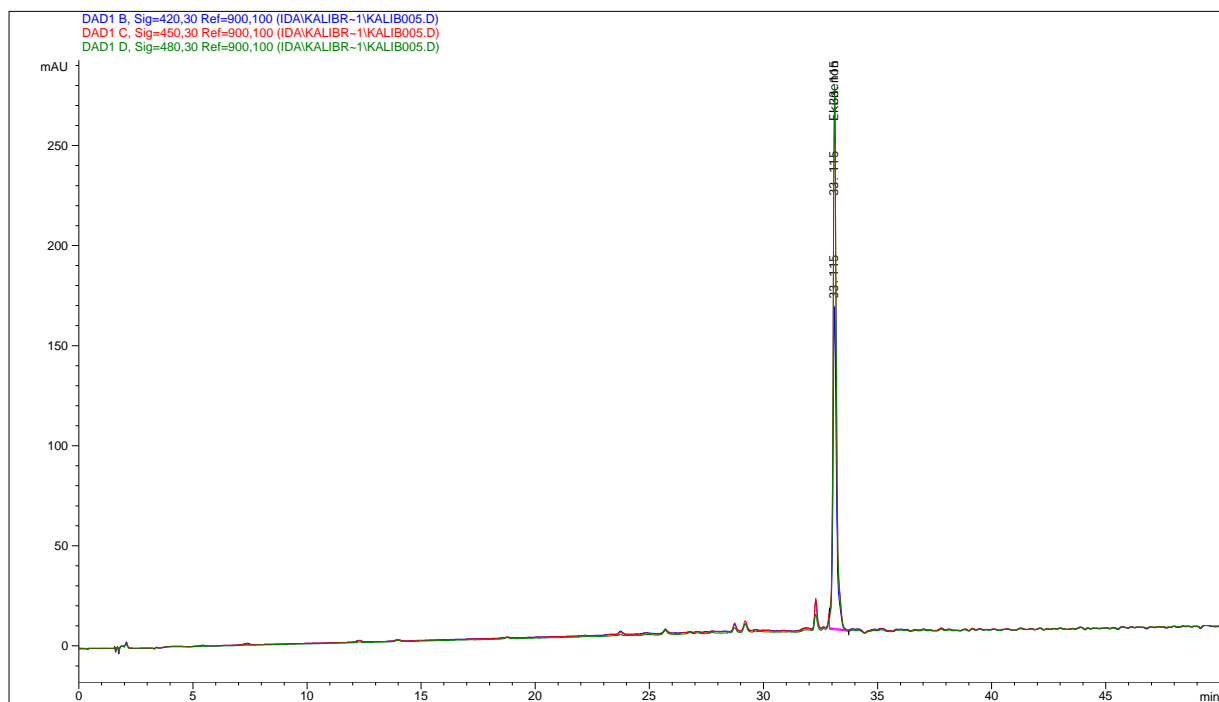
Karotenoidene som ble analysert slik er: β,β -karoten, astaxantin, zeaxantin, kantaxantin, fukoxantin, diatoxaxantin, lutein og ekinenon. Tabell 2.4 viser løsemiddel som ble brukt for de forskjellige karotenoidene og hvilke A-verdi de har.

Tabell 2.4 Oversikt over hvilke karotenoider som ble analysert for kalibreringen av HPLC-kolonnen. A-verdiene er hentet fra Handbook (Britton et al. 2004)

Karotenoid	A-verdi	Løsemiddel
β,β -karoten	2590	} Heksan
Kantaxantin	2200	
Astaxantin	2100	} Etanol
Lutein	2550	
Zeaxantin	2340	} Aceton
Fukoxantin	1660	
Diatoxaxantin	2720	
Ekinenon	2090	Benzen

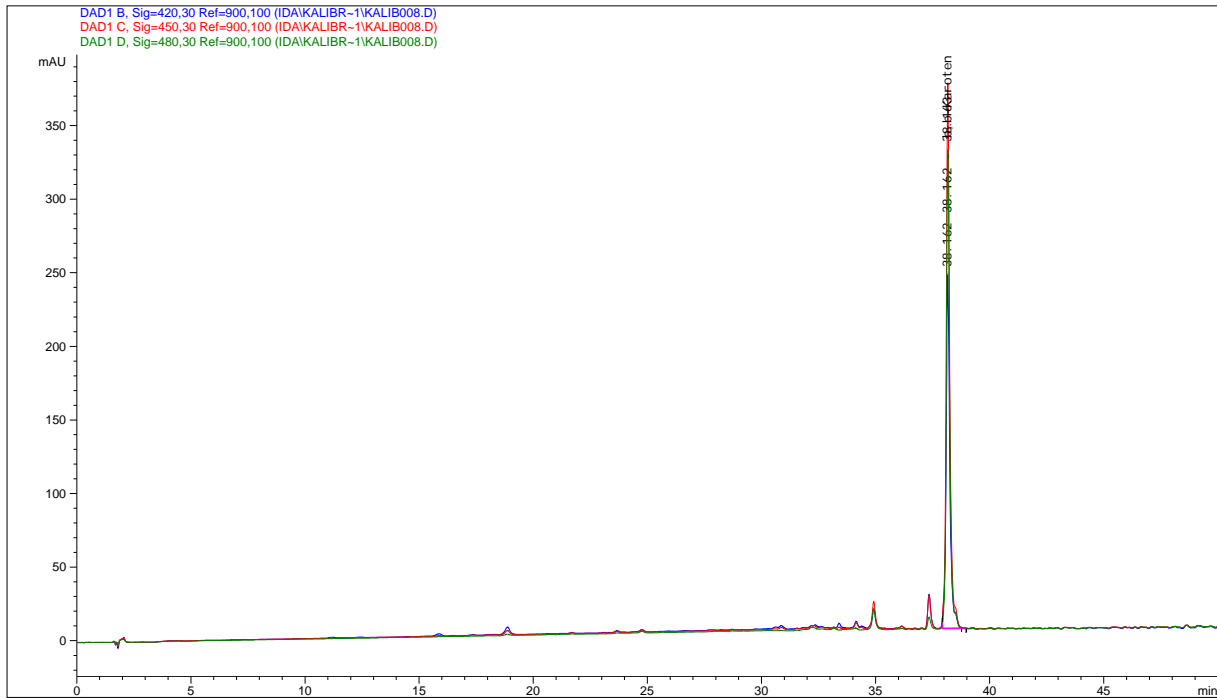
Etter at prøvene var analysert med UV/VIS-spektrofotometer ble den dampet inn på rotasjonsfordamperen. Deretter ble prøven overført til en målekolbe, fylt opp til med aceton og analysert på HPLCen. Hver prøve ble analysert ved å injisere fire forskjellige volum inn på HPLCen, dette var 5, 10, 25 og 50 μl .

Siden ekinenon og β,β -karoten er de to karotenoidene som er blitt studert i oppgaven er det kun vist kromatogram og kalibreringskurver for de. Figur 2.20 viser kromatogrammet av ekinenonstandarden ved en injeksjon på 25 μl .



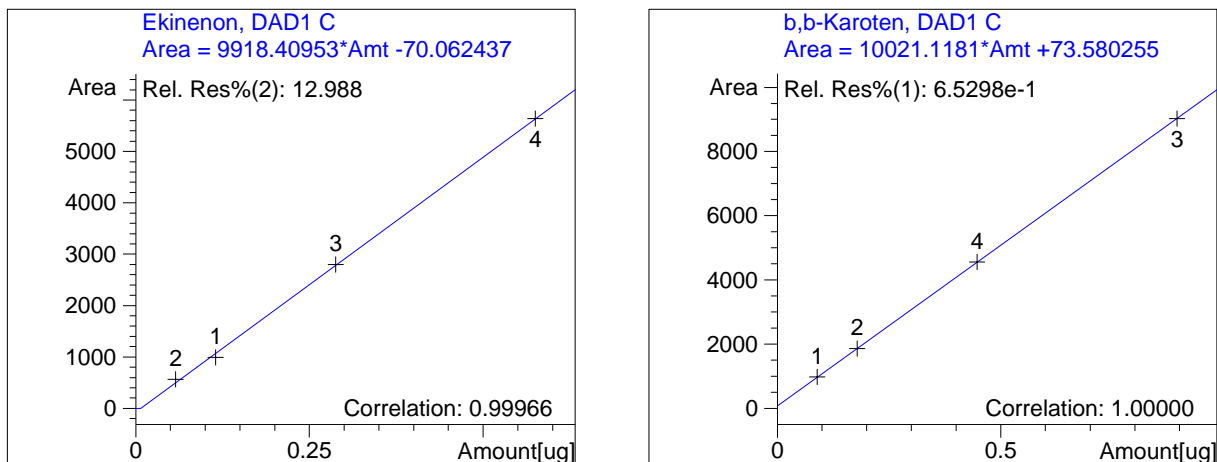
Figur 2.20 Kromatogram av standardprøven med ekinenon.

Figur 2.21 viser kromatogrammet til β,β -karoten med en injeksjon på 25 μl .



Figur 2.21 Kromatogram av standardprøven med β,β -karoten.

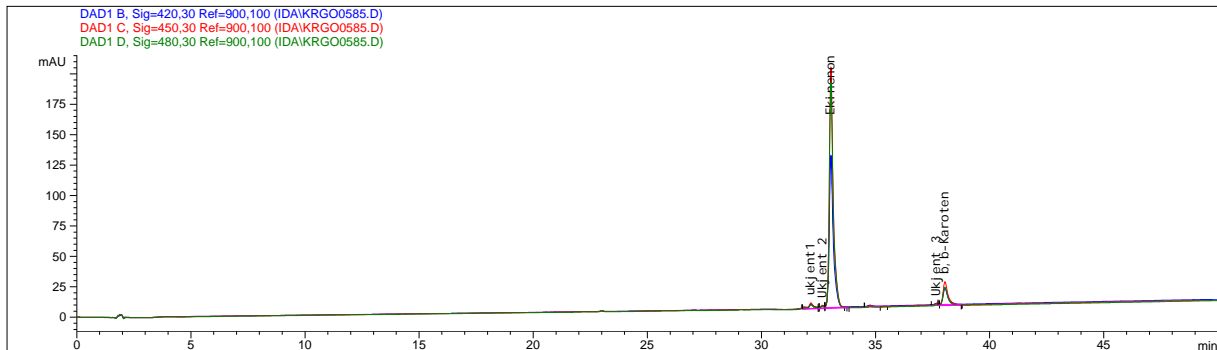
Figur 2.22 viser kalibreringskurven til ekinenon (til venstre) og β,β -karoten (til høyre).



Figur 2.22 Kalibreringskurvene for ekinenon (t.v.) og β,β -karoten (t.h.).

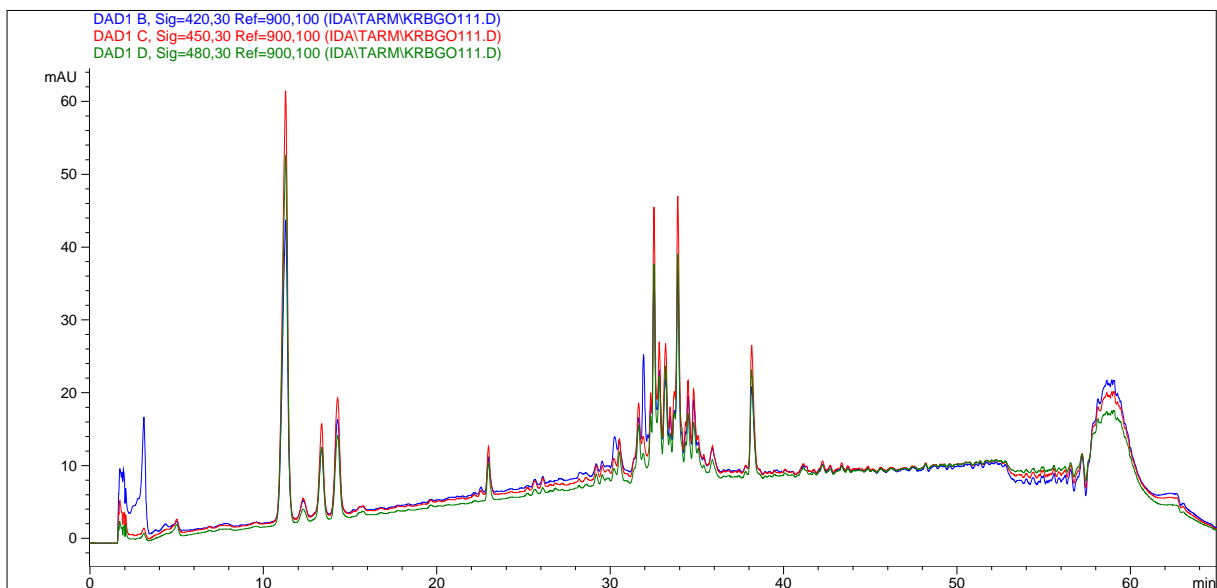
2.7 Kromatogrammene fra HPLCen

Figur 2.23 viser et kromatogram til en gonadeprøve. Ukjent 1 og ukjent 2 kan være isomere av ekinenon og ukjent 3 kan være isomere av β,β -karoten.



Figur 2.23 Eksempel på et kromatogram til en gonadeprøve.

Figur 2.24 viser kromatogrammet til en tarmprøve. HPLC-analysen gav et veldig komplisert kromatogram som det er nødvendig å arbeide mye med for å klare å identifisere hvilke forbindelser som finnes. Derfor ble det valgt å ikke analysere videre på tarmprøvene.



Figur 2.24 Eksempel på et kromatogram til en tarmprøve.

2.8 Kjemikalier

Tabell 2.5 viser en oversikt over kjemikaliene som har blitt brukt under prøvetaking, ekstraksjon og analyse.

Tabell 2.5 Kjemikaliene som er brukt.

Kjemikalier	Formel	Leverandør	Renhet
Metanol	CH ₃ OH	Fluka, Merck (Prolabo)	99,8 %
Aceton	CH ₃ COCH ₃	Fluka, Merck	99,8 %
Heksan	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	Merck	98 %
Ammoniumacetat (s)*	CH ₃ COONH ₄	Merck	> 98 %
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	Arcus	100 %

*Ammoniumacetat (s) ble brukt til å lage en 1 M løsning av ammoniumacetat.

2.9 Dataanalyse og statistikk

Resultatene ble analysert med variansanalyse (ANOVA), regresjonsanalyse og grafisk analyse. En ANOVA-analyse har tre forutsetninger som må være oppfylt for å kunne bruke den. Disse forutsetningene er at dataen er statistisk uavhengig, restverdiene har lik varians og er normalfordelte (Zar 1999). Sammenligning av grupper etter en signifikant ANOVA, for eksempel resultatene fra fôringsforsøket, ble gjennomført med Tukey-kramer HSDs (Honestly Significant Difference) (Kap. 11, Zar 1999).

Det ble gjort tilfeldig prøvetaking for å sikre statistisk uavhengighet. For å sjekke om restverdiene til alle variablene hadde lik varians ble det brukt Bartlett's test (Kap. 10, Zar 1999). Hvis restverdiene hadde lik varians ble analysen fortsatt, hvis ikke ble variablene transformert for å sjekke om det gav noen effekt på restverdiene. Til alle variablene bortsett fra gonadeindeksen ble det brukt en Box Cox transformasjon. For gonadeindeksen ble det brukt en arcsin-transformasjon (Kap. 13, Zar 1999). Hvis restverdiene ga lik varians ble det sjekket om de var normalfordelt ved å bruke "goodness of fit"-testen (Kap. 22, Zar 1999). For alle testene er det brukt et signifikansnivå på 5 % ($P < 0,05$).

Statistisk analyse av dataene er gjennomført med å bruke dataprogrammet JMP IN 5.1 (SAS Institute Inc. 2005).

Prøver som var infisert med nematoden *Echinomermella matsi* er ikke tatt med i resultatene.

3 Resultat

Alle resultatene som omhandler karotenoider, både for de månedlige prøvetakingene og føringsforsøket, er beregnet i tørrvekt.

3.1 Månedlige prøvetakinger

3.1.1 HPLC-Karotenoidsammensetningen

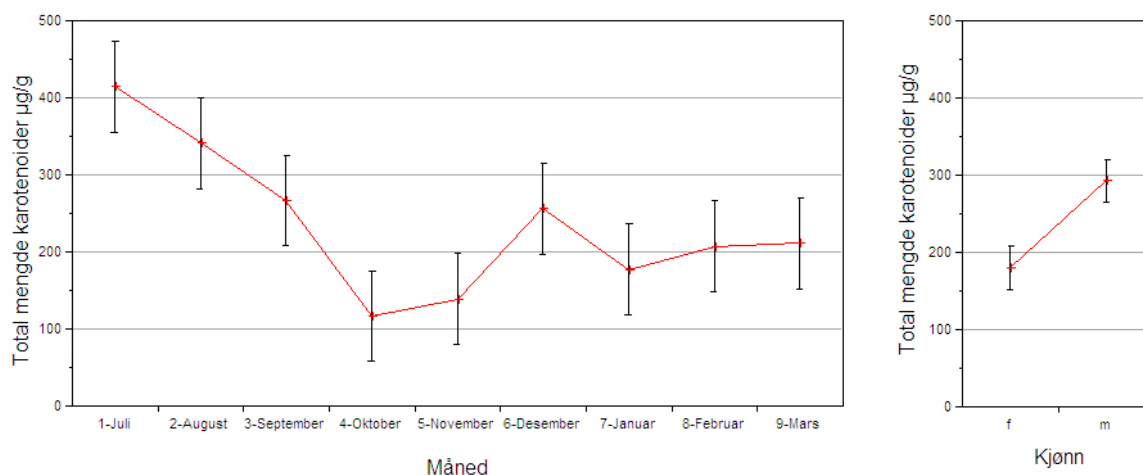
Forutsetningene for å kunne gjennomføre en ANOVA-test på uttransformerte verdier for total mengde karotenoider ble ikke oppfylt. Det ble derfor gjennomført en Box Cox transformasjon av total mengde karotenoider. Bartlett's test av restverdiene til disse ga lik varians. Modellen for transformerte verdier forklarer 54 % av variasjonene i prøvene. "Goodness of Fit"-testen viste at restverdiene var normalfordelt.

Effekten til de forskjellige faktorene lå i variasjonene mellom kjønnene og variasjonen fra måned til måned (tabell 3.1). Det er ingen signifikant forskjell på lokalitetene A og B.

Tabell 3.1 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for total mengde karotenoider per måned. Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Modell	35	1506906,6	43054,5	4,8231	0,0001
Lokalitet	1	6745,05	6745,05	0,7556	0,3862
Kjønn	1	295466,14	295466,14	33,0989	0,0001
Måned	8	992823,25	124103	13,9023	0,0001
Lokalitet*kjønn	1	12099,06	12099,06	1,3554	0,2463
Lokalitet*måned	8	27675,40	3459,43	0,3875	0,9259
Kjønn*måned	8	96234,86	12029,4	1,3476	0,2248
Lokalitet*kjønn*måned	8	75862,80	9482,85	1,0623	0,3929
Feil	144	1285455,2	8926,8		
C. total	179	2792361,8			

Den generelle tendensen for total mengde karotenoider er at innholdet minker fra juli til i oktober og stiger igjen til mars (figur 3.1). I desember er det en topp i karotenoidinnholdet noe som kan skyldes den naturlige variasjonen i prøvene, men det er analysert for få prøver til å forklare dette. Innholdet av total mengde karotenoider er ca. 100 µg/g mer for hannkråkebollene enn for hunnkråkebollene.



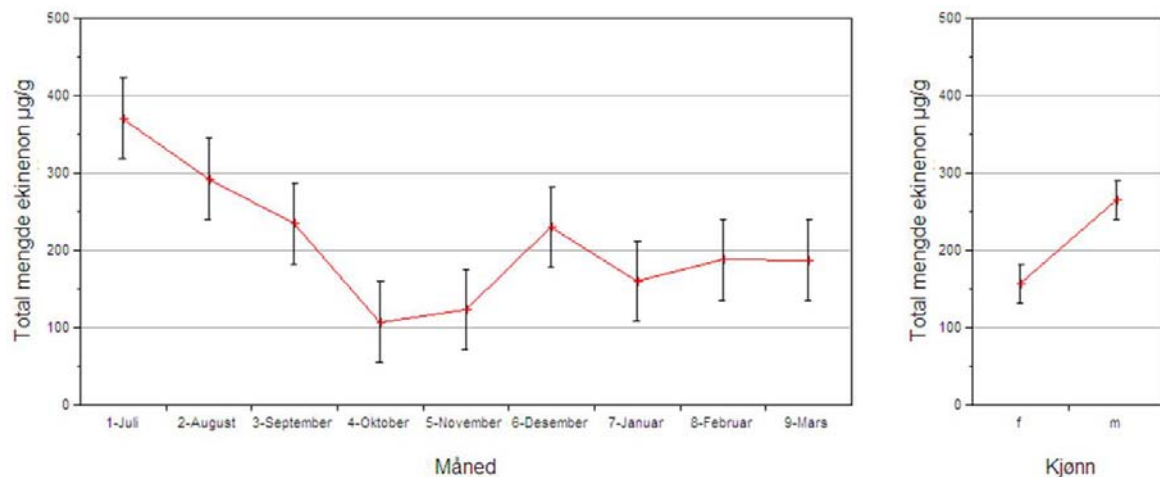
Figur 3.1 Gjennomsnittlig total mengde karotenoider i gonadene for hver måned (t.v.) og gjennomsnittlig mengde karotenoider for hvert av kjønnene (t.h). f er hunnkråkeboller og m er hannkråkeboller.

Utransformerte verdier for mengde ekinenon ga med Bartletts test ulik varians for restverdiene, og mengde ekinenon måtte derfor transformeres. Brukte Box Cox transformasjon for denne også og Bartletts test ga lik varians for de transformerte restverdiene. Faktorene som hadde effekt for variasjonen var kjønn og måned (tabell 3.2). 54 % av variasjonene ble forklart av modellen. Restverdiene til mengde ekinenon var normalfordelt.

Tabell 3.2 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for mengde ekinenon per måned. Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Modell	35	1169441,1	33412,6	4,9169	0,0001
Lokalitet	1	6234,66	6234,66	0,9175	0,3397
Kjønn	1	267934,33	267934,33	39,4280	0,0001
Måned	8	730273,60	91284,2	13,4330	0,0001
Lokalitet*kjønn	1	10133,87	10133,87	1,4913	0,2240
Lokalitet*måned	8	23120,82	2890,1	0,4253	0,9044
Kjønn*måned	8	74553,51	9319,19	1,3714	0,2138
Lokalitet*kjønn*måned	8	57190,32	7148,79	1,0520	0,4003
Feil	144	978555,9	6795,5		
C. total	179	2147997,0			

Mengde ekinenon har samme generelle tendenser som for total mengde karotenoider (figur 3.2). Mengden er høyest i juli og minker fram til oktober for den stiger til mars, det er også her en topp i desember. For mengde ekinenon er det ca. 100 $\mu\text{g/g}$ i forskjell på hann- og hunnkråkebollene, der hunnkråkebollene har lavest innhold. Det er heller ikke signifikant forskjell på lokalitetene.



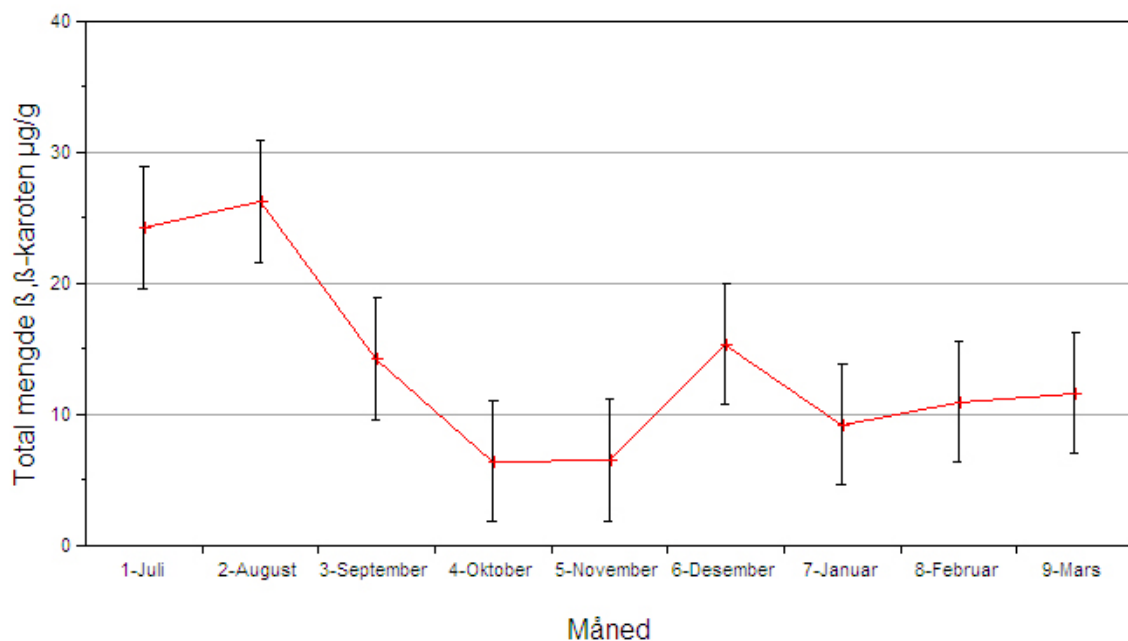
Figur 3.2 Gjennomsnittlig mengde ekinenon i gonadene for hver måned (t.v.) og gjennomsnittlig mengde karotenoider for hvert av kjønnene (t.h.). f er hunnkråkebollene og m er hannkråkebollene.

Heller ikke restverdiene for mengde β,β -karoten har lik varians. Disse ble også transformert med Box Cox transformasjon. Restverdiene til de transformerte verdiene ga lik varians med Bartlett's. Den eneste faktoren som hadde effekt på mengde β,β -karoten var måned (tabell 3.3). Modellen forklarer 47 % av variasjonen og "Goodness of Fit"-testen viste at restverdiene var normalfordelte.

Tabell 3.3 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for mengde β,β -karoten per måned. Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

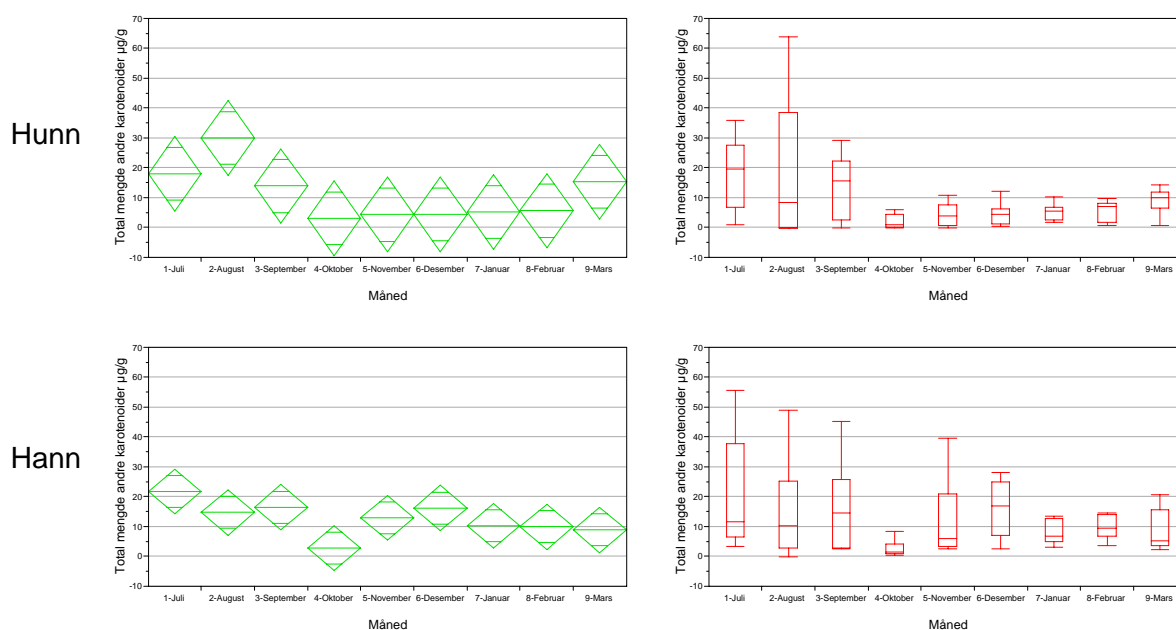
Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Modell	35	6035,485	172,442	3,6314	0,0001
Lokalitet	1	6,1448	6,1448	0,1294	0,7196
Kjønn	1	15,5852	15,5852	0,3282	0,5676
Måned	8	4843,1347	605,392	12,7488	0,0001
Lokalitet*kjønn	1	87,3651	87,3651	1,8398	0,1771
Lokalitet*måned	8	132,8094	16,6012	0,3496	0,9447
Kjønn*måned	8	379,2062	47,4008	0,9982	0,4401
Lokalitet*kjønn*måned	8	571,2396	71,405	1,5037	0,1608
Feil	144	6838,000	47,486		
C. total	179	12873,485			

Mengden β,β -karoten var mye mindre enn mengde ekinenon. β,β -karoten innholdt 0-30 $\mu\text{g/g}$ mens ekinenon innholder over 100 $\mu\text{g/g}$. Også for β,β -karoten er mengden høyest i juli og minker fram til oktober/november og stiger igjen til mars (figur 3.3).



Figur 3.3 Gjennomsnittlig mengde β,β -karoten i gonadene for hver måned.

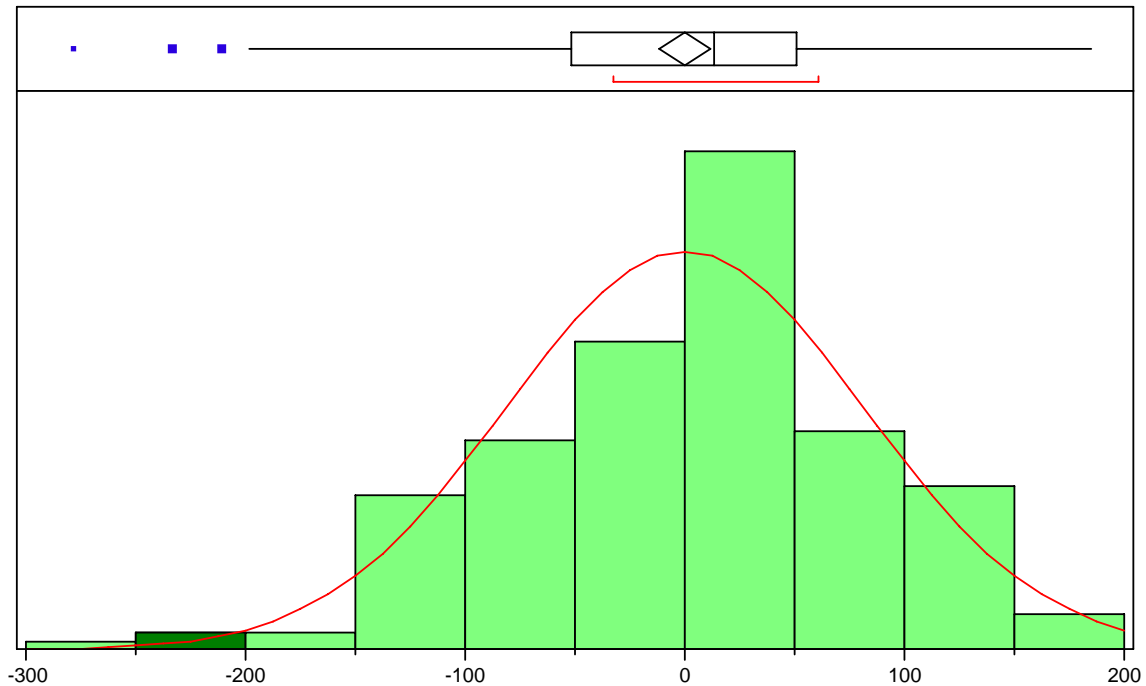
Det var ikke mulig å gjøre statistiske analyser for gonadeindeksen. Bartlett's test for mengde andre karotenoider viste at restverdiene ikke har lik varians. Det var ikke mulig å transformere disse verdiene med Box Cox transformasjon, og annen type transformasjon hadde ingen effekt. Det er derfor gjort en grafisk analyse. Siden dette er restverdiene av karotenoider i forhold til mengde total mengde karotenoider, ekinenon og β, β -karoten vil de antakeligvis ha samme effekt som for de andre karotenoidene, det vil si at det ikke er noen signifikant forskjell på lokalitetene. Mengden andre karotenoider varierer fra måned til måned og hannkråkebollene har større variasjon enn hunnkråkebollene (figur 3.4).



Figur 3.4 Total mengde andre karotenoider for hver måned for hvert kjønn, hunnkråkeboller øverst og hannkråkeboller nederst. I den grafiske analysen ble det brukt "means diamonds" (t.v.) og "boxplot" (t.h.). Linjen i midten av diamantene er middelverdien for dataen. Det øverste og nederste punktet av diamanten er 95 % konfidensintervall. Bredden på diamanten gir størrelsen på gruppen. "Boxplotet" er en ikke-parametrisk test og viser fordelingen av punktene for dataen for hver gruppe. Sluttene på boksen er 25. og 75. kvantil. Linjen i midten er medianen. Hver boks har linjer som strekker seg ut øverst og nederst, disse beskriver de ytterste dataene som faller innenfor avstanden som er beregnet.

3.1.2 Fargemålingene

I analysen av fargemålingen er det valgt å se på sammenhengen mellom alle tre fargemålingsverdiene, L^* , a^* og b^* , mot total mengde karotenoider. Verken uttransformerte og transformerte restverdier ga en normalfordelt kurve, "Goodness of Fit"-testen ga $p < 0,0370$ (figur 3.5). Det er tre verdier som er lave i forhold til de andre, og hvis disse verdiene fjernes vil det gi en normalfordelt kurve. På grunn av den naturlige variasjonen i de ville kråkebollene kan det forventes at flere målinger vil gi en normalfordelt kurve.



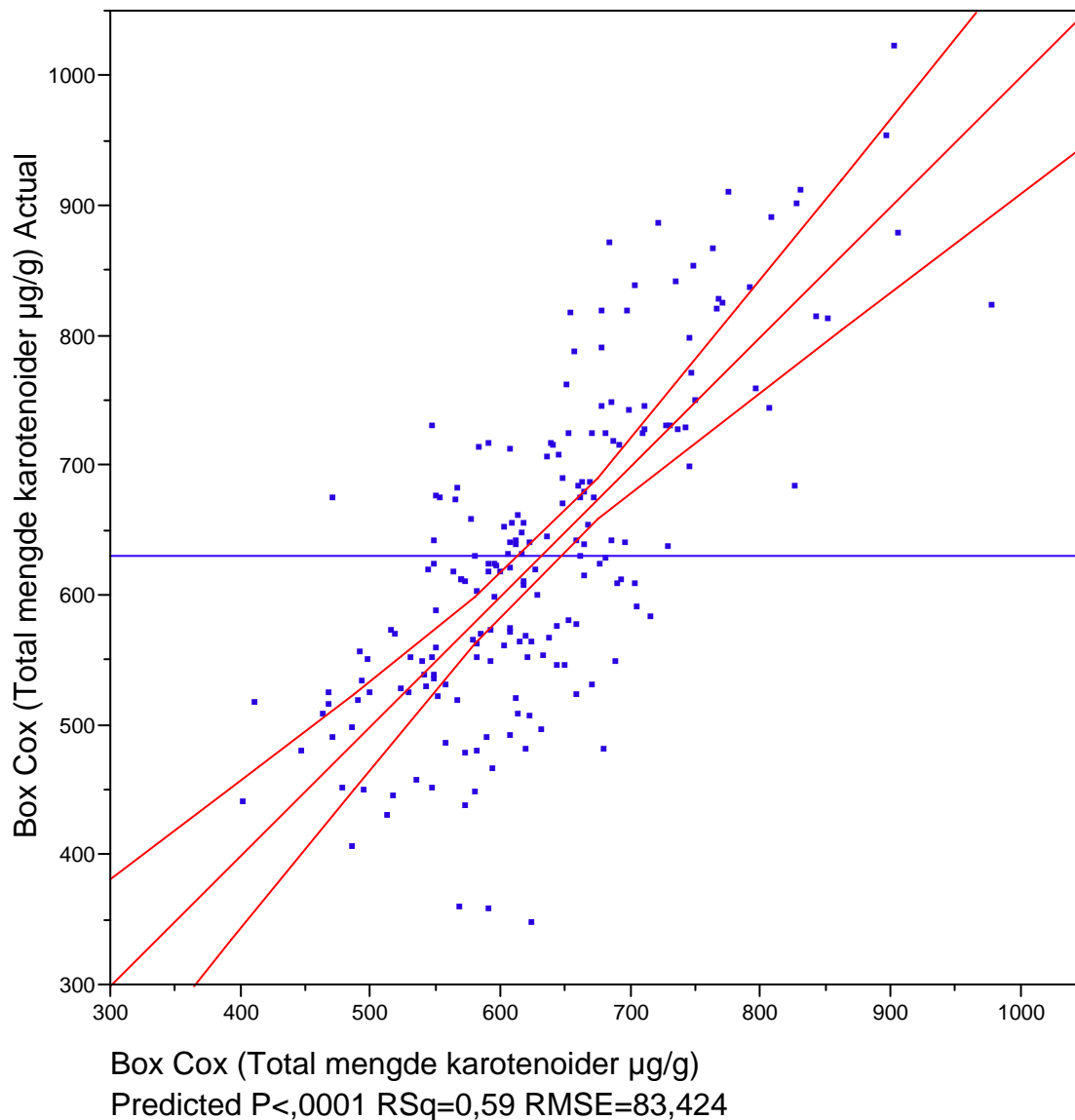
Figur 3.5 Normalfordelingskurven for restverdiene fra analysen av sammenhengen mellom total mengde karotenoider i gonadene og fargemålingen (interaksjonen mellom L^* -, a^* - og b^* -verdiene).

Variansanalysen for denne modellen viser en effekt for a^* - og b^* -verdien, interaksjonen mellom L^* og b^* og interaksjonen mellom L^* , a^* og b^* (tabell 3.4). Det vil si at det er en sammenheng mellom rødheten og gulheten til gonaden og total mengde karotenoider. Videre er det en sammenheng mellom lyshet og gulhet i forhold til total mengde karotenoider samt en sammenheng mellom interaksjonene L^* , a^* og b^* og total mengde karotenoider.

Tabell 3.4 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for total mengde karotenoider i gonaden ($\mu\text{g/g}$) i forhold til interaksjonen mellom fargemålingen (interaksjonen mellom L^* -, a^* - og b^* -verdiene). Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Modell	7	1697242,9	242463	34,8391	0,0001
L^* (Lyshet)	1	1347,1	1347,1	0,1936	0,6605
a^* (Rødhet)	1	1133264,2	1133264,2	162,8368	0,0001
b^* (Gulhet)	1	358050,8	358050,8	51,4477	0,0001
L^* (Lyshet)* a^* (Rødhet)	1	17341,2	17341,2	2,4917	0,1163
L^* (Lyshet)* b^* (Gulhet)	1	35523,2	35523,2	5,1043	0,0251
a^* (Rødhet)* b^* (Gulhet)	1	2459,1	2459,1	0,3533	0,5530
L^* (Lyshet)* a^* (Rødhet)* b^* (Gulhet)	1	35237,0	35237,0	5,0631	0,0257
Feil	172	1197035,9	6960		
C. total	179	2894278,8			

Regresjonsanalysen av sammenhengen mellom fargemålingen (interaksjonen av L^* , a^* og b^*) og total mengde karotenoider (transformerte verdier) gir et resultatet som forklarer 59 % av variasjonen (figur 3.6). Det vil si at det en sammenheng mellom fargeintensiteten og mengde karotenoider.



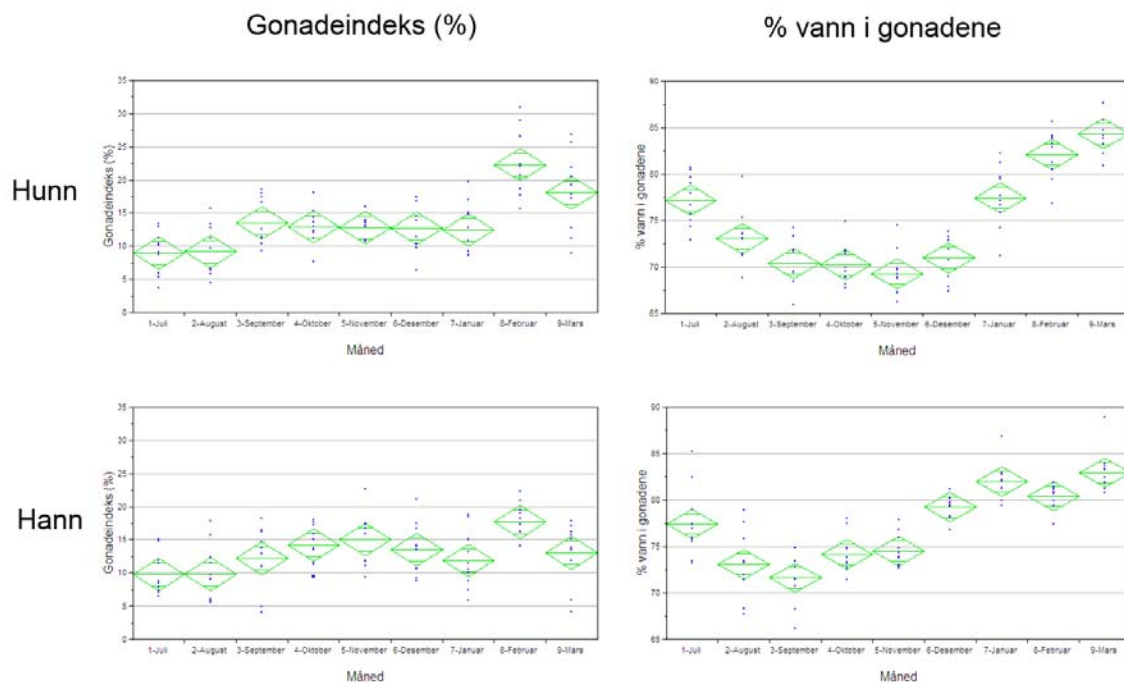
Figur 3.6 Regresjonskurve for observert Box Cox transformert total mengde karotenoider i forhold til verdier beregnet fra fargemålingene (interaksjonen mellom L^* -, a^* - og b^* -verdiene). Y-aksen viser observerte verdier og x-aksen viser verdier som er beregnet (predicted) fra fargemålingen.

3.1.3 Gonadeindeksen

Bartlett's test ga ulik varians for restverdiene til gonadeindeksen. De transformerte restverdiene, arcsin-transformasjon, ga også ulik varians og løste derfor ikke problemet. Det var derfor ikke grunnlag for å gjøre en variansanalyse. Årsaken til dette er antakelig at det var for få prøver i forhold til den naturlige variasjonen. Det ble tatt 10 av hvert kjønn, 5 fra hver lokalitet.

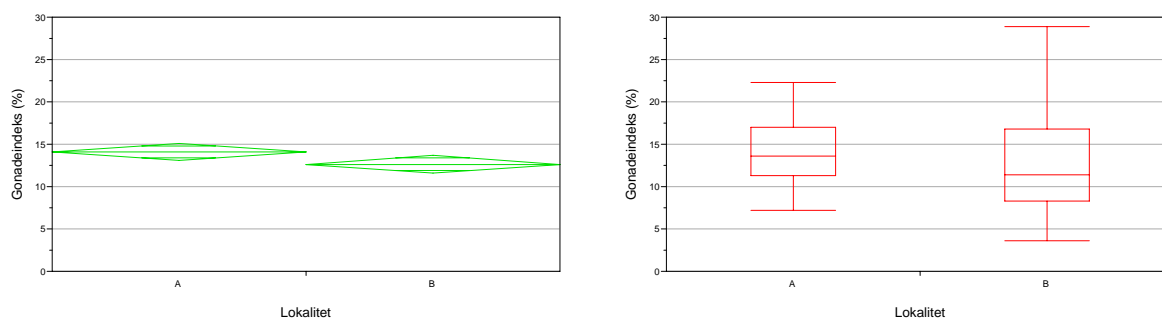
Gonadeindeksen er lavest i juli og august og stiger til september, hvor den ligger jevnt fram til mars (figur 3.7). I mars var den høyest før den minker til februar. Etter gyting, fra mars/april, vil gonadeindeksen være lav fordi kråkebollene er utgytt. Fra april og videre utover høsten vil gonadeindeksen bygge seg opp klar til ny gyting. Ut fra resultatene er gonadeindeksen høyest i februar, og faller i mars. Dette indikerer at gytingen startet i februar. For hannkråkebollene er det mer variasjon fra måned til måned enn for hunnkråkebollene.

Andel vanninnhold i gonadene minker fra ca. 77 % i juli til ca. 69 % i november for hunnkråkebollene og til ca. 72 % i september for hannkråkebollene. For begge kjønnene stiger andel vanninnhold igjen fram til mars, ca. 84 % for hunnkråkebollene og ca. 82 % for hannkråkebollene. Ved å sammenligne gonadeindeksen og andel vanninnhold er vanninnholdet forholdsvis høyt i juli/august når gonadeindeksen er minst. Både gonadeindeksen og andel vanninnhold stiger fra september og frem til februar/mars. Dette betyr at andel vanninnhold øker når kråkebollen blir kjønnsmoden.



Figur 3.7 Figurer som viser gjennomsnittlig gonadeindeks (t.v.) og gjennomsnittlig andel vann (t. h.) i gonadene for hvert av kjønnene. Hunnkråkebollene øverst og hannkråkebollene nederst.

Det er forskjell på gjennomsnittlig gonadeindeks for de to lokalitetene, A og B, og det er større naturlig variasjon for lokalitet B enn for lokalitet A (figur 3.8). Lokalitet A har høyere gjennomsnittlig gonadeindeks enn lokalitet B. Grunnen kan være at lokalitet B er mer vær-utsatt enn lokalitet A.



Figur 3.8 Gjennomsnittlig gonadeindeks for lokalitet A og B vist med ”means diamonds” (t.v.). ”Boxplotet” (t.h.) viser fordelingen av gonadeindeksen for de to lokalitetene A og B.

3.2 Fôringsforsøk

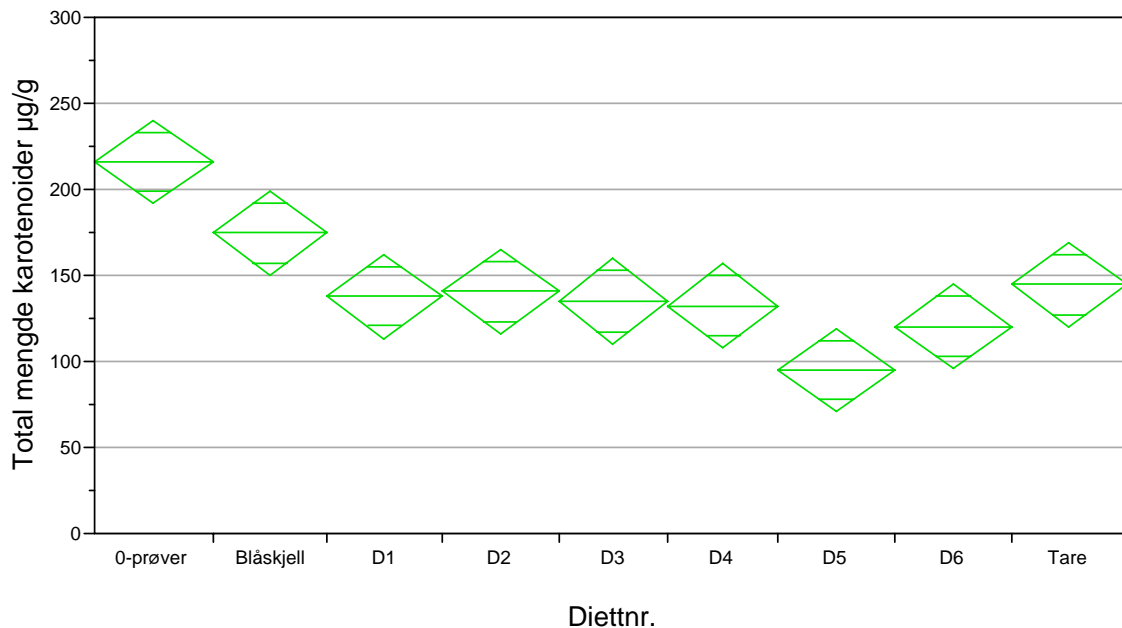
3.2.1 HPLC-karotenoidsammensetningen

Både restverdiene for total mengde karotenoider og de transformerte verdiene til denne ga ulik varians ved analyse med hensyn både til kjønn og hvilken diett som gjaldt. Ved samme analyser uten å ta hensyn til hvilket kjønn det var, ga en Box Cox transformasjon lik varians for restverdiene. Det var derfor ingen grunnlag for å si noe om kjønnsforskjeller. ANOVA-analysen for transformerte verdier ga at det var en effekt på hvilken diett som var blitt brukt (tabell 3.5).

Tabell 3.5 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for totalt mengde karotenoider i gonadene. Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Diettnummer	8	291665,2	36458,2	9,8997	0,0001
Feil	371	1366301,5	3682,8		
C. total	379	1657966,8			

0-prøvene som ble tatt før selve fôringsforsøket startet hadde det høyeste innhold av total mengde karotenoider (figur 3.9). Deretter kommer blåskjell med nest høyest innhold. De kunstige diettene D1, D2, D3, D4 og tare har ca. samme total mengde karotenoidinnhold. Diett 5 (D5) som ikke var tilsatt noen pigmenter har lavest innhold. Diett 6 (D6) som også var uten tilsatt pigment, men ble føret med tare i siste tredjedel av forsøket, ligger mellom D5 og de andre kunstige diettene.



Figur 3.9 Gjennomsnittlig total mengde karotenoider (µg/g) i gonaden for hver diett og 0-prøvene.

Alle tørrfôrdiettene i fôringsforsøket hadde signifikant lavere totalt karotenoidinnhold enn 0-prøvene (tabell 3.6). De naturlige diettene, blåskjell og tare, var ikke signifikant forskjellig fra 0-prøvene, men heller ikke forskjellig fra alle tørrfôrdiettene unntatt kontrollfôret, D5, uten tilsatt pigment. De naturlige diettene, blåskjell og tare, er på et mellomnivå mellom 0-prøvene og tørrfôrdiettene tilsatt pigment. Diett 5 er signifikant lavere enn alle de andre diettene unntatt diett 6. Diett 6 er ikke signifikant forskjellig fra noen unntatt 0-prøvene. Diett 6 er et mellomnivå mellom diett 5 og de andre kunstige diettene. Dette er fordi den var tilsatt tare den siste tredjedelen av forsøket.

Tabell 3.6 Tukey-Kramers test av total mengde karotenoider i gonaden for fôringsforsøket.

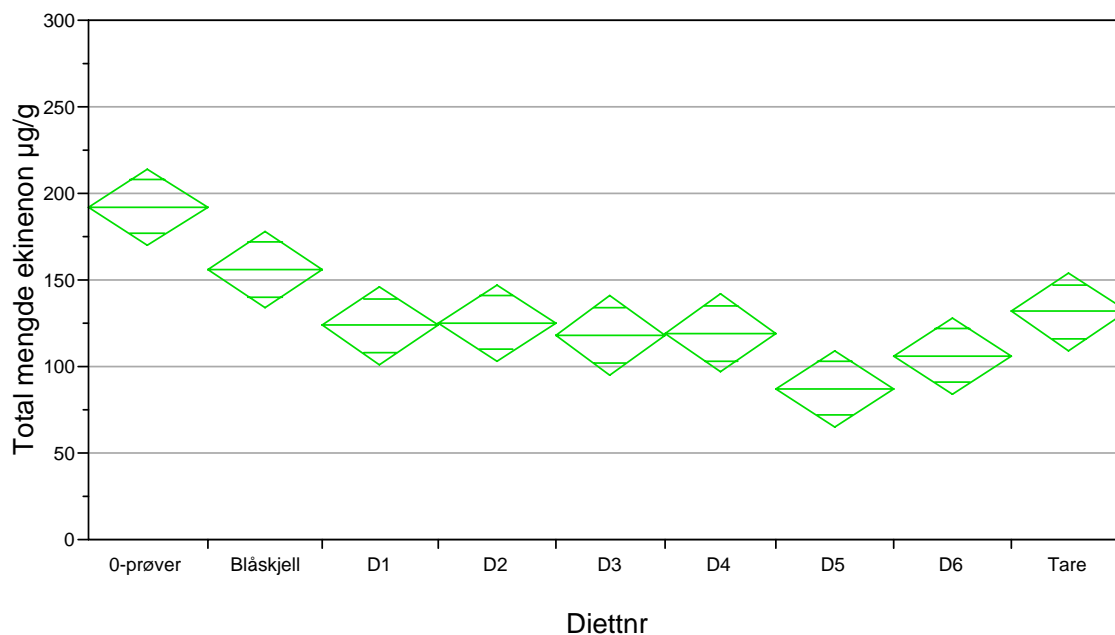
Faktorer	Tukey-Kramer		Gjennomsnitt for utransformerte verdier
0-prøver	A		216,09614
Blåskjell	A	B	175,03881
Tare	A	B	145,19024
D2	B		141,01953
D1	B		138,45310
D3	B		135,43550
D4	B		132,91463
D6	B	C	120,89860
D5	C		95,49884

Bartletts test ga de samme resultatene for mengde ekinenon som for total mengde karotenoider, ulik varians for både transformerte og ikke transformerte restverdier når det ble tatt hensyn til kjønn og diett. Transformerte restverdier, med Box Cox transformasjon, ga lik varians ved kun å ta hensyn til hvilken diett som var brukt. Heller ikke for ekinenon er det grunnlag for å si noe om kjønnsforskjeller. I følge ANOVA-testen har diettnummer effekt på resultatene (tabell 3.7).

Tabell 3.7 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for mengde ekinenon i gonadene. Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Diettnummer	8	221368,3	27671,0	9,4534	0,0001
Feil	371	1085951,1	2927,1		
C. total	379	1307319,4			

Også for mengde ekinenon er høyeste innhold for 0-prøvene og nest høyest for blåskjell (figur 3.10). De kunstige diettene D1, D2, D3, D4 og tare har likt innhold av ekinenon, mens diett 5 (D5) ligger lavest og D6 mellom D5 og resten av de kunstige diettene.



Figur 3.10 Gjennomsnittlig mengde ekinenon ($\mu\text{g/g}$) i gonadene for hver diett og 0-prøvene.

Tørrfôrdiettene, unntatt kontroldietten D5, hadde heller ikke for mengde ekinenon signifikant lavere innhold enn for 0-prøvene (tabell 3.8). De naturlige diettene, blåskjell og tare, er ikke signifikant forskjellig fra 0-prøvene, men heller ikke fra tørrfôrdiettene unntatt diett 5. Kontroldietten, D5, er signifikant forskjellig fra alle de andre diettene samt 0-prøvene. Diett 6 var ikke signifikant forskjellig fra noen av diettene, men forskjellig fra 0-prøvene.

Tabell 3.8 Tukey-Kramers test av mengde ekinenon i gonadene for fôringsforsøket.

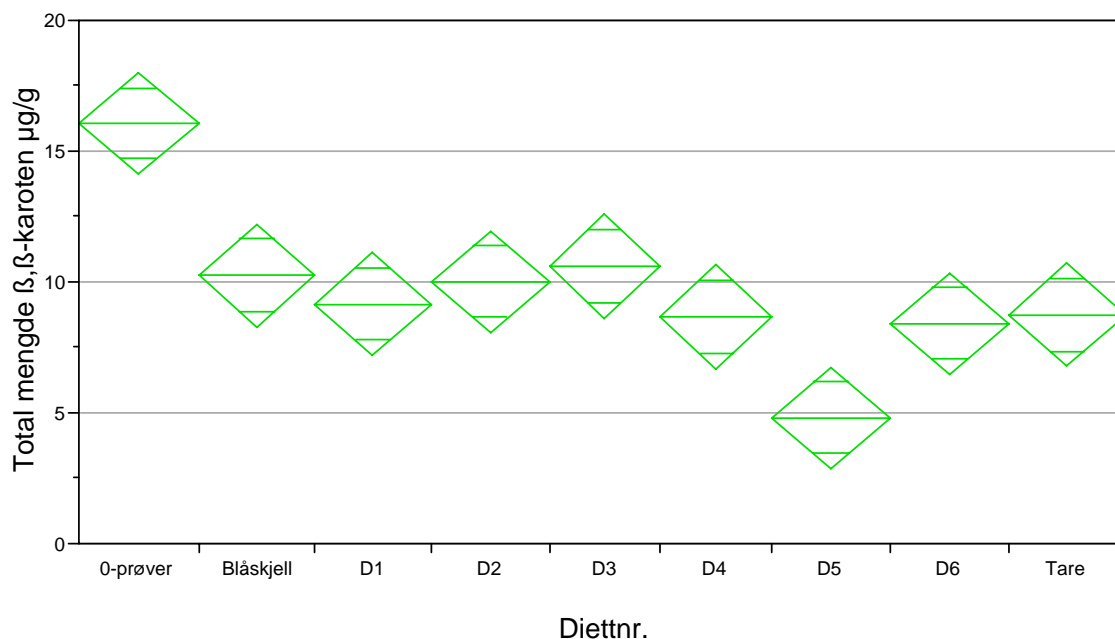
Faktorer	Tukey-Kramer			Gjennomsnitt for utransformerte verdier
0-prøver	A			192,66205
Blåskjell	A	B		156,64810
Tare	A	B	C	132,16643
D1		B	C	124,23452
D2		B	C	125,65465
D4		B	C	119,52244
D3		B	C	118,25600
D6			C D	106,72512
D5			D	87,82605

Også for β,β -karoten ga Bartletts test ulik varians for transformerte og ikke transformerte restverdier med hensyn både på kjønn og hvilken diett. Ved å kun ta hensyn til hvilken diett som ble brukt ble det lik varians for de transformerte restverdiene. ANOVA-testen ga at diettnummer hadde effekt på resultatene (tabell 3.9).

Tabell 3.9 Variansanalyse for Box Cox transformerte verdier for mengde β,β -karoten i gonadene. Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Diettnummer	8	2316,2965	289,537	14,6900	0,0001
Feil	371	7312,3280	19,710		
C. total	379	9628,6245			

Mengde β,β -karoten for de forskjellige diettene viser at innholdet er høyest for 0-prøvene og lavest for diett 5 (figur 3.11). For de andre diettene, inkl. dietten med blåskjell, ligger resultatet likt.



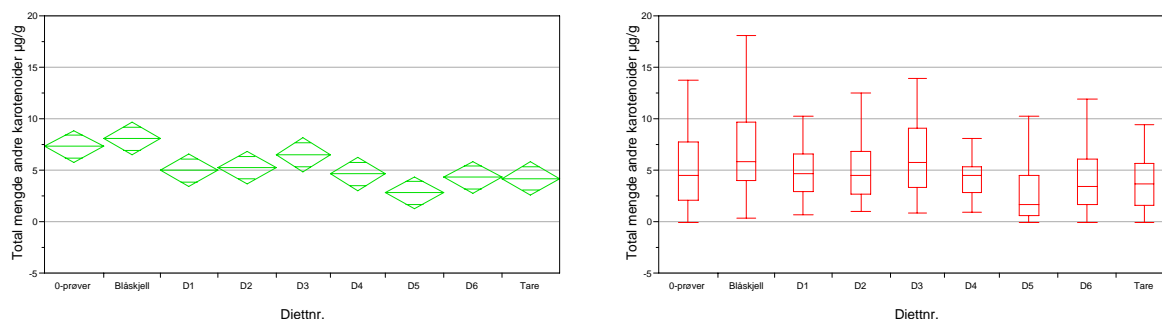
Figur 3.11 Gjennomsnittlig mengde β,β -karoten ($\mu\text{g/g}$) i gonadene for hver diett og 0-prøvene.

0-prøvene var signifikant forskjellig fra de naturlige diettene, blåskjell og tare, samt de kunstige diettene (tabell 3.10). Diett 3 var ikke signifikant forskjellig fra 0-prøvene. Diett 3 var den dietten som hadde høyest tilsats av β,β -karoten. D5 er signifikant forskjellig fra alle de andre diettene samt 0-prøvene.

Tabell 3.10 Tukey-Kramers test av mengde β , β -karoten i gonadene for fôringsforsøket.

Faktorer	Tukey-Kramer	Gjennomsnitt for utransformerte verdier
0-prøver	A	16,090909
D3	A B	10,638750
D2	B	10,061860
Blåskjell	B	10,289524
D1	B	9,189524
D4	B	8,704390
Tare	B	8,777143
D6	B	8,450930
D5	C	4,834884

Mengde andre karotenoider fikk ikke lik varians med Bartletts test. Det var heller ikke mulig å transformere disse verdiene. Det er likevel gjort en grafisk analyse som viser mengde andre karotenoider for hver diett (figur 3.12). Mengde andre karotenoider er litt høyere for diett 3 enn for de andre kunstige diettene tilsatt pigment. 0-prøvene og kråkebollene fôret med blåskjell har høyere innhold av andre karotenoider enn de kunstige diettene. Det er størst variasjon for blåskjelldietten.

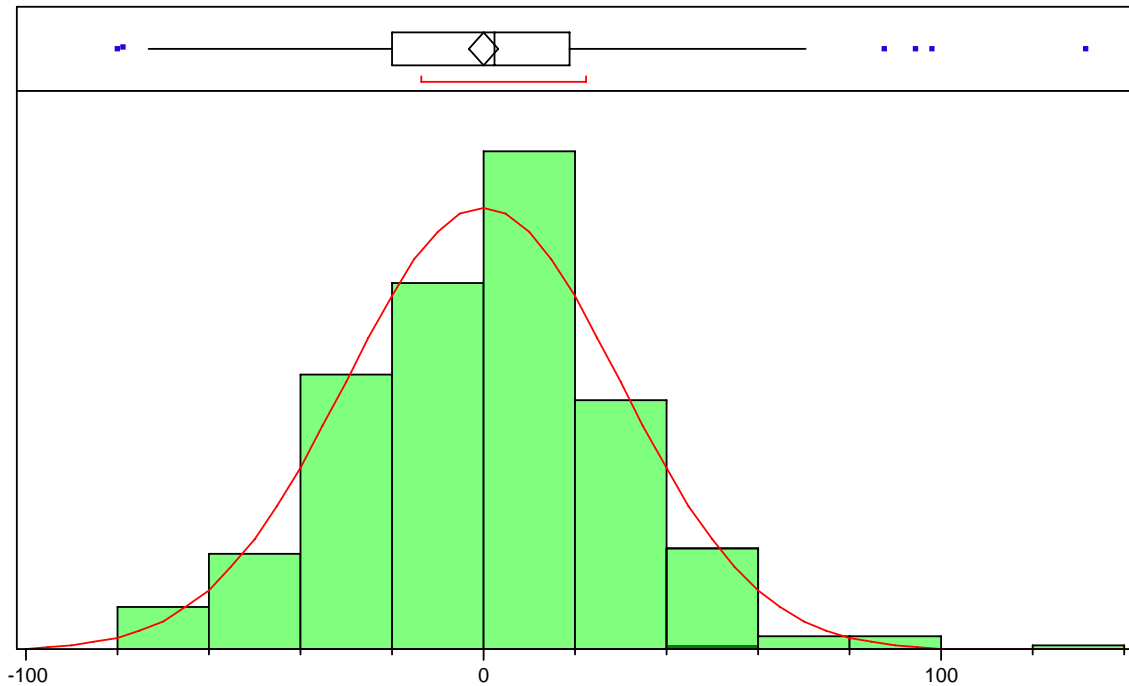


Figur 3.12 Gjennomsnittlig mengde andre karotenoider ($\mu\text{g/g}$) for hver diett vist med "means diamonds" (t.v.) og boxplot (t.h.).

3.2.2 Fargemålingene

Normalfordelingen til restverdiene (figur 3.13) for sammenhengen mellom total mengde karotenoider og fargemålingene ga et resultat for "Goodness of fit"-testen på $p < 0,0022$.

Derfor er ikke restverdiene normalfordelt. Det er fire verdier som er litt høyere, og hvis disse tas bort vil restverdiene være normalfordelt.



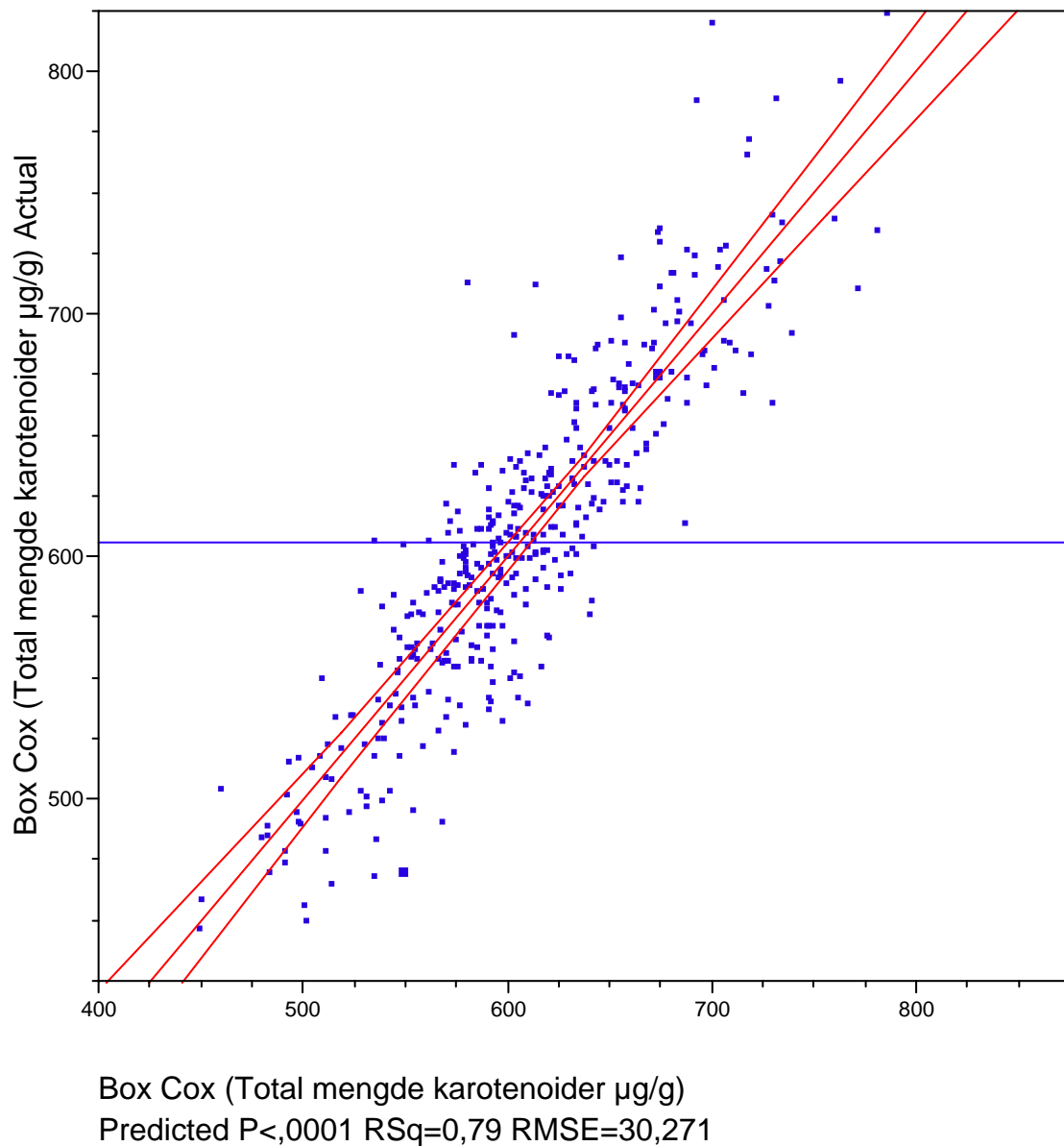
Figur 3.13 Normalfordelingskurven for restverdiene fra analysen av sammenhengen mellom total mengde karotenoid i gonadene og fargemålingen (interaksjonen mellom L^{*}-, a^{*}- og b^{*}-verdiene).

Variansanalyse av denne modellen viser at a^{*}- og b^{*}-verdiene, samt interaksjonen mellom a^{*}- og b^{*}-verdiene har en effekt (tabell 3.11). Det vil si at det er en sammenheng mellom rødheten og gulheten og total mengde karotenoider. L^{*} har ingen effekt som egen variabel, men i sammenheng med de andre verdiene har den en effekt. Spesielt i forbindelse med rødhet a^{*}. Interaksjonen L^{*} * a^{*} har en p-verdi på 0,0658. Dette er ganske nært grensen på 5 % for signifikansnivået.

Tabell 3.11 Variansanalyse for sammenhengen mellom Box Cox transformerte verdier for total mengde karotenoider $\mu\text{g/g}$ i gonadene og fargemålinger (interaksjonen mellom L*-, a*- og b*-verdiene). Det er brukt transformerte verdier i tabellen.

Faktor	Frihetsgrad	Kvadratsum	Midlere kvadratsum	F-verdi	p<
Modell	7	1316454,0	188065	205,2347	0,0001
L* (Lyshet)	1	121,55	121,55	0,1326	0,7159
a* (Rødhet)	1	861522,79	861522,79	940,1778	0,0001
b* (Gulhet)	1	48546,20	48546,20	52,9783	0,0001
L* (Lyshet)* a* (Rødhet)	1	3119,22	3119,22	3,4040	0,0658
L* (Lyshet)* b* (Gulhet)	1	2104,31	2104,31	2,2964	0,1305
a* (Rødhet)*b* (Gulhet)	1	20960,11	20960,11	22,8737	0,0001
L* (Lyshet)*a* (Rødhet)* b* (Gulhet)	1	614,11	614,11	0,6702	0,4135
Feil	372	340878,6	916		
C. total	379	1657332,6			

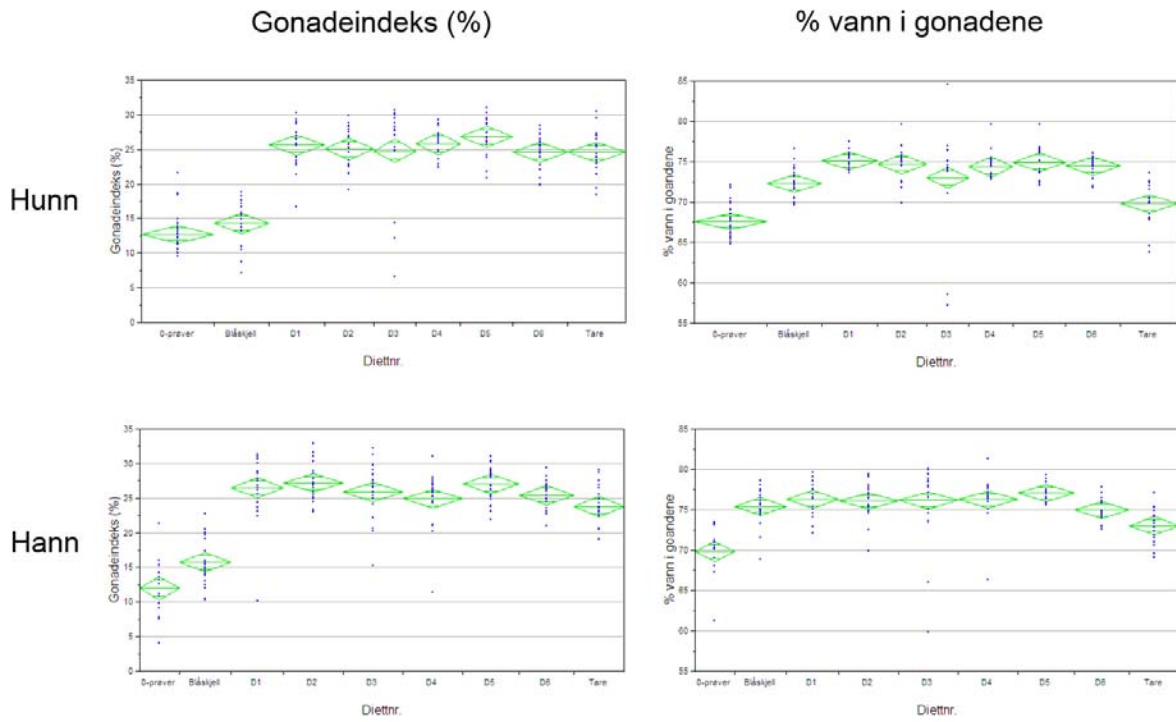
Modellen for sammenhengen mellom total mengde karotenoider og fargemålingen forklarer 79 % av variasjonen (figur 3.14). Dette er mye høyere enn for de månedlige naturlige prøvene.



Figur 3.14 Regresjonskurve for observerte Box Cox transformerte verdier for total mengde karotenoid i gonaden i forhold til verdier beregnet fra fargemålingene (interaksjonen mellom L*-, a*- og b*-verdiene). Y-aksen viser observerte verdien og x-aksen viser verdier som er beregnet (predicted) fra fargemålingen.

3.2.3 Gonadeindeksen

Restverdiene til gonadeindeksen og restverdiene til de transformerte gonadeindeksverdiene ga begge ulik varians. En grafisk analyse av gonadeindeksen viser at alle prøvene unntatt blåskjell har doblet størrelsen fra ca. 12,5 %, for 0-prøvene, til ca. 25 % (figur 3.15). Dette gjelder både hunn- og hannkråkebollene. Samtidig har vanninnholdet økt fra ca. 68 % til ca. 75 % for hunnkråkebollene og fra ca. 70 % til 77 % for hannkråkebollene.



Figur 3.15 Gjennomsnittlig gonadeindeks (%) (t.v.) og andel vann (t.h.) i gonadene for hver diett og 0-prøvene. Hunnkråkebollene øverst og hannkråkebollene nederst.

4 Diskusjon

4.1 Karotenoidsammensetningen

Alle de tørrfôrbaserte diettene i fôringsforsøket hadde signifikant lavere totalt karotenoidinnhold og ekinenoninnhold enn 0-prøvene (tabell 3.6 og tabell 3.8). Grunnen til dette er at pigmentinnhold i fôret ikke har vært tilstrekkelig til å kompensere for økningen i gonadeindeksen. Gonadeindeksen ble fordoblet for de tørrfôrbaserte diettene i forhold til 0-prøvene (figur 3.15).

De naturlige diettene, blåskjell og tare, hadde ikke signifikant forskjellig innhold av total mengde karotenoider og ekinenon fra 0-prøvene. Men heller ikke fra tørrfôrdiettene unntatt kontrollfôret (diett 5) som ikke var tilsatt β,β -karoten. 0-prøvene hadde signifikant høyere innhold av total mengde karotenoider og mengde ekinenon i gonadene enn noen av diettene. Årsaken til at 0-prøvene hadde et høyere karotenoidinnhold kan være at den naturlige dietten består av flere typer karotenoider enn β,β -karoten som i de kunstige diettene. Det vil si at i naturen er det flere matkilder som gir karotenoider som kan omdannes til ekinenon.

Kråkebollene som var fôret med blåskjell hadde en høy andel av karotenoider noe som kan bety at kråkebollene ikke har greid å åpne en del av blåskjellene de ble fôret med. Ved fôringen av blåskjell til kråkebollene under fôringsforsøket ble det ikke tatt hensyn til blåskjellenes størrelse. Forsøk som har blitt utført (N. T. Hagen, personlig kommunikasjon) viste at kråkebollene ikke greier å åpne blåskjell som er større enn 30 mm. Derfor kan de ha blitt fôret med for mange store blåskjell, slik at de ikke greide å åpne en stor nok mengde for at denne diettene har hatt noen påvirkning på karotenoidinnholdet i gonaden.

For mengde β,β -karoten i gonaden er diett 5, uten tilsats av pigmenter, signifikant lavere i forhold til alle de andre diettene og 0-prøvene (tabell 3.10). Til forskjell fra total mengde karotenoider og ekinenon er alle de kunstige diettene, unntatt diett 3, signifikant lavere innhold enn 0-prøvene. Blåskjell og tare har også signifikant lavere innhold enn 0-prøvene. Diett 3 ga noe høyere gjennomsnittlig innhold av β,β -karoten enn de andre diettene. Det var også denne dietten som hadde høyeste tilsatte mengde pigment. Mengde andre karotenoider kunne ikke analyseres statistisk, men ble analysert grafisk. Figur 3.12 viser at 0-prøvene og blåskjellprøvene hadde høyest innhold av pigmenter. Diett 3 ga, også for mengde andre karotenoider, litt høyere pigmentinnhold enn de andre kunstige diettene som er tilsatt pigmenter.

Resultatene for de kunstige diettene i fôringsforsøket viser at mengde tilsatt β,β -karoten i dietten ikke har noe å si på hvor høyt det totale innholdet av karotenoider er i gonadene. Det vil si at mengden β,β -karoten ikke er en begrensende faktor, og økningen på mer enn 250 mg/kg β,β -karoten i fôret ikke har effekt på karotenoidinnholdet i gonaden. Kråkebollene som var fôret med tare har ikke signifikant forskjellig innhold av karotenoider enn alle de kunstige diettene med tilsatt pigment.

For de månedlige prøvene viste det seg at det var en betydelig forskjell på total mengde karotenoidinnholdet i hann- og hunnkråkeboller, ca. 100 $\mu\text{g/g}$ i gjennomsnitt. Hannkråkebollene hadde høyest innhold. Borisovets et al. (2002) har i sine forsøk med *Strongylocentrotus nudus* også kommet fram til at innholdet av karotenoider var høyere for hannkråkebollene enn for hunnkråkebollene. Dette stemmer med resultatene som Lamare & Hoffman (2004) kom fram til for *S. droebachiensis*. Grunnen til at karotenoidinnholdet er høyere for hannkråkebollene kan være at det blir utskilt lite karotenoider under gyting. Det ble gjort et forsøk på å ekstrahere karotenoider fra spermceller, men det ble ikke påvist målbare mengder av karotenoider.

Den generelle tendensen for de månedlige prøvene er at gonadene inneholder mest karotenoider i juli og minker fram til oktober før den stiger igjen fram til mars. Dette gjelder både total mengde karotenoider, mengde ekinenon og mengde β,β -karoten.

Mengde andre karotenoider kunne heller ikke for de månedlige prøvene analyseres statistisk, men figur 3.4 viser at for hunnkråkebollene er innholdet høyest i august før det minker fram til oktober. Det holder seg videre stabilt til februar før deretter å ha en liten økning. For hannkråkebollene er resultatet mer variert. De inneholder mest karotenoider i juli og minst i oktober.

Ved sammenligning med andre resultater med *S. droebachiensis* (Griffiths & Perrott 1976) viser det seg at tendensen ikke er den samme. Griffiths & Perrott har høyest innhold av karotenoider i desember og avtar deretter til i april før innholdet begynner å stige igjen. Dette kan være på grunn av geografiske forskjeller mellom deres forsøk og dette forsøket. Lamare & Hoffman (2004) har en mer lik tendens, der karotenoidinnholdet avtar fra mai og til august. Etter august ble ikke innholdet av karotenoider undersøkt før i desember. Da var innholdet på samme nivå som for august. Innholdet avtar igjen til januar.

Det var ingen signifikant forskjell mellom lokalitet A og B for innhold av total mengde karotenoider, mengde ekinenon og mengde β,β -karoten (tabell 3.1, tabell 3.2 og tabell 3.3). Dette tyder på at kråkebollene har tilgang på omtrent samme type mat på begge lokalitetene.

I desember er det en topp for mengde totalt karotenoidinnhold, mengde ekinenon og mengde β,β -karoten. Denne toppen kan antakelig forklares med at det er tatt for få prøver i forhold til den naturlige variasjonen.

Økningen i karotenoidinnholdet fra november fram til mars har sammenheng med at kråkebollene begynner å modnes og forbereder seg på gyting. Karotenoidinnholdet økes antakeligvis på grunn av den beskyttelsesfunksjonen den har for eggene og larvene, og hvor godt disse overlever (Borisovets et al. 2002). Hos laks har det ikke blitt påvist at karotenoider har noen påvirkning på verken overlevelse eller kvaliteten til eggene (Christiansen & Torrissen 1997).

4.2 Gonadeindeksen

Gonadeindeksen for alle diettene, unntatt blåskjell, hadde doblet størrelsen fra ca. 12,5 % for 0-prøvene til ca. 25 % (figur 3.15), både for hann- og hunnkråkebollene. Vanninnholdet hadde den samme tendensen som gonadeindeksen. Men for blåskjelldietten var vanninnholdet høyere og for dietten med tare var vanninnholdet litt lavere.

0-prøvene og den naturlige dietten med blåskjell hadde lavest gonadeindeks og høyest karotenoidinnhold. Mens de kunstige diettene ga en høyere gonadeindeks og mindre innhold av karotenoider. Diettene med tare ga en høy gonadeindeks og har et karotenoidnivå som ligger på et mellomnivå mellom 0-prøvene og de kunstige diettene tilsatt pigment. Totalt karotenoidinnholdet og mengde ekinenon har blitt halvert fra 0-prøvene til kråkebollene som fikk kontrolldietten (D5). Det betyr at total mengde karotenoider i gonadene er det samme som ved fôringsforsøkets start. Det vil si at når gonadeindeksen øker vil konsentrasjonen av karotenoider bli mindre. De kunstige diettene har bare delvis greid å kompensere for økningen i gonadeindeksen.

Det ble også for de månedlige prøvene beregnet gonadeindeks for å se om denne ble forandret over tiden. Siden kråkebollen gyter i februar/mars burde gonadeindeksen øke fram til denne perioden, for deretter å avta igjen etter gytingen. Den laveste gonadeindeksen er i juli og august, både for hann- og hunnkråkeboller. I september øker den og holder seg stabil fram til og med januar. I februar når gytingen begynner øker den igjen og minker til mars.

Vanninnholdet i gonaden er høyt i juli og minker til i november for hunnkråkebollene og september for hannkråkebollene. Etter dette øker vanninnholdet igjen fram til mars.

Forklaringen på at innholdet av karotenoider er så høyt i juli når den er helt utgytt kan være at kråkebollene, spesielt hannkråkebollene, beholder noe av sitt karotenoidinnhold selv om gonaden blir mindre, og derfor er innholdet høyt selv om gonaden er liten. Utover sommeren og høsten vil gonaden vokse seg større og oppta mer opplagsnæring. Gonadevekst og differensiering av gameter starter på høsten (Falk-Petersen & Lønning 1983). Siden vanninnholdet øker fra november for hunnkråkebollene og september for hannkråkebollene har det antakeligvis en sammenheng med kjønnsmodningen og gytingen. Vanninnholdet har litt større variasjon for hannkråkebollene. Denne variasjonen kan komme av at hannkråkebollene starter kjønnsmodningen litt tidligere enn hunnkråkebollene.

Resultatet viser også at gonadeindeksen er større for lokalitet A enn for lokalitet B. I tillegg er det større variasjon i lokalitet B, enn for lokalitet A. Dette kan være fordi lokalitet B er en mer utsatt lokalitet og tilgangen til mat antakelig er mer variabel på denne lokaliteten.

Total mengde karotenoidinnholdet i november er på ca. 140 µg/g og gonadeindeksen i samme måned er ca. 13 %. November er samme måned som prøvetakingen for fôringsforsøket. De kunstige diettene, tilsatt pigment, i fôringsforsøket hadde en gjennomsnittlig total mengde karotenoidinnhold på ca. 140 µg/g, mens gonadeindeksen var ca. 25 %. Dette viser at det er lavere karotenoidinnhold i gonadene til kråkebollene som har blitt føret kunstige dietter tilsatt pigment i forhold til de ville kråkebollene.

4.3 Fargemålingene

I fargemålingene for fôrprøvene er det en veldig god sammenheng mellom mengde karotenoider og fargemålingen. Regresjonsmodellen forklarer 79 % av variasjonene (figur 3.14). For de månedlige prøvene var variasjonene mellom farge og pigmentinnhold større og modellen forklarer 59 % (figur 3.6). Det er to mulige årsaker til den økte variasjonen. Den ene er at det er tatt for få prøver i forhold til den naturlige variasjonen, den andre er at det er en reell forskjell på grunn av variabelt innhold av karotenoider i den naturlige dietten, for eksempel flere typer alger og små krepsdyr. Det ble prøvd å bruke den beregnede formelen fra regresjonskurven til fôringsforsøket på de månedlige prøvene. Men dette ga ikke noen bedre resultater. Verken for de månedlige prøvene eller for fôringsforsøket har restverdiene blitt normalfordelt. Blant resultatene er det noen ”utliggere” som det ikke er noen grunn til å fjerne. Dataen fra prøvetakingen har blitt undersøkt for å finne ut om det var en sammenheng mellom utliggerne, om noen var ekstreme, missfargede eller lignende, slik at det var mulig å finne en grunn til å fjerne disse. Det var ingen slik sammenheng.

4.4 Videre arbeid

Det bør jobbes videre med å finne en kunstig diett som er ideell for kråkebollene. Mengde β,β -karoten som var tilsatt i tørrfôrdiettene viste seg å ikke være en begrensende faktor, og en økning på mer enn 250 mg/kg β,β -karoten i tørrfôret har ingen effekt på karotenoidinnholdet i gonaden. Det burde derfor bli prøvd ut dietter med andre sammensetninger av karotenoider, noe som allerede er på gang (Robinson et al. 2002, McLaughlin & Kelly 2001, Shpigel et al. 2005).

Resultatet fra sammenligningen av total mengde karotenoider og fargemålingen for fôringsforsøket ga et godt resultat. Dette kan gjøre det mulig å standardisere fargen på gonaden og å beregne mengde pigment (spesielt ekinenon) med relativt høy presisjon i fremtidig oppdrett av kråkeboller. Tilsvarende sammenheng er også vist mellom kjøttfarge og astaxantininnhold hos laks (Christiansen et al. 1995).

5 Konklusjon

Månedlige prøvetakinger:

- Det er en forskjell på ca. 100 µg/g for total mengde karotenoid og mengde ekinenon mellom hannkråkebollene, gjennomsnittlig ca. 300 µg/g, og hunnkråkebolle, gjennomsnittlig ca. 200 µg/g.
- Total mengde karotenoid, mengde ekinenon og mengde β,β-karoten er høyest i juli og minker fram til oktober før den stiger igjen til februar. Gonadeindeksen er lavest i juli og stiger i september hvor den holder seg stabil fram til februar der den øker igjen. Dette gjelder både hann- og hunnkråkebollene. Vanninnholdet minker fra juli til november for hunnkråkebollene og til september for hannkråkebollene før det stiger igjen til mars.
- Regresjonsmodellen for sammenhengen mellom fargemålingene (interaksjonen mellom L^* , a^* og b^*) og total mengde karotenoider forklarer 59 % av variasjonen.

Fôringsforsøk:

- For total mengde karotenoider og mengde ekinenon er 0-prøvene signifikant forskjellig fra de kunstige diettene, unntatt kontrolldietten (D5) som ikke er tilsatt pigment.
- For total mengde karotenoider og mengde ekinenon er de naturlige diettene, blåskjell og tare, ikke signifikant forskjellig fra 0-prøvene, men heller ikke fra de kunstige diettene unntatt kontrolldietten (D5).
- For mengde β,β-karoten er 0-prøvene signifikant høyere for alle diettene unntatt diett 3.
- Regresjonsmodellen for sammenhengen mellom fargemålingene (interaksjonen mellom L^* , a^* og b^*) og total mengde karotenoider forklarer 79 % av variasjonen.
- Gonadeindeksen til de kunstige diettene og dietten med tare doblet størrelsen i forhold til 0-prøvene fra ca. 12,5 % til ca. 25 %.

6 Litteraturliste

Anderson, H. A., J. W. Mathieson & R. H. Thomson, 1969. Distribution of spinochrome pigments in echinoids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 333-345.

Bodø Kommune, 2006. Kartdata fra Bodø kommune på Internett, <http://bodokart.norkart.no/default.asp?lat=13500&lon=8090&Mstokk=165000&kart=Grunnkart>, Bodø.

Borisovets, E. E., P. A. Zadorozhny, M. V. Kalinina, N. V. Lepskaya & E. V. Yakush, 2002. Changes of major carotenoids in gonads of sea urchins (*Strongylocentrotus intermedius* and *S-nudus*) at maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 132: 779-790.

Braithwaite, A. & F. J. Smith, 1996. *Chromatographic Methods*. 5 etd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Britton, G., S. Liaaen-Jensen & H. Pfander, 1995a. *Carotenoids Volume 1A: Isolation and analysis*. 1 etd., Birkhäuser Verlag, Basel.

Britton, G., S. Liaaen-Jensen & H. Pfander, 1995b. *Carotenoids Volume 1B: Spectroscopy*. 1 etd., Birkhäuser, Basel.

Britton, G., S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, A. Z. Mercadante & E. S. Egeland, 2004. *Carotenoids Handbook*. 1 etd., Birkhäuser Verlag, Basel.

Brusca, R. C. & G. J. Brusca, 2002. *Invertebrates*. 2 etd., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Christiansen, R., G. Struksnæs, R. Estermann & O. J. Torrissen, 1995. Assessment of flesh colour in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research*, 26: 311-321.

Christiansen, R. & O. J. Torrissen, 1997. Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture*, 153: 51-62.

Christie, H., J. Rueness, J. O. Bustnes, S. Fredriksen & K. Sjøtun 1998. Tareskog, Kystøkologi-den ressursrike norskekysten. 1 etd., s. 165-189. Universitetsforlaget AS, Tangen/Oslo.

Falk-Petersen, I.-B. & S. Lønning, 1983. Reproductive cycles of two closely related sea urchin species, *Strongylocentrotus droebachiensis* (O.F. Müller) and *Strongylocentrotus pallidus* (G.O. Sars). *Sarsia*, 68: 157-164.

George, S. B., A. L. Lawrence, J. M. Lawrence, J. Smiley & L. Plank, 2001. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*, 199: 353-369.

Greibrokk, T., E. Lundanes & K. E. Rasmussen, 1984. *Kromatografi*. 3 etd., Universitetsforlaget AS, Oslo.

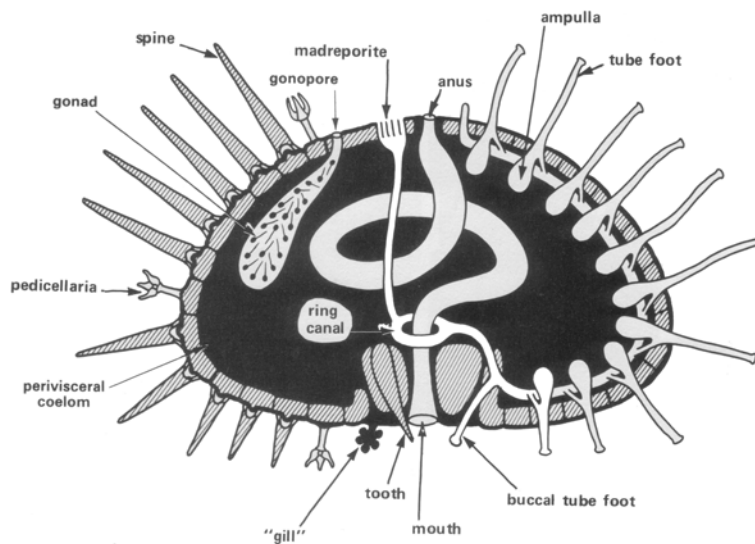
- Griffiths, M. & P. Perrott, 1976. Seasonal changes in the carotenoids of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 55 B: 435-441.
- Hagen, N. T., 1983. Destructive grazing of kelp beds by sea urchins in Vestfjorden, northern Norway. *Sarsia*, 68: 177-190.
- Hagen, N. T., 1987. Sea urchin outbreaks and nematode epizootics in Vestfjorden, northern Norway. *Sarsia*, 72: 213-229.
- Hagen, N. T., 1996. Echinoculture: from fishery enhancement to closed cycle cultivation. *World Aquaculture*, s. 6-19.
- Hagen, N. T., 1999. Kråkebolleoppdrett i Nord-Norge. Høgskolen i Bodø, 23 sider.
- Henriksen, P. 1998. Aschehoug og Gyldendals Store Norske leksikon, Bind 13, 3 etd., s. 267-268. Kunnskapsforlaget, Oslo.
- Jones, G. M. & N. T. Hagen, 1987. *Echinomermella matsi* sp.n., an endoparasitic nematode from the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in northern Norway. *Sarsia*, 72: 203-212.
- Kealey, D. & P. J. Haines 2002. E8 Ultraviolet and visible molecular spectrometry: principles and instrumentation, *Analytical chemistry*. 1 etd., s. 223-227. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Kol'stova, E. A., V. A. Denisenko & Maksimov, 1978. Quinoid pigments of Echinodermata V. Pigments of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Chemistry and Natural Compounds*, 371-374.
- Lamare, M. D. & J. Hoffman, 2004. Natural variation of carotenoids in the eggs and gonads of the echinoid genus, *Strongylocentrotus*: implications for their role in ultraviolet radiation photoprotection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312: 215-233.
- Lawrence, J. M., R. Montoya, S. B. McBride & L. G. Harris, 2003. Carotenoid concentrations and profiles in testes, ovaries and eggs of the sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Strongylocentrotus franciscanus* and *Lytechinus variegatus*. *The international conference on sea-urchin fisheries and aquaculture, Puerto Varas, Chile*, s. 173-178.
- Matsuno, T. & M. Tsushima 2001. Carotenoids in sea urchins, *Edible sea urchins: biology and ecology*. 1 etd., s. 115-138. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- McLaughlin, G. & M. S. Kelly, 2001. Effect of artificial diets containing carotenoid-rich microalgae on gonad growth and color in the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin). *Journal of shellfish research*, 20: 377-382.
- Minolta Camera Co., L., 1991. Minolta Chroma Meters CR-300/CR-310/CR-321/CR-331/CR-331C/CT-310 (Beskrivelse), Osaka, Japan.
- Moen, F. E. & E. Svensen, 2003. *Dyreliv i havet, Nordeuropeisk marin fauna*. 3 etd., KOM Forlag A/S, Kristiansund.

- Pearce, C. M., T. L. Daggett & S. M. C. Robinson, 2002. Effect of binder type and concentration on prepared feed stability and gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, 205: 301-323.
- Pearse, V., J. Pearse, M. Buchsbaum & R. Buchsbaum, 1987. *Living invertebrates*. 1 ed., Blackwell Scientific Publications, The Boxwood Press, Palo Alto, California.
- Robinson, S. M. C., J. D. Castell & E. J. Kennedy, 2002. Developing suitable colour in the gonads of cultured green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture*, 206: 289-303.
- SAS Institute Inc., 2005. JMP IN 5.1.
- Scheibling, R. E. & B. G. Hatcher 2001. The ecology of *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. ed., s. 271-297. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Shpigel, M., S. C. McBride, S. Marciano, R. Shiri & A. Ben-Amotz, 2005. Improving gonad colour and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 101-109.
- Solomons, G. & C. Fryhle 1998. Chapter 13 / Conjugated unsaturated systems, *Organic chemistry*. 7 ed., s. 571-618. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Thomson, R. H. 1971. Naturally occurring quinones, *Naturally occurring quinones*. 2 ed., s. 256-366. Academic press inc., London.
- Tsushima, M., S. Amemiya & T. Matsuno, 1993a. Comparative biochemical-studies of carotenoids in sea urchins. 2. The more primitive sea urchins belonging to the orders *Cidaroida*, *Echinothurioida*, *Diadematoidea* and *Arbacioidea*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 106: 729-735.
- Tsushima, M., T. Kawakami & T. Matsuno, 1993b. Metabolism of carotenoids in sea-urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 106: 737-741.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*. 4 ed., Prentice-Hall Inc., New Jersey.

Appendiks A: Kråkeboller

Kråkeboller tilhører klassen Echinoidea, sjøpinnsvin (Henriksen 1998). Det skiller mellom to underklasser; Cidaroidea, fossile arter, og Euechinoidea, ekte sjøpiggsvin (Moen & Svensen 2003). Sjøpinnsvin lever i alle hav, fra kysten og ned til store dyp. De spiser alger, tare, smådyr, skjell, krepsdyr og muslinger (Henriksen 1998).

Kroppen til kråkebollen er dekket av mangelkantede kalkplater som er ordnet i 10 meridionale dobbelttrekker og sammenføyd til en fast kapsel (Henriksen 1998). Figur 6.1 viser et bilde av en kråkebolle og hvilke deler den består av.

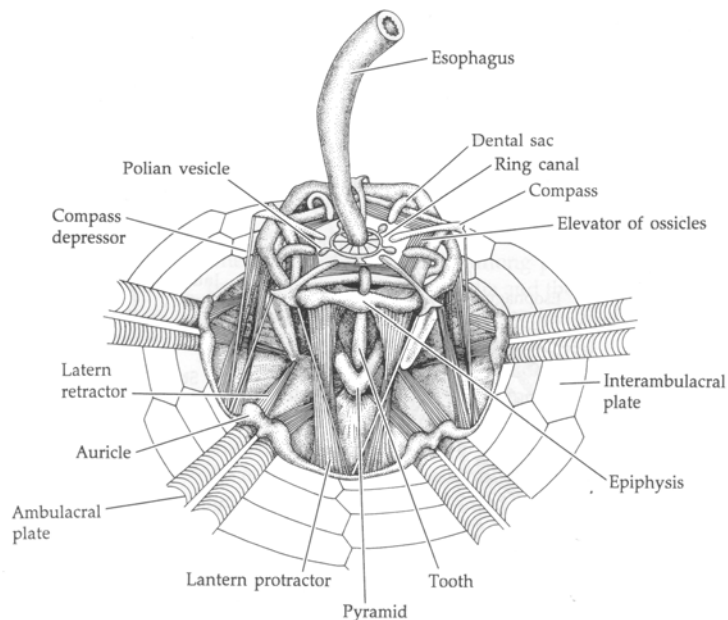


Figur 6.1 Oversikt bilde av en kråkebolle (Pearse et al. 1987). Figuren viser de viktigste delene i en kråkebolle som for eksempel munnapparat, gonade, pigger og sugeføtter.

På yttersiden av platene er det mange små, halvkuleformede leddknuter, tuberkler, hvor piggene er festet. Piggene er bevegelige og brukes som forsvars- og bevegelsesorganer (Henriksen 1998). Skjellettet produserer også unike klypelignende strukturer som kalles pedicellariar. Disse strukturene reagerer på ytre stimuli uavhengig av hovednervesystemet, og de innehar deres egne nevro-muskulære reflekskomponenter (Brusca & Brusca 2002).

De fem dobbelttrekkene som kan kalles hovedradiene, kalles ambulakralrekker, de andre kalles interambulakralrekker. Ambulakralplatene er gjennomboret av et eller flere par med porer hvor sugeføttene er festet. Sugeføttene står i forbindelse med vannkanalsystemet. Sugeføttene er ordnet i fem brede rekker. De er bevegelsesorganer og brukes til å føre næring til munnen m.m. (Henriksen 1998).

Munnen ligger på undersiden, midt i et bløtt felt som kalles peristommembranen. I munnen er det fem skarpe, spisse kalktenner som beveges ved et sammensatt apparat av kalkstaver og muskler (kalt Aristoteles' lanterne) (Henriksen 1998). Figur 6.2 viser hvordan munnapparatet til kråkebollen ser ut.



Figur 6.2 Oversiktsbilde over munnapparatet til en kråkebolle (Brusca & Brusca 2002). Figuren viser hvordan munnapparatet til en kråkebolle er bygd opp.

Analåpningen ligger på toppen i et felt som kalles periprokt. Periproktfeltet er der de 10 dobbelte platerene ender med en uparet plate. 5 av disse, de interambulakrale genitalplatene, er gjennomboret av utførselskanalene for forplantningsorganene (Henriksen 1998).

Sjøpinnsvin er særkjønnet. De store kjønnskjertlene, gonadene, ligger i skallets øvre halvdel. De finnes vanligvis i 5 deler, men kan også sjeldnere finnes i 4 eller 2 deler (Henriksen 1998). Dette er den spiselige delen i en kråkebolle.

Appendiks B: *Strongylocentrotus droebachiensis*

Strongylocentrotus droebachiensis, den grønne kråkebollen, er en kaldtvannsart og finnes i store deler av den nordlige halvkule. Den finnes på begge sider av Nord-Atlanteren og ved vestkysten av Canada og Alaska. I tillegg finnes den langs hele norskekysten (Christie et al. 1998).

S. droebachiensis finnes fra 0 til 300 meter, men er mest vanlig å finne i det grunne tidevannsområdet fra 0 til 50 m (Scheibling & Hatcher 2001). Den er også funnet helt ned til 1200 meters dyp (Moen & Svensen 2003).

Det typiske underlaget der en finner *S. droebachiensis* er hardt og steinete, men er også funnet på småsteinsbunn på dypere vann (Scheibling & Hatcher 2001). De finnes gjerne i delvis beskyttende lokaliteter (Moen & Svensen 2003).

S. droebachiensis kan bli opptil 80 mm i diameter. Den har et grønnfarget skall, og grønnlig, rødlig eller fiolette pigger med hvit spiss. Skallet er vanligvis noe flattrøkt. (Moen & Svensen 2003).

Skallet er tett besatt med tuberkler (knuter), hvor de største (primære) danner tydelige lengderækker. Hos store individer danner de også små (sekundære) tuberkle lengderækker. Skallet har 5-6 porepar i hver ambulakralplate (Moen & Svensen 2003).

S. droebachiensis beiter på alger, særlig tare, men også på ulike fastsittende dyr (Moen & Svensen 2003).

Formeringen foregår i hovedsak på senvinteren/våren (Moen & Svensen 2003).

Store områder som er egnet for tare okkuperes av beitende kråkeboller som hindrer at taren etablerer seg (Hagen 1983). På 1970-tallet kom det beskjeder om at tareskogen var blitt borte flere steder langs norskekysten. Flere undersøkelser ved langs kysten fra Møre til Finmark viser at nedbeiting av tare er utbredt fra Trøndelag til Finmark og at det er en sammenheng mellom høy tetthet av *S. droebachiensis* og mangel på store fastsittende alger. Det er ulike meninger om hva som kan være årsaken til dette. Det har lenge vært foreslått at nedgang av predatorer av kråkeboller kunne være en årsak. Men også flere faktorer, som for eksempel faktorer som fremmer utvikling av kråkeboller og som hemmer oppvekst av tareskogen eller klimaendringer, kan være årsak til dette (Christie et al. 1998).

Appendiks C: Forsøksprosedyre for prøvetaking

1. Vei kråkebollen, noter ned.
2. Mål diameter og høyde på kråkebollen, noter ned.
3. Åpne kråkebollen med en pinsett og ta ut en liten gonadeprøve som veies, noter vekta.
4. Ta en liten prøve fra denne og legg på et objektglass med et dekkglass over. Se i mikroskopet og finn ut hvilket kjønn det er. Noter ned. Resten av prøven haes i et lite prøveglass for DNA-bestemmelse.
5. Ta ut resten av gonaden og tarmen. Legg gonaden på et papir for avrenning og legg tarmen i ei lita sil for avrenning.
6. Vei gonaden og tarmen. Noter vekta.
7. Sammenlign farge på gonaden med et fargekart. Noter ned hvilke farge.
8. Analyser fargen på gonade med et Minolta Chromameter. Sett sammen delene til prøvekommeret, ha litt gonadeprøve i hullet. Legg over glasset og skru på siste del. Sett måleren ned i prøvekommeret og mål 5 ganger. For hver gang det måles vis prøvekommeret litt.

Appendiks D: Forsøksprosedyre for ekstraksjon

1. Knus den frysetørkede gonaden i prøveglasset med en plastskje og vei ut ca 0,05 g gonade i et reagensrør merket med prøvens nummer/navn. Sett på en plastpropp.
2. Ha på 1 ml aceton ved hjelp av en automatpipette.
3. Ha på nitrogen over prøven og sett på proppen igjen.
4. La prøven stå over natten i kjøleskapet.
5. Bruk en glasspipette med smokk til å suge opp væsken og overfør denne til et nytt reagensrør (lite) (reagensrør nummer 2) merket med prøvens nummer/navn.
6. Ha nitrogen over prøven og sett en plastpropp på røret.
7. Gjenta pkt. 3-5.
8. Sett væskeprøven i reagensrør nummer 2 i inndamperen og la den stå til den er tørr.
9. Ta ut prøven fra inndamperen og tilsett 0,5 ml aceton ved hjelp av en automatpipette.
Rist.
10. Dra prøven opp i en sprøyte (1 ml) og sett på et sprøytefilter, porestørrelse 2 μm .
Sprøyt prøven ut i et HPLC-prøveglass merket med prøvens nummer/navn.
11. Ha på nitrogen over prøven, sett på kork og analyser på HPLC. Prøven oppbevares i fryser.

Appendiks E: Forsøksprosedyre for kalibrering av HPLC

1. Ta ut litt prøve fra den rene standarden i en liten spisskolbe.
2. Damp den inn på rotasjonsfordamperen.
3. Bruk en glasspipette for å overføre prøven til en målekolbe med et bestemt volum ved å bruke et bestemt løsemiddel for å få med restene.
4. Fyll opp med det bestemte løsemiddelet til streken.
5. Analyser prøven på UV/VIS-spektrofotometeret.
6. Hvis prøven er for sterk, overfør noe av prøven til en ny målekolbe med et bestemt volum og fyll opp med det bestemte løsemiddelet opp til streken.
7. Analyser prøven på nytt på UV/VIS-spektrofotometeret.
8. Hvis prøven enda er for sterk gjenta pkt. 6 og 7 til den er passelig.
9. Noter med Abs. maks og bølgelengde for den.
10. Overfør prøven til en ny spisskolbe, og damp den inn på rotasjonsfordamperen.
11. Overfør prøven til en 5 ml målekolbe ved hjelp av aceton som løsemiddel. Fyll opp til streken med aceton.
12. Overfør noe av denne prøven til et HPLC-prøveglass.
13. Analyser prøven på HPLC med kolonnen du skal bruke. Bruk 4 forskjellige injeksjonsvolum. For eksempel 5, 10, 25 og 50 μL .

Appendiks F: Eksempel på beregning av mg karotenoid fra UV/VIS-spektrofotometer

Abs_{maks} for ekinenon: 1,202

Bølgelengde Abs_{maks}: 467,00 nm

A= 2090 for ekinenon i benzen

Det ble brukt en 10 ml målekolbe

$$\begin{aligned} \text{ant. mg} &= \frac{10 \cdot \text{volum}(ml) \cdot \text{Abs}_{\text{maks}}}{A} \\ &= \frac{10 \cdot 10 \text{ ml} \cdot 1,202}{2090} = 0,0575 \text{ mg} \end{aligned}$$

→ Etter UV/VIS-spektrofotometeret ble prøven dampet inn på rotasjonsfordamperen for å få bort benzenen. Prøven ble deretter overført til en 5 ml målekolbe, og aceton ble brukt som løsemiddel.

5 ml aceton :

$$\frac{0,0575 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} = 0,01150 \text{ mg/ml}$$

For å lage en standardkurve for ekinenon på HPLCen ble det sprøytet inn 4 forskjellige volum inn på HPLCen som ble analysert.

$$\begin{aligned} 5 \mu\text{L} &\rightarrow 0,01150 \text{ mg/ml} \cdot 0,005 \text{ ml} = 0,0000575 \text{ mg} = 0,0575 \mu\text{g} \\ 10 \mu\text{L} &\rightarrow 0,01150 \text{ mg/ml} \cdot 0,010 \text{ ml} = 0,000115 \text{ mg} = 0,115 \mu\text{g} \\ 25 \mu\text{L} &\rightarrow 0,01150 \text{ mg/ml} \cdot 0,025 \text{ ml} = 0,0002875 \text{ mg} = 0,2875 \mu\text{g} \\ 50 \mu\text{L} &\rightarrow 0,01150 \text{ mg/ml} \cdot 0,050 \text{ ml} = 0,000575 \text{ mg} = 0,575 \mu\text{g} \end{aligned}$$