



Greining metoxýleruðum alkyl glýseríðum úr hákarlalýsi með vökvaskilju og massagreini

Sérverkefni í efnagreiningum

Frímann Haukur Ómarsson

Leiðbeinendur:

Dr. Sigurður V. Smáason dósent
Dr. Guðmundur Gunnar Haraldsson prófessor

Verkfræði- og náttúrvísindasvið
Raunvísindadeild
Júní 2009

Yfirlýsing

Hér með lýsi ég því yfir að ritgerð þessi er samin af mér og að hún hefur hvorki að hluta né í heild verið lögð fram áður til hærri prófgráðu.

Frímann Haukur Ómarsson

Útdráttur

Metoxýleruð alkyl glýseríð (MAG) hafa sýnt bakteríudrepandi virkni. Blanda af nokkrum slíkum efnum var einangruð úr hákarlalýsi. Markmið verkefnisins var að ákvarða innbyrðis hlutföll þessara efna í blöndunni. Vökvaskilju/massagreinir Efnagreiningarseturs Háskóla Íslands var notaður til verksins. Aðferð var þróuð á háþrýstivökvaskilju til að ná fram ásættanlegri aðgreiningu á efnunum í blöndunni og hlutföllin ákvörðuð með massagreininum.

Tvær blöndur voru skoðaðar, 8 mánaða og 5 ára gamlar. Munurinn á rófum þessara tveggja blanda var mjög mikill. Eftirsóttasta MAG, sem hefur DHA sem alkylhóp, var í mestum mæli í nýju blöndunni en sást ekkert í þeiri gömlu. Einnig sást að vægi hennar fór hratt minnkandi við geymslu í leysi.

Niðurstöðurnar voru að lokum bornar saman við aðra greiningu á sambærilegum efnum sem framkvæmd var í Japan á áttunda áratug síðustu aldar.

Abstract

Methoxylated alkyl glyceroles (MAG) have shown antibiotic activity. A mixture of few MAG's was extracted from shark liver oil. The purpose of the project was to determine the internal ratio of those materials in the mixture. The experiment was done with a liquid chromatography/mass spectrometer at the center of analytical chemistry at the University of Iceland. A high-pressure liquid chromatography method was developed to get acceptable discrimination of the materials in the mixture and the internal ratio determined with the mass spectrometer.

Two mixtures, 8 months and 5 years, old were examined. The difference in the spectras for the two mixtures was great. The most desirable MAG, which has DHA as an alkyl group, had the greatest ratio of all in the new mixture but it was not observable at all in the old one. Furthermore, the ratio of E decreased fast when the mixture was dissolved in solvent and kept for few hours.

The results were compared to another analysis of corresponding mixture that was examined in Japan in the 1990s.

Efnisyfirlit

1	Inngangur	2
2	Fraði	3
2.1	HPLC	3
2.1.1	Aðskilnaður toppa	3
2.1.2	Afkastageta súlu.....	4
2.2	Massagreinar	5
2.3	Jónunaraðferðir	5
2.3.1	Rafúðajónun (Electrospray Ionization).....	6
2.3.2	Efnajónun við umhverfisþrýsting (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).6	6
2.4	Aðskilnaður mismunandi massa.....	7
2.4.1	Flugtímassagreinir (TOF mass analyzer)	7
2.4.2	Fjórpólsmassagreinir (Quadrupole mass analyzer).....	8
3	Tæki og tól	9
3.1	HPLC	9
3.2	Massagreinir	9
4	Sýnameðhöndlun og vinna	10
5	Niðurstöður.....	11
6	Umræða	14
6.1	Mismunandi myndir efna.....	14
6.2	Samanburður á nýja og gamla sýninu	15
6.3	Staðfestingar á eftum	16
6.4	Niðurbrot efna með tíma	17
6.5	Innbyrðis hlutföll efnanna.....	18
7	Lokaorð	20
	Heimildaskrá	22
	Viðauki 1.....	25
	Viðauki 2.....	27

1 Inngangur

Vökvaskilju/massagreing (HPLC/MS) er mjög öflug aðferð til að greina efni í efnablöndum. Hún byggir á því að aðskilja efnin í efnablöndunni með vökvaskiljunni áður en mólmassi þeirra er svo mældur með massagreininum. Með nútímatækni er þetta orðin mjög mikilvæg greiningaraðferð. Markmiðið með þessu sérverkefni var þríþætt. Í fyrsta lagi að aðskilja nokkra mismunandi metoxýleraðra alkyl glýseríða (MAG) úr blöndu unna úr hákarlalýsi af þeim Carlos Davíð Magnússyni og Birni Kristinssyni úr rannsóknarhópi Guðmundar G. Haraldssonar við Háskóla Íslands, í öðru lagi að ákvarða innbyrðis hlutföll efnanna í blöndunni og í þriðja lagi að staðfesta að um rétt efni hafi verið að ræða. Mælingar voru framkvæmdar á micrOTOF-Q massagreini Efnagreiningarseturs HÍ frá Bruker Daltonics.

Ekki fundust heimildir um að HPLC/MS mælingar hafi verið gerðar á sambærilegum blöndum áður og var því rennt nokkuð blint í sjóinn með leysasamsetningar. Heimildir fundust þó um HPLC greiningar á keimlíkum eftum, þríglýseríðum, og voru greinar um það skoðaðar og þeir leysar sem þar voru notaðir voru prófaðir.^{1,2} Leysarnir voru acetonítril, metanól, vatn og isoprópanól.

Mestur hluti vinnunnar fór í að prófa mismunandi leysasamsetningar og ákvarða hvaða leysasamsetning hentaði best fyrir verkefnið.

Efnin sem verið var að leita að hér hafa áður³ verið einangruð úr lýsi nokkurra tegunda af hákörlum og rottufiskum auk þess sem hlutföll þeirra voru ákvörðuð með GC/MS. Sú vinna var unnin á upphafsárum 9. áratugs síðustu aldar í Japan en ekki hafa fundist aðrar sambærilegar mælingar annars staðar. Niðurstöður mælinganna hér eru bornar saman við japönsku mælingarnar.

MAG hafa einnig fundist í mjög litlum mæli í öðrum sjávardýrum og nokkrum spendýrum, þ.a.m. mönnum.⁴ Svipuð efni (án metoxýhópsins) hafa sýnt ónæmisstyrkjandi áhrif hjá krabbameinssjúklingum, krabbameinshemjandi áhrif auk þess að auka flæði krabbameins- og fúkalyfja í gegnum blóðheilahemilinn.⁵ Það getur því verið mikill ávinningur af því að ná að einangra þessi efni. Forsenda þess að hægt verði að nota þessi efni í framtíðinni er sú að hægt sé að einangra þau í nógu miklum mæli án of mikils tilkostnaðar. Er markmiðið með þessu verkefni að athuga hvort það hafi tekist hjá rannsóknarhópi Guðmundar G. Haraldssonar.

2 Fræði

Í þessum kafla er fjallað fræðilega um tækjabúnaðinn sem notaður var við mælingarnar og virkni búnaðarins skýrð. Fjallað verður um háþrýstivökvaskilju aðskilnaðaraðferðina (HPLC), jónunaraðferðir sem kallast rafúðajónun (ESI) og efnajónun við umhverfisþrýsting (APCI) og að síðustu um flugtíma (TOF) og fjórpóls massagreina.

2.1 HPLC

Háþrýstivökvaskilja (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) er ein mest notaða og öflugasta skiljuaðferðin í nútíma efnagreiningum.⁶ HPLC byggist á súlu með föstum stöðufasa (e. stationary phase) og í gegnum hana rennur fljótandi ferðafasi (e. mobile phase). Við enda súlunnar er svo nemi sem nemur hvenær efnin koma út af súlunni.

Nú á dögum eru flestar súlur s.k. pakkaðar súlur, þær eru þéttpakkaðar af smákornóttum stöðufasa, algengt þvermál á ögnum í stöðufastanum er 3-10 μm .⁷ Tvær gerðir eru til af súlum, normal phase súlur og reverse phase súlur. Í normal phase súlum er stöðufasinn skautaður og ferðafasinn minna skautaður, en í reverse phase súlum er þessu öfugt farið þ.e. stöðufasinn er óskautaður en ferðafasinn skautaðri.⁸ Í gegnum súluna rennur svo ferðafasinn sem er einhver leysir eða leysablanda. Ef fleiri en einn leysir er notaður eru þeir oft upphaflega blandaðir í ákveðnum hlutföllum sem breytast svo þegar líður á keyrsluna, þ.e. fyrirfram ákveðinn stigull (e. gradient) er í blöndunni. Stigull ferðafasans er stilltur af þannig að efnin fari hægt í gegnum súluna til að byrja með en fari svo hraðar eftir því sem á líður og komi að lokum eitt og eitt vel aðgreind af súlunni. Mörg atriði hafa áhrif á það hvernig efni aðgreinast á súlunni þ.e. hvernig þau leysast í leysinum samanborið við það hvernig þau bindast við stöðufasa súlunnar. Veigamesti þátturinn í aðgreiningunni er skautun efnanna sem aðgreina á samanborið við skautun ferða- og stöðufasans.

2.1.1 Aðskilnaður toppa

Aðskilnað efna má skoða með rásstuðli (e. retention factor) þeirra, k' , sem er skilgreindur sem:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Þar sem t_R er tíminn sem það tekur efnið að fara í gegnum súluna og er kallaður rástími efnisins. t_0 er tíminn sem tekur óhindraðan ferðafasa að fara í gegnum súluna

og er þá notað efni sem kemst svo til óhindrað í gegnum súluna og mælt hvenær það kemur út af henni. Aðskilnaður verður þegar efni hafa mismunandi rásstuðul. Æskilegt er að k' sé á bilinu 1-10.⁹ Ástæðan fyrir því er sú að ef rásstuðullinn er of lítt eru litlar líkur á því að efni aðskiljist frá öðrum svipuðum efnum en ef hann er of stór er hugsanlegt að efnið tapist á leiðinni eða dreifi of mikið úr sér á súlunni.

Greiningarhæfni (e. resolution) súlu er notuð til að skoða aðgreiningu tveggja toppa, þ.e. hversu langt er á milli miðju toppanna m.v. breidd þeirra. Greiningarhæfnin er skilgreind sem:

$$R_s = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{W_1 + W_2} \quad (3)$$

Þar sem W_1 er breidd topps 1 og svo framvegis. $R_s = 1,5$ þýðir að topparnir eru fullkomlega aðskildir, þ.e. skörun þeirra er undir 0,3%. Við $R_s = 1$ er skörunin um 4% og telst það fullnægjandi.¹⁰ Fyrir $R_s < 1$ er skörunin of mikil til að hægt sé að fullyrða að um two toppa sé að ræða. Í reikningum á R_s skiptir ekki máli hvaða einingar eru notaðar á t_R og W á meðan sömu einingar eru notaðar fyrir báðar stærðir.

Þar sem HPLC/MS er tvívíð greining, þ.e. fyrst eru efnin aðskilin með HPLC og massi þeirra svo greindur með massagreininum, þurfa efnin ekki að aðskiljast fullkomlega á súlunni. Hins vegar þurfa mismunandi massaísómerur að skiljast alveg á súlunni þar sem massagreinirinn gerir ekki greinarmun á mili þeirra.

2.1.2 Afkastageta súlu

Þegar efni ferðast í gegnum súlu dreifast þau óhjákvæmilega í súlunni vegna osmósudreifingar, sem veldur breikkun topps efnisins. Dreifni efnis verður meiri eftir því sem það er lengur á súlunni. Því er mikilvægt að halda keyrslutímanum sem stystum, en þó verður að passa að hann sé nógu langur til að viðunandi aðskilnaður fáist. Dreifni efnisins verður minni eftir því sem afkastageta súlunnar er meiri. Við notum þrepafjölda til að mæla afkastagetuna, en þrepafjöldinn er skilgreindur sem:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4)$$

eða:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (5)$$

Þar sem $W_{1/2}$ er breidd toppsins í hálfri hámarkshæð. Þessar jöfnur gera ráð fyrir Gauss-dreifingu á toppnum, þar sem 68% efnisins kemur á bilinu $[t_R - \sigma, t_R + \sigma]$ þ.s. σ er staðalfrávikið á lengdinni sem efnið hefur ferðast í súlunni.¹¹

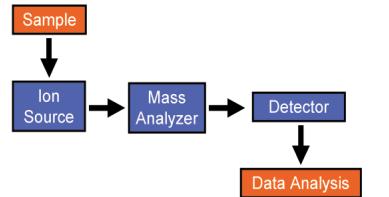
Til að afkastageta súlunnar sé sem best þarf að vera lítið datt pláss (dead volume) í henni. Datt pláss er það svæði innan súlunnar þar sem ferðafasinn nær ekki að halda jöfnu flæði. Það er yfirleitt vegna stöðnunar (e. stagnation) sem þýðir að ferðafasinn nær ekki að flæða í gegnum ákveðinn hluta súlunnar.¹² Vegna þess tefst ákveðinn hluti efnanna á súlunni sem veldur breikkun toppsins fyrir efnið og minnkar því afkastagetuna.

2.2 Massagreinar

Margar mismunandi tegundir nema eru til fyrir HPLC, s.s. UV mælir, fljúrljómunarmælir, ljósgleypnimælir og massagreinir sem var notaður hér og verða honum gerð betri skil hér á eftir.

Massagreinir er tæki sem mælir mólmassa efna á hleðslueiningu, m/z hlutfall efna. Efnin eru mæld í gasfasa eftir að búið er að jóna þau. Aðgreining efna í massagreinum byggir alltaf á aðskilnaði jóna í raf- eða segulsviði og því er ómögulegt að mæla agnir sem hafa enga hleðslu.

Massagreinar byggjast í grófum dráttum á 5 mismunandi hlutum sem sjást á mynd 1. Byrjað er á að koma efninu í gasfasa og það síðan jónað. Nokkrar mismunandi aðferðir eru til þess en þær sem notaðar voru hér eru ESI og APCI. Svo þarf að aðgreina jónirnar eftir massa sem hér var gert með flugtímassagreini (e. Time-of-Flight Mass Analyzer eða TOF). Að lokum þarf svo að vinna úr merkinu sem fæst frá nemanum við enda flugtímassagreinisins.



Mynd 1. Hlutar massagreinis.

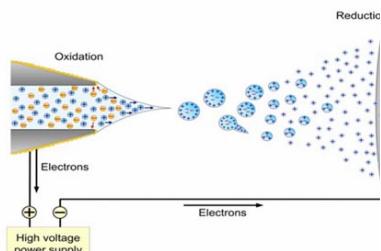
Úttakið frá massagreininum er svokallað massaróf, sem sýnir toppa með mismunandi m/z hlutfal. Hæð toppanna (e. intensity) sýnir hversu mikil mældist af hverju efni og er það notað hér til að magngreina efnin í blöndunni.

2.3 Jónunaraðferðir

Tvær jónunaraðferðir voru reyndar. Annars vegar ESI og hins vegar APCI. Ástæðan fyrir því að þessar tvær jónunaraðferðir eru notaðar í HPLC/MS er sú að þær byrja á því að koma vökvunum sem kemur úr HPLC yfir í gasfasa sem er nauðsynlegt vegna þess að massagreinar vinna með efni í gasfasa.

2.3.1 Rafúðajónun (Electrospray Ionization)

Rafúði er aðferð til að aðskilja efnið sem við viljum mæla og leysinn sem það er leyst í. Leystu efninu er sprautað inn í ESI-hausinn þar sem það fer inn í stutta hárpípu úr ryðfríu stáli. Við endann á hárpípnum er mikil rafspenna yfirleitt upp á 3-5 kV.¹³ Þegar lausnir fer í gegnum rafspennuna jónast leysta efnið (hleðsla jónarinnar, plús eða mínu, ræðst af formerki rafspennunar) og meirihluti leysisins gufar upp og það myndast smáir dropar af leysta efninu í leysisgufu.¹⁴ Næst fara droparnir í gufunarklefa (e. evaporation chamber) þar sem hitað þurrkloft blæs



Mynd 2. Uppgufun leysis í ESI.

í gegn og leysirinn gufar enn meira af þannig að droparnir verða enn smærri, sjá mynd 2. Að lokum eru droparnir orðnir svo smáir að þeir ná s.k. Rayleigh-marki sínu, en þá eru fráhrindikrafter jónanna orðnir meiri en yfirborðsspenna dropans, sem veldur því að dropinn sundrast í einstakar jónir.¹⁵ Jónirnar sem komast í massagreininn hafa yfirleitt ekki næga orku til að mynda mikið niðurbrot og því sést mólikúljónin yfirleitt mest. Algengast er að sjá $(M+X)^+$ þ.s. X er H, Na eða K.

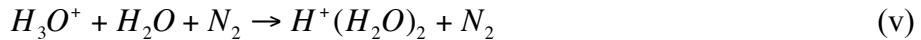
2.3.2 Efnajónun við umhverfisþrýsting (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

APCI kom fyrst til sögunnar á 8. áratug síðustu aldar.¹⁶ Síðan þá hefur orðið umtalsverð þróun á tækninni og er þetta nú ein mest notaða jónunaraðferðin á lífrænum efnum. Aðferðin byggist á því að úðagas (e. nebulizer gas), hér N₂, er jónað í ljósboga (e. corona) sem veldur¹⁷ því svo að röð hvarfa fer af stað. Ljósboginn byggir á því að mikil rafspenna, 2,5-5 kV, er leidd á nálarelektróðu þar til straumur upp á 3-5 μA fæst.¹⁸ Þessi straumur kemur svo jónuninni af stað, í mjög litlum mæli þó. Hvörfin sem eiga sér þá stað eru¹⁹:



Í leysunum sem notaðir voru hér var alltaf eitthvað af vatni og því myndast vatnsgufur sem valda eftirfarandi hvörfum²⁰:





Álagning vatns heldur svo áfram eins og í hvarfi (vi) sem veldur því að stórir vatnsklasar, $H^+(H_2O)_n$, myndast. Hvörf (iv) – (vi) valda því að algengast er að sjá $(M+H)^+$ eftir jónun með APCI²¹. Svipuð hvörf eiga sér stað fyrir aðra prótíska leysa. Þegar notaðir eru leysar á borð við acetónítríl er algengt að sjá $(M+NH_4)^+$.

APCI telst²² vera væg jónunaraðferð en hún er þó umtalsvert harðari en ESI jónun. Vegna þess hve væg jónunin er sést sjaldan mikið niðurbrot eftir APCI jónun.

2.4 Aðskilnaður mismunandi massa

Áður en byrjað er á umfjöllun um aðskilnað mismunandi massa er gott að vara við því að á íslensku er ekki gerður greinarmunur á mass spectrometer (MS), sem er allt tækið, og mass analyzer (MA), sem er sá hluti tækisins sem aðskilur og greinir m/z hlutföllin. Bæði kallast massagreinir.

Tvær tegundir massagreina (MA) eru í microTOF-Q og verða þeim gerð skil hér á eftir.

2.4.1 Flugtímassagreinir (TOF mass analyzer)

Flugtímassagreinir byggir á því að öllum jónunum er hraðað með sömu hreyfiorku í rafsviði V:

$$zV = \frac{mv^2}{2} \quad (6)$$

Þar sem z er hleðsla jónarinnar, m er massi jónarinnar og v er hraði hennar. Ef við setjum v=L/t, þar sem L er lengd flugleiðarinnar og t er flugtíminn, fæst:

$$zV = \frac{mL^2}{2t^2} \quad (7)$$

Sem má svo umrita sem:

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{L^2} \quad (8)$$

Þar sem V og L eru fastar er hægt að reikna m/z hlutfall hverrar jónar út frá flugtíma hennar.

Jónirnar þurfa að fara inn í flugklefann í púlsum svo þær hefji allar ferðina á sama tíma og hægt sé að greina á milli þeirra. Mjög góð nýtni fæst í TOF

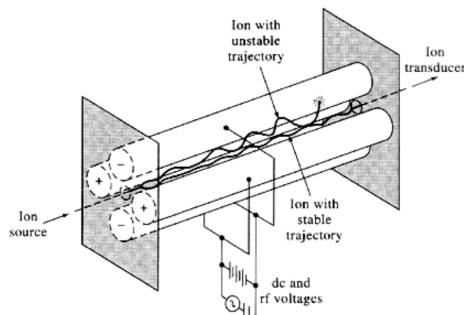
massagreinum þar sem fræðilega er hver einasta jón í hverjum púlsi mæld.²³ Annar kostur við þá er sá að lítil takmörk eru á massabilinu sem hægt er að mæla.

Mjög næma nema þarf á TOF massagreina þar sem flugtíminn er oft á bilinu $1\text{-}50\mu\text{s}$ ²⁴ en m/z á micrOTOF-Q tæki er mælt með fjórum aukastöfum. Neminn á tækinu er svokallaður örrásaplötu nemi (e. microchannel plate detector). Örrásaplöturnar virka sem rafeindamargfaldarar sem magna upp merkið og breyta því í rafstaum.²⁵ Það gerist þannig að þegar jónin sem mæla á rekst á nemann losna rafeindir sem skella svo á öðrum vegg rafeindamargfaldarans sem gefur þá frá sér fleiri rafeindir. Þetta gerist nokkrum sinnum þar til komið er að enda nemans. Þar er rafstaumurinn svo numinn af anóðu sem gefur frá sér úttakið, þ.e. hversu langur flugtíminn var.²⁶

2.4.2 Fjórpólsmassagreinir (Quadrupole mass analyzer)

Þegar MS/MS róf er tekið á micrOTOF-Q er fjórpóls massagreinir notaður sem massasíða áður en jónirnar koma inn í TOF massagreininn. Fjórpóls massagreinar byggast á 4 sívalningum sem eru tengdir við jafnstraum og bylgugjafa sem gefur frá sér útvarpsbylgjur.²⁷ Hlutfallið á milli jafnstraumsins og útvarpsbylggnanna ræður því svo hvaða jónir komast í gegn og hverjar ekki. Þær jónir sem hafa rétt m/z hlutfall lenda í jafnri sveiflu í rafsviðinu og komast í gegn. Þær sem hafa ekki rétt m/z hlutfall lenda hinsvegar í ójafnri sveiflu sem endar á því að þær rekast í veggi massagreinsins, sjá mynd 3.²⁸ Þetta hentar vel þegar um síu á massa er að ræða og er þá einungis einu ákveðnu massagildi hleypt í gegn. Þegar fjórpólsmassagreinir er notaður til að fá massaróf er skannað yfir það massabil sem rannsaka á.

Í micrOTOF-Q er fjórpóls massagreininum beitt á two vegu. Annars vegar í MS mode til að takmarka á breiðu bili þær jónir sem komast að TOF massagreininum og hins vegar í MSMS mode til að einangra einungis eitt m/z gildi sem kemst í TOF massagreininn.



Mynd 3. Fjórpólsmassagreinir, ferlar jóna sem lenda í jafnri og ójafnri sveiflu eru sýndir.

3 Tæki og tól

3.1 HPLC

Súlan sem notast var við var 150mm löng reverse phase C18 Gemini-NX súla með 3µm kornastærð og 2mm innri vídd. Flæðihraðinn var 1.8ml/mín og hitanum á súlunni var haldið föstum við 30°C. Þeir ferðafasar sem prófaðir voru samanstóðu af vatni, acetonítríli, isoprópanóli og metanóli. Skautunareiginleikar leysanna skipta miklu máli fyrir aðskilnaðinn og má sjá upplýsingar um þá í töflu 1. Skautunareiginleikar eru oft gefnir upp í tveimur mismunandi stærðum⁹, annars vegar skautunarstuðli (polarity index) P' sem er ákvarðaður út frá mælingum á leysinum í þremur mismunandi leysum (dioxan, nítrómetan og etanol) og hins vegar með leysnistuðli (e. solubility parameter) δ sem er skilgreindur sem:

$$\delta = \left(\frac{\Delta E}{V} \right)^{1/2} \quad (9)$$

Þar sem ΔE er innri orka gufunar efnisins og V er mólarúummál efnisins. Einingin á leysnistuðlinum er Pa^{1/2} en skautunarstuðullinn er einingarlaus stærð. Hafa skal í huga að fyrir báða stuðlana gildir að því hærri sem stuðullinn er því meiri er skautunin.

Tafla 1. Skautunarstuðlar og leysnistuðlar leysanna sem notaðir voru.²⁹

	δ [10 ⁻³ · Pa ^{1/2}]	P'
Isoprópanól (IPR)	18,0	3,9
Acetonítril (ACN)	23,9	5,8
Metanol (MeOH)	29,4	5,1
Vatn	47,8	10,2

Eins og sést í töflunni ber skautunar- og leysnistuðlum ekki alltaf saman um hvort eitt efni sé skautaðra en annað, því acetonítril hefur lægri skautunarstuðul en metanol en hærri leysnistuðul. Mælingar hafa leitt í ljós að metanol er skautaðra.³⁰ Af þessu sést að þessa stuðla er aðeins hægt að nota til viðmiðunar.

3.2 Massagreinir

Tækið sem notast var við er af gerðinni micrOTOF-Q frá Bruker Daltonics. Samkvæmt upplýsingum frá framleiðanda á hann að geta mælt massa á bilinu 20-4000m/z með nákvæmni upp á 3 ppm.³¹ Tvær jónunaraðferðir voru prófaðar eins og

áður sagði, APCI og ESI. APCI var fyrirfram talið heppilegra vegna þess að fyrri mælingar á keimlíkum efnum á Efnagreiningarsetrinu hafa gefið betri raun með þeirri aðferð. Í ljós kom hins vegar að ESI jónunin gekk betur og er það líklega vegna þess að þar myndaðist $(M+Na)^+$ jón í öllum tilfellum sem er stöðugri en $(M+H)^+$ jónin sem myndast í APCI. Það er líklega vegna þess að Na-jónin er óhvarfgjarnari. MSMS róf voru hins vegar tekin á APCI þar sem mælingar á ESI gáfu mjög takmarkaðar niðurstöður og er líklegt að Na^+ hafi dottið af og eftir hafi staðið óhlaðið M sem mælist ekki í massagreininum.

Flestar mælingarnar voru gerðar með tune wide stillingu, sem þýðir að jónir með m/z undir 300 Da eru ekki mældar. Þar sem efnin sem leitað var að höfðu öll massa yfir 300 Da var þetta talið í lagi. E.t.v. hefði verið betra að nota tune low stillingu sem mælir massa fyrir neðan 300 Da til að hægt væri að sjá niðurbrot, en reynslan er sú að yfirleitt gengur verr að staðla tækið með þeirri stillingu.

Helstu tækjastillingar fyrir ESI og APCI má sjá í töflum 2 og 3.

Tafla 2: Stillingar fyrir ESI.

Spenna	4500V
Prýstingur úðagass	0,4 Bar
Flæði þurrklofts	40 l/mín
Hiti þurrklofts	190°C

Tafla 3: Stillingar fyrir APCI.

Spenna	2500V
Straumur ljósboga	4000 nA
Prýstingur úðagass	1,6 Bar
Flæði þurrklofts	0,8 l/mín
Hiti þurrklofts	200°C
Hiti úðagass	400°C
Árekstraorka í MSMS	30 eV

4 Sýnameðhöndlun og vinna

Blandan úr hákarlalýsinu var unnin af þeim Birni Kristinssyni og Carlos Davíð Magnússyni og verður ekki farið nánar út í vinnslu blöndunnar hér. Fyrir mælingu voru örfá mg af sýninu sett í glas og leyst í klóróformi. Notast var við sjálfvirkan sýnahaldara á HPLC stæðunni og leysasamsetningar forritaðar í tölvu massagreinisins. Byrjað var á því að besta stigul leysanna, næst voru tekin accurate mass róf með innri staðli og að lokum voru keyrðar MSMS keyrslur til frekari

staðfestingar á að um rétt efni hafi verið að ræða. Innri staðallinn sem notast var við er sérstök mæliblenda (e. tunemix) frá Bruker sem er blanda efna með vel skilgreindan og stöðugan massa. Þessi blanda er mæld og massarnir sem fást eru bornir saman við rétta massa og rófið staðlað út frá frávikingu frá réttu mössunum. Staðalfrávik massanna í mæliblöndunni má ekki fara yfir 1 ppm til að stöðlunin teljist vel heppnuð. Þegar verið er að greina innbyrðis hlutföll MAG í blöndunni þarf að gera ráð fyrir því að þau jónist öll að sama marki þar sem eina heimildin um magn þeirra er flatarmálið undir toppi þeirra í massarófinu.



Efni	Formúla	M [Da]
A: 2-Metoxy-C16:0	C ₂₀ H ₄₂ O ₄	346
B: 2-Metoxy-C16:1	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	344
C: 2-Metoxy-C18:0	C ₂₂ H ₄₆ O ₄	374
D: 2-Metoxy-C18:1	C ₂₂ H ₄₄ O ₄	372
E: 2-Metoxy-C22:6	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	418
F: 2-Metoxy-C18:3	C ₂₂ H ₄₀ O ₄	368

Mynd 4. Efni A og B eru sýnd á myndum. Í töflunni má sjá nöfn og efnaformúlur þeirra og hinna efnanna.

Smávægilegir tölvuútreikningar voru framkvæmdir í Spartan 2007 til að reyna að finna út hvernig jónunin yrði á efnunum og var hugmyndin sú að finna út hvort nálgunin ætti rétt á sér. Reyndir voru semi empirical reikningar og léttvægir Hartree Fock reikningar. Var þetta hluti af verkefni höfundar í námskeiðinu „Útreikningar á eiginleikum efna og hraða efnabreytinga“ sem hann sótti jafnhliða vinnu við þetta sérverkefni og var undir handleiðslu prófessors Hannesar Jónssonar. Litlar niðurstöður fengust úr þessum reikningum vegna þess hve stór efnin sem um ræðir eru sem olli því að reikningarnir urðu þungir í vöfum og verða niðurstöðurnar ekki ræddar frekar hér, en skýrslu sem skilað var í námskeiðinu má sjá í viðauka 2.

5 Niðurstöður

Fyrsta verkefnið var að finna út aðstæður (leysastigul, stillingar á tæki, tíma á keyrslum o.fl.) sem hentuðu fyrir verkefnið og fór mestur hluti vinnunnar í það. Eftir að greinar sem fjölluðu um HPLC keyrslur á keimlíkum efnum höfðu verið skoðaðar var ákveðið að byrja á stiglum sem byggðu á vatni og isoprópanóli (IPR).³² Þeir

stiglar gáfu alls ekki góða raun þar sem öll efnin komu á svotil sama tíma út af súlunni. Eitt dæmi um þessar keyrslur má sjá í viðauka 1.

Ákveðið var að fara í aðeins skautaðri leysablöndu svo stiglar sem byggðust á vatni og acetonítríli (ACN) voru reyndir. 9 mismunandi stiglar þessara leysa voru reyndir en niðurstöðurnar urðu aldrei fullnægjandi. Dæmi um keyrslu má sjá í viðauka 1. Aldrei náðist nógu góð aðgreining á efnunum þar sem toppar félru saman. Topparnir eru heldur ekki normaldreiðir, þeir eru aflíðandi til að byrja með og enda svo brattir.

Því næst var ákveðið að fara í enn skautaðri leysa og voru þá reyndar keyrslur með metanolí og vatni. Bæði voru reyndar keyrslur bara með vatni og metanolí og eins með vatns/ACN blöndu á móti metanolí (MeOH). Vatns og MeOH stiglar gáfu mun betri raun og var því farið í það að reyna að bæta þær keyrslur. Ásættanleg aðgreining á skikkanlegum tíma fékkst svo með eftirfarandi keyrslu:

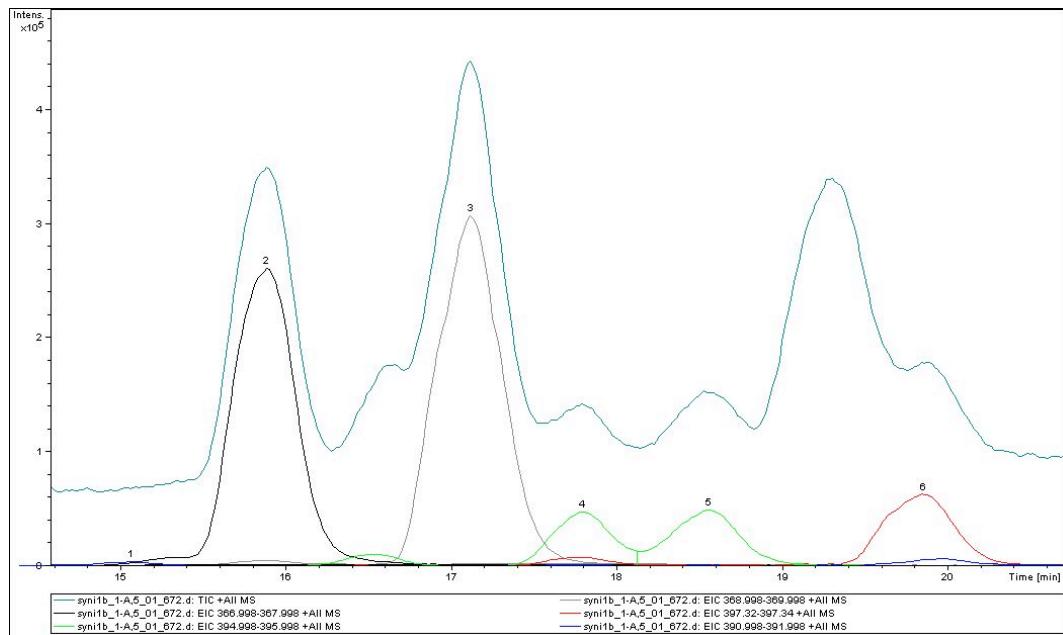
$50\%H_2O/50\%MeOH \rightarrow (5\text{min}) 15\%H_2O/85\%MeOH \rightarrow (20\text{min}) 100\%MeOH$.

Þessi keyrsla gaf alla toppana sem fundust nægjanlega vel aðgreinda til að hægt væri að nota hana.

Ákveðið var að prófa ESI jónunaraðferðina til að athuga hvort hún gæfi betri raun en APCI jónunin. Svo reyndist vera, en sjá má ESI

Tafla 4. Litir efna í rófum.

Efni	Litur
A	Grár
B	Svartur
C	Rauður
D	Grænn
E	Gulur
F	Blár



Mynd 5. EIC og TIC fyrir ESI keyrslu.

keyrsluna á mynd 7 en APCI keyrsluna í viðauka 1. Er það talið vera vegna þess að $(M+Na)^+$ jón myndast í ESI jón. uninni sem virðist vera stöðugri en $(M+H)^+$ jónin sem myndaðist með APCI. Þess vegna verða einstakir massar (extracted ion chromatogram – EIC) stærri hluti af heilarrófinu (Total Ion Chromatogram - TIC) með ESI mælingunni.

Tafla 5. R_s gildi samliggjandi toppa.

Toppar	Númer toppa	R_s gildi
F og B	1 og 2	0,47
B og A	2 og 4	0,65
A og D ₁	4 og 5	0,58
D ₁ og D ₂	5 og 6	0,76
D ₂ og C	6 og 8	0,26

og þannig fundið út flatarmál topps hvers efnis sem gefur okkur mat á styrkleika þess í sýninu. Til að finna hlutföll efnis er flatarmáli viðkomandi topps deilt í heildarflatarmál allra toppanna sem skoðaðir eru.

Þegar ákveðið hafði verið að aðgreiningin væri ásættanleg var farið í að taka accurate mass róf. Tekin voru accurate mass róf bæði á APCI og ESI. Þau gáfu til kynna að um rétt efni hafi verið að ræða. Niðurstöður má sjá í töflu 6.

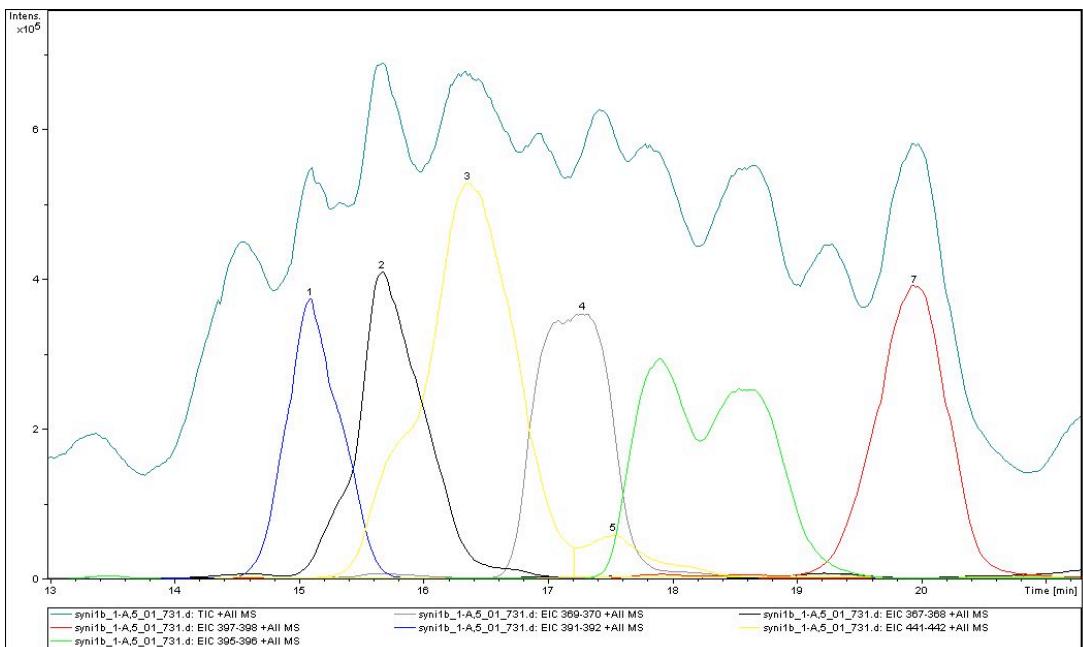
Til frekari staðfestingar á að um rétt efni væri að ræða voru tekin MSMS róf af hverjum massa fyrir sig. Rófin tókust misvel, þau einu sem nógú vel komu út voru af eftum A og B. MSMS rófin voru tekin á APCI, en mjög lítið kom út þegar reynt var að taka þau á ESI líklega vegna þess að Na^+ losnaði af og eftir sat M óhlaðið, sem mælist ekki í TOF massagreini.

Eftir að öll rófin höfðu verið tekin var ákveðið að prófa að mæla mun nýrri sýni sem Carlos Davíð Magnússon vann í september 2008, en gömlu sýnin voru einangruð af Birni Kristinssyni árið 2005 og voru því orðin um 4 ára gömul þegar mælingarnar voru framkvæmdar. Munurinn á nýju blöndunni og þeirri gömlu var mjög mikill. Helsti munurinn er sá að í nýju blöndunni sást mjög mikið af E og F sem

Þó að aðskilnaðurinn sé ekki fullnægjandi skv. þeim skilyrðum sem voru rædd í umfjöllun um HPLC, eins og sést í töflu 5 þá er hægt að nota þessa aðgreiningu þar sem við getum aðgreint hvern massa fyrir sig með úrvinnsluforritinu í tölvu massagreinisins

Tafla 6. Frávik mældra gilda frá réttum gildum í gömlu blöndunni.

Efni	Frávik á APCI [ppm]	Frávik á ESI [ppm]
A	38,0	15,1
B	17,3	10,7
C	16,6	6,3
D	8,5	6,0
F	7,3	4,8



Mynd 6. TIC og EIC fyrir nýju blönduna.

voru varla sjáanleg í þeirri gömlu. Gamla blandan var í upphafi hreinni en sú nýja (ca. 95% á móti 91%) og því sjáum við mikið meira af öðrum efnunum en þeim sem við höfum áhuga á í þeirri nýju. Við fjöllum því aðeins um innbyrðis hlutföll efnanna, en sleppum því að gera tilraun til að ákvarða heildarhlutfall einstakra efna í blöndunni. Á

Tafla 7. Frávik á nýja sýninu.

Efni	Frávik á ESI [ppm]
A	38,5
B	35,8
C	40,1
D	34,4
E	32,9
F	29,3

mynd 8 má sjá róf HPLC keyrslu fyrir nýju blönduna. Róf annarrar keyrslu má sjá í viðauka 1. Aðskilnaðurinn er mjög svipaður og fyrir gömlu blönduna. Frávikið var að vísu hærra fyrir nýju blönduna á ESI heldur en best náðist með gömlu blönduna eins og sjá má í töflu 7.

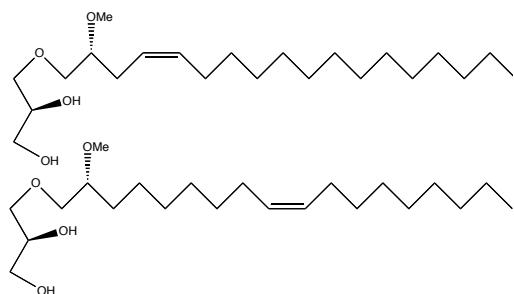
Frávikið er á rúmlega 10ppm bili fyrir öll efnin svo mögulega hefur stöðlun tækisins ekki verið nægjanlega góð sem veldur því að öll gildin

hliðrast aðeins til.

6 Umræða

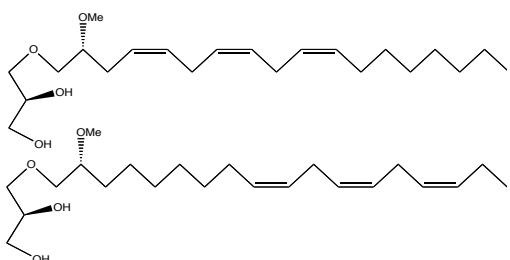
6.1 Mismunandi myndir efna

Vert er að vekja athygli á því að í öllum tilfellum skiptist toppurinn fyrir efni D í tvennt. Er það líklega vegna þess að tvítengið er á tveimur mismunandi



Mynd 7. Staða tvítengjana á efni D

stöðum. Ekki er hægt að segja til um það með fullri vissu út frá massarófi hverjar staðsetningar tvítengjanna eru, en líklegast er talið³³ að um sé ræða þau tvö efni sem sýnd eru á mynd 9. Nákvæmlega sami massi kemur fyrir báða toppana svo munurinn er bara á skautuninni og þ.a.l. á staðsetningu tvítengisins.



Mynd 8. Möguleg staða tvítengja á efni F

Ekki er vitað með fullri vissu hvar tvítengin á F eru, en tveir möguleikar koma til greina sem sjá má á mynd 10. En þar sem aðeins einn toppur kemur fyrir massa F er bara um aðra hvora myndina að ræða. Ekki er hægt að fullyrða um hvor myndin af F er til staðar í sýninu. Út frá NMR-

rófum af blöndunni hefur verið áætlað gróflega að omega-3 efni séu um 10% blöndunnar og verður að teljast líklegt út frá niðurstöðum HPLC/MS mælinga að E sé ábyrgt fyrir því öllu. Líklegra verður því að teljast að um efri myndina sé að ræða, en það bíður frekari staðfestingar.

Á rófi nýja efnisins sést líka að líklegt er að A toppurinn skiptist í tvennt svo það er líka möguleiki á að til séu tvær jafnmassa myndir af A. Þar getur hins vegar ekki verið um mismunandi staðsetningu á tvítengi að ræða svo það hljóta að vera rúmísómerur.

Toppurinn fyrir E er líka með öxl í svo það getur verið að önnur efni séu þar á bakvið sem hafa sama massa. Einungis toppurinn fyrir C er alveg laus við axlir, þar sem hann er vel normaldreifður. Það er því líklegt að skoða þurfi hina toppana betur, en það bíður síðari tíma. Það sem var jákvæðast við vatns/ACN rófið var það að við sáum betri aðgreiningu á toppunum fyrir D þar heldur en á rófunum sem byggðust á vatni og MeOH. Það sýnir að hægt er að ná betri aðgreiningu á þessum toppum en við höfum náð hér.

6.2 Samanburður á nýja og gamla sýninu

Mun fleiri toppar sjást í nýja sýninu en í því gamla. Sérstaklega má vekja athygli á því að efni E og F sjást mjög vel hjá nýja sýninu en E sást ekkert í því gamla og F í mjög litlu magni. Er það sérstaklega ánægjulegt í ljósi þess að E tengist mjög eftirsóknarverðri omega-3 fitusýru. NMR róf af gamla sýninu sýndu greinilega að eitthvað var af omega-3 efnunum í sýninu, en mjög einkennandi toppur sést fyrir omega-

3 efni. Út frá heildun á toppum NMR rófsins var talið að omega-3 keðjurnar væru um 10%. Því er augljóst að þessi efni brotna niður mun fyrr en önnur efni í sýninu.

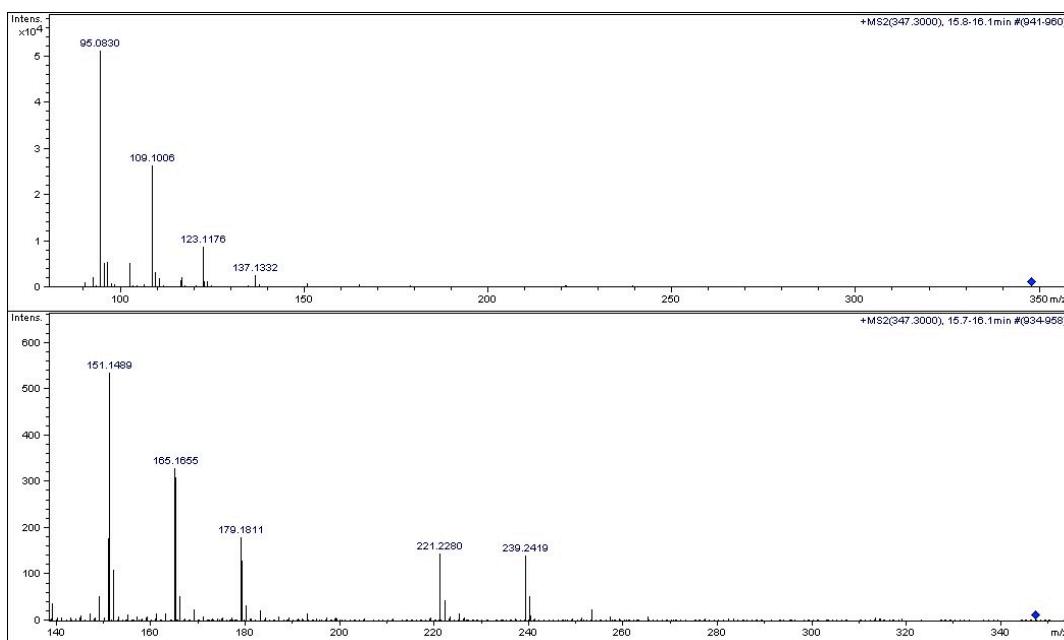
6.3 Staðfestingar á efnum

Ein af spurningum verkefnisins var hvaða efni væru í sýninu. Ákveðnar hugmyndir voru uppi um hvaða efni væri um að ræða en þær þurfti að staðfesta. Þónokkur efni fundust sem ekki hafði verið gert ráð fyrir upphaflega. Það kemur þó lítið á óvart, en staðfest var að 18 fundust í sambærilegum japönskum sýnum á áttunda áratug síðustu aldar sem rætt hefur verið um hér.³⁴ Ekki verður gerð frekari grein fyrir þeim efnum sem ekki var gert ráð fyrir að sinni, þar sem það flækir alla umfjöllun til muna, en efnin eru mun fleiri en í japönsku sýnunum eða a.m.k. 30 talsins. Accurate mass greining á ESI gaf betri raun fyrir gömlu blönduna en þá nýju.

Til að greining á nýsmíðuðum efnum teljist fullnægjandi verður frávikið að vera innan við 5 ppm en hér er það aðeins frjálslegra þar sem um HPLC/MS keyrslu er að ræða. Öll efni sem voru mæld komu innan við 41 ppm frá réttu gildi. ESI mælingarnar á gamla sýninu komu best út þar sem frávikið varð mest um 15 ppm á A en minna fyrir önnur efni.

Það að gerð sé krafa um 5 ppm frávik eða minna sýnir okkur hversu gríðarlega fullkomnir massagreinar eru nú í dag og undirstrika mikilvægi þeirra við greiningar á efnum.

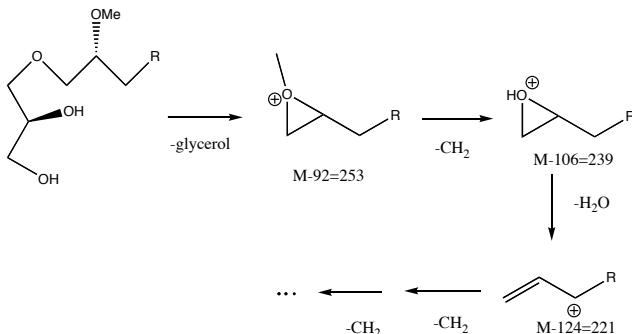
MSMS rófin tókust, eins og áður sagði, misvel. Þau sem best tókust voru af efnum A og B. Renndu þau róf frekari stoðum undir að um rétt efni hafi verið að



Mynd 9. MSMS róf af efni B. Efri myndin er heildarrófið en sú neðri er mynd af hluta sama rófs. Takið estir pínulitlum toppi við $m/z=253$

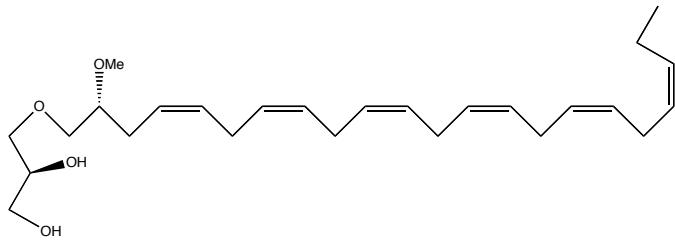
ræða. Á mynd 11 má sjá MSMS róf fyrir efni B. Hvarfgangur niðurbrotsins á B var áætlaður og má sjá hann á mynd 12 og tókst að gera grein fyrir toppum rófsins með nokkuð góðu móti.

Glycerol-hópurinn dettur fyrst af og hvarfast líklega við eithvæð annað eða brotnar meira niður því hann sést ekki. Þegar hann dettur af lokast yfir epoxíð. Því næst losnar metýlhópurinn af epoxíð-súrefnинu en skilur eftir vetni. Svo dettur súrefnið af sem vatn og skilur eftir tvígreinda karbókatjón sem er stöðguð af tvítengi. Því næst detta CH_2 hóparnir af keðjunni, 3 saman fyrst og svo einn í einu. Hvarfgangur niðurbrots A er líklega svipaður og fyrir B, en á rófinu sjást færri toppar sem bendir til þess að ekki ekki séu öll milliefni stöðug.



Mynd 10: Áætlaður hvarfgangur niðurbrots á efni B.

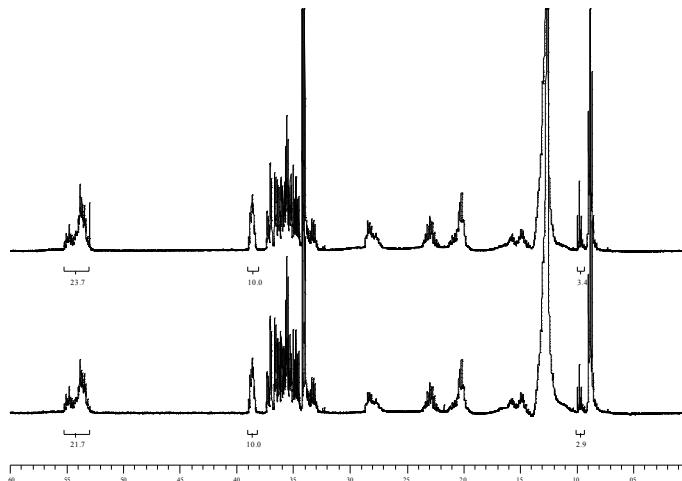
6.4 Niðurbrot efna með tíma



Mynd 11. Efni E.

Við sjáum að hlutföllin breytast töluvert, jafnvel á eins mælingum á sama sýni. Ef við berum saman þær þrjár mælingar sem voru gerðar á nýja sýninu, allar úr sömu þynningu á innan við sólarhring, sést að breytingarnar eru of miklar til að hægt sé að segja til um það innan skyndsamlegra skekkjumarka hver hlutföllin í sýninu eru. Einna áhugaverðust er sú staðreynd að efni E er stærst í þeirri mælingu sem var gerð fyrst, en strax í mælingu sem var gerð örfáum klukkutímum síðar er hlutfall E mun minna. Það rennir enn frekari stoðum undir þá kenningu að E brotni hratt niður og jafnvel enn hraðar en áður hafði verið gert ráð fyrir. Efnið var geymt í klóróformi í kæli við ca. 1-4°C á milli mælinga og dökku glasi svo áhrif ljóss og hita ættu að vera frekar lítil. Ef nýja sýnið hefði fengist fyrr hefði verið mjög áhugavert að athuga hvort um einstakt tilfelli hafi verið að ræða eða þá að sannreyna að niðurbrotið á E og F sé jafn hratt og það virðist vera. Önnur efni virðast vera stöðugri í sýninu.

Áhugavert er að bera saman NMR róf af blöndunni sem voru tekin annars vegar þegar blandan var nýeinangruð og svo þegar hún var búin að standa undir köfnunarefni í frysti í 8 mánuði. Þessi róf má sjá á mynd 13. Þeir toppar sem búið er að heilda eru einkennandi fyrir omega-3 efni (topparnir til hægri og vinstri) og til viðmiðunar er búið að heilda topp fyrir aðrar stöðugri prótónur og gefa honum vægið 10. Omega-3 einkennandi topparnir eru fyrir tvítengisprótunarnar annars vegar og fyrir metýlprótónur á omega-3 enda hins vegar. Við sjáum að vægi omega-3 efnanna hefur minnkað um 9-15% ef þessir toppar eru bornir saman. Hafa verður í huga að talsverð óvissa er í þessum útreikningnum og þá sérstaklega á toppunum sem eru vinstra megin á rófinu þar sem óhreinindi eru sjáanleg á rófinu fyrir nýja efnið sem eru ekki á gamla efninu, en passað var upp á það við heildunina að þau kæmu ekki inn. Hefur það líklega orðið til þess að heildið varð lægra en ella. Því er ekki óvarlegt að áætla að omega-3 efnin brotni niður um 12-15% á 8 mánuðum m.v. að þau séu geymd undir köfnunarefni og í frysti.



Mynd 12. Samanburður á NMR rófum af nýrri blöndu (efra róf) og sömu blöndu 8 mánaða gamalli (neðra róf).

6.5 Innbyrðis hlutföll efnanna

Mikill fjöldi annarra efna með svipaðar efnatímum, $C_xH_yO_4$ fundust í blöndunni. Það yrði of flókið fyrir þetta verkefni að greina öll þau efni nákvæmlega og finna

Tafla 8. Innbyrðis hlutföll í einni mælingu af gömlu blöndunni á ESI og APCI.

	APCI	ESI
Efni	Hlutfall [%]	Hlutfall [%]
A	49,72	42,14
B	22,69	35,59
C	13,56	9,24
D ₁	8,47	5,84
D ₂	5,46	7,00
F	0,11	0,39

hlutföll þeirra í blöndunni. Þau efni sem um hefur verið rætt eru þó í miklum meirihluta í blöndunni skv. rófinu. Hér var látið nægja að reikna innbyrðis hlutföll efnanna en ef ákvarða þyrfti hlutföll efnanna í blöndunni þyrfti að framkvæma mælingar með innri staðli, sem gæti verið eitt efnanna einangrað,

með þekkt rúmmál. Með því móti mætti ákvarða styrk allra efnanna í blöndunni út frá innri staðlinum með einföldum reikningum. Ef unnt væri að smíða öll efnin og ná þeim hreinum væri hægt að nota þau öll til viðmiðunar og fengist þá ennþá nákvæmari mælikvarði á styrk efnanna í blöndunni.

Gamla blandan inniheldur mest af efni A en minnst af efni F. E er hvergi sjáanlegt í gömlu blöndunni. Við sjáum að mælingum á ESI og APCI ber ekki vel saman.

Í nýju blöndunni sést að E er með hæsta hlutfallið innbyrðis af þessum efnum sem er mjög ánægjulegt og gefur góð fyrirheit fyrir framhaldið. Staðalfrávikið er frekar hátt hjá A, B, E og F. Það er líklega vegna þess að E og F brotna niður mun hraðar en hin efnin í blöndunni og því breytast innbyrðishlutföllin.

Áhugavert er að bera þessar niðurstöður saman við einu heimildina sem fannst um að svipuð efni hefðu verið mæld. Þá voru mæld sýni úr 6 tegundum af hákörlum og rottufiskum (e. rat fish), í öllum tilfellum var um kvenkynsdýr að ræða.³⁵ Hákarlategundirnar sem um ræðir hafa latnesku heitin (íslensk heiti sem fundust eru í sviga) Scyliorhinus torazame, Squalus acanthias (háfur) og Dalatias licha

Tafla 10. Niðurstöður³⁶ úr fyrri mælingum á sýnum úr hákörlum og rottufiskum. Allar tölur eru innbyrðis %-hlutfall hvers efnis nema þær í neðstu röðinni sem er heildar %-hlutfall efna A-F úr blöndunni.

Efni	S. torazame	D. licha	S. acanthias	H. novaezealandiae	H. barbouri	R. pacifica
A	25,74	16,26	31,75	19,92	29,40	26,42
B	55,51	48,05	47,36	35,91	41,53	34,34
C	3,16	0,11	1,94	19,78	5,03	3,57
D	6,87	22,07	8,40	15,04	11,26	14,38
E	7,85	10,88	9,58	8,81	11,80	20,07
F	0,87	2,64	0,97	0,54	0,98	1,23
% efna af blöndu	91,7	94,7	92,9	73,8	91,5	89,7

(skarðaháfur) en rottufisktegundirnar eru *Hydralagus novaezealandiae*, *H. barbouri* og *Rhinochimaera pacifica*. Í töflu 10 má sjá helstu niðurstöður úr mælingum á MAG úr þessum dýrum.

Ef við berum saman niðurstöðurnar úr japönsku mælingunum og þeirra sem gerðar voru hér sjáum við að hvergi næst jafn hátt hlutfall af E og hjá okkur, sem er einkar ánægjulegt. F er líka í mun meira mæli hjá okkur en í japönsku mælingunum. Staðalfrávikið á milli þriggja mælinga af nýja sýninu er að vísu frekar hátt hjá bæði E og F, sem er líklega vegna niðurbrots þessara efna. Niðurbrotið dregur meðaltalið niður svo hlutfallið er líklega ennþá hærra í ferskri blöndu. Það hlýtur því að teljast ansi vænlegt að halda áfram að skoða þessa blöndu og reyna að gera vinnsluna á henni skilvirkari, en nú tekur um viku fyrir vanan mann að einangra þessa blöndu úr hákarlaláysi og heimturnar eru mjög lágar.

7 Lokaorð

Segja má að þetta verkefni hafi tekist ágætlega. Þau innbyrðishlutföll sem stefnt var á að ná fengust og fékkst því samanburður við fyrri mælingar á svipuðum efnum. Þó er enn nokkur vinna eftir áður en þessar niðurstöður verða birtingarhæfar í ritryndum tímaritum, en stefnt er að því að birta grein sem inniheldur m.a. niðurstöður á HPLC/MS mælingum þessara efna fljótlega.

Staðfesting efnanna tókst, bæði með accurate mass og MSMS rófum. Líklega má fá betri MSMS róf fyrir önnur efni en A og B og staðfesta þannig byggingu þeirra. Að öllum líkindum ætti að sjást svipað niðurbrot fyrir efni C og D.

Þessu verkefni er að öllum líkindum ekki lokið með þessum niðurstöðum, því reyna á að mæla efnin strax eftir að þau eru unnin úr hákarlalásinu og komast að því hver hlutföllin eru þá, með því að nota þá HPLC/MS aðferð sem þróuð var í þessu verkefni. Aðferðina þarf þó sennilega að betrumbaða eitthvað til að fá betri aðskilnað á öllum toppum því eins og áður var komið að er líklegt að fleiri en eitt efni séu á bakvið flesta toppana en það þarf að staðfesta. Það kemur að vísu ekki á óvart þar sem staðsetningar tvítengjanna geta verið mismunandi og eru efnin þá jafnmassa og svipuð í skautun.

Hugsanlega má ná betri aðskilnaði á einhverjum toppum með að prófa fleiri útgáfur af stiglum sem innihalda ACN þar sem betri aðskilnaður næst á toppunum tveimur fyrir efni D.

Til að fá fullnægjandi greiningu á blöndunni þyrfti að skoða öll þau efni sem sjást á massarófinu og reikna flatarmál undir toppum þeirra. Þar sem fjöldi efnanna er mjög mikill (a.m.k. 30 efni) er slíkt of flókið og viðamikið fyrir þetta verkefni. Það gæti hins vegar verið áhugavert að reyna að finna aðra aðferð til að gera það enda getur heildarmagn einstakra efna á rúmmálseiningu blöndunnar skipt sköpum þegar ákvörðun er tekin um hvort það borgi sig að fara í framleiðslu fyrir almennan markað. Það hefur einnig sýnt sig að kanna má hraða niðurbrots einstakra efna með því að skoða hlutföll þeirra í blöndunni á mismunandi tínum. Seinna á svo jafnvel að reyna að smíða öll efnin og er þá hægt að gera enn nákvæmari mælingar og fá nákvæm hlutföll þeirra efna sem við höfum áhuga á í blöndunni.

Heimildaskrá

- ¹Lísa, M., Holcapek M. et al. „High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection characterization of Δ5-polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils.“ *Journal of Chromatography A.* 2007;1146: 67-77.
- ² Beerman, C., Winterling, N. et al. „Comparison of the Structures of Triacylglycerols from Native and Transgenic-Chain Fatty Acid-Enriched Rape Seed Oil by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Ion-Trap Mass Spectrometry (LC-APCI-ITMS).“ *Lipids.* 2007;42:383-394.
- ³ Hayashi, K og Takagi, T. „Characteristics of Methoxy-Glyceryl Ethers from Some Cartilaginous Fish Liver Lipids.“ *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* 1982;48:1345-1351.
- ⁴ Sjá heimild 3.
- ⁵ Carlos D. Magnússon, Anna Valborg Guðmundsdóttir og Guðmundur G. Haraldsson. „Efnasmíðar á handhverfuhreinum stöðubundnum díasyl afleiðum 1-O-alkyl-sn-glíseróla með ómega-3 fitusýrum.“ *Raust – tímarit um raunvísindi og stærðfræði.* 2007;1:75-78
- ⁶ Holler, Skoog et. al. 2007. *Principles of Instrumental Analysis.* 6. útgáfa. Books/Cole Belmont USA. Bls. 816.
- ⁷ Lindsay, Alan. Endurprentuð 1997. *High Performance Liquid Chromatography.* 2. útgáfa. John Wiley & Sons, West Sussex UK. Bls. 157.
- ⁸ Lindsay, Alan. Endurprentuð 1997. *High Performance Liquid Chromatography.* 2. útgáfa. John Wiley & Sons, West Sussex UK. Bls. 157.
- ⁹ Lindsay, Alan. Endurprentuð 1997. *High Performance Liquid Chromatography.* 2. útgáfa. John Wiley & Sons, West Sussex UK. Bls. 17.
- ¹⁰ Holler, Skoog et. al. 2007. *Principles of Instrumental Analysis.* 6. útgáfa. Books/Cole Belmont USA. Bls. 776.
- Holler, Skoog et. al. 2007. *Principles of Instrumental Analysis.* 6. útgáfa. Books/Cole Belmont USA. Bls. 771.
- ¹² Lindsay, Alan. Endurprentuð 1997. *High Performance Liquid Chromatography.* 2. útgáfa. John Wiley & Sons, West Sussex UK. Bls. 283.
- ¹³ Herbert, C.G., Johnstone, R.A.W.. 2002. *Mass spectrometry basics.* CRC Press, Boca Raton USA. Bls. 161.

-
- ¹⁴ Herbert, C.G., Johnstone, R.A.W.. 2002. *Mass spectrometry basics*. CRC Press, Boca Raton USA. Bls. 161-163
- ¹⁵ Herbert, C.G., Johnstone, R.A.W., 2002. *Mass spectrometry basics*. CRC Press, Boca Raton USA. Bls. 163.
- ¹⁶ Andrade, F.J., Shelley, J.T., et al. „Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source. 1. Ionization of Compounds in the Gas Phase.“ *Analytical Chemistry*. 2008;80:2646-2653.
- ¹⁷ Sjá heimild 14.
- ¹⁸ Sjá heimild 14.
- ¹⁹ Sjá heimild 14.
- ²⁰ Sjá heimild 14.
- ²¹ Sjá heimild 14.
- ²² Ardrey, R. E.. 2003. *Liquid Chromatography-mass spectrometry: an introduction*. John Wiley & Sons, West Sussex UK. Bls. 1349
- ²³ Pavia, Lampman et. al. 2001. *Introduction to Spectroscopy*. 4. útgáfa. Books/Cole, Belmont USA. Bls. 434.
- ²⁴ Holler, Skoog et. al. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. 6. útgáfa. Books/Cole Belmont USA. Bls 569.
- ²⁵ Gaire, B., Syler, A.M., et al. „Determining the absolute efficiency of a delay line microchannel-plate detector using molecular dissociation.“ *The Review of Scientific Instruments*. 2007;78:025032-1 – 025032-5
- ²⁶ Sjá heimild 23.
- ²⁷ Pavia, Lampman et. al. 2001. *Introduction to Spectroscopy*. 4. útgáfa. Books/Cole, Belmont USA. Bls. 430.
- ²⁸ Sjá heimild 25.
- ²⁹ Lindsay, Alan. Endurprentuð 1997. *High Performance Liquid Chromatography*. 2. útgáfa. John Wiley & Sons, West Sussex UK. Bls. 120.
- ³⁰ Sjá heimild 29.
- ³¹ Bruker Daltonics. Febrúar 2005. „The unique new ESI-Qq TOF- get the third dimension.“ Slóðin er: <http://www.bruker.es/productos/masas/pdf/microtof-q%20flyer.pdf> sótt 21.5.2009.
- ³² Sjá heimild 1 og 2.

³³ Carlos D. Magnússon. 2009. Samtal höfundar við Carlos Davíð Magnússon 20. maí.

³⁴ Sjá heimild 3.

³⁵ Sjá heimild 3.

³⁶ Sjá heimild 3.

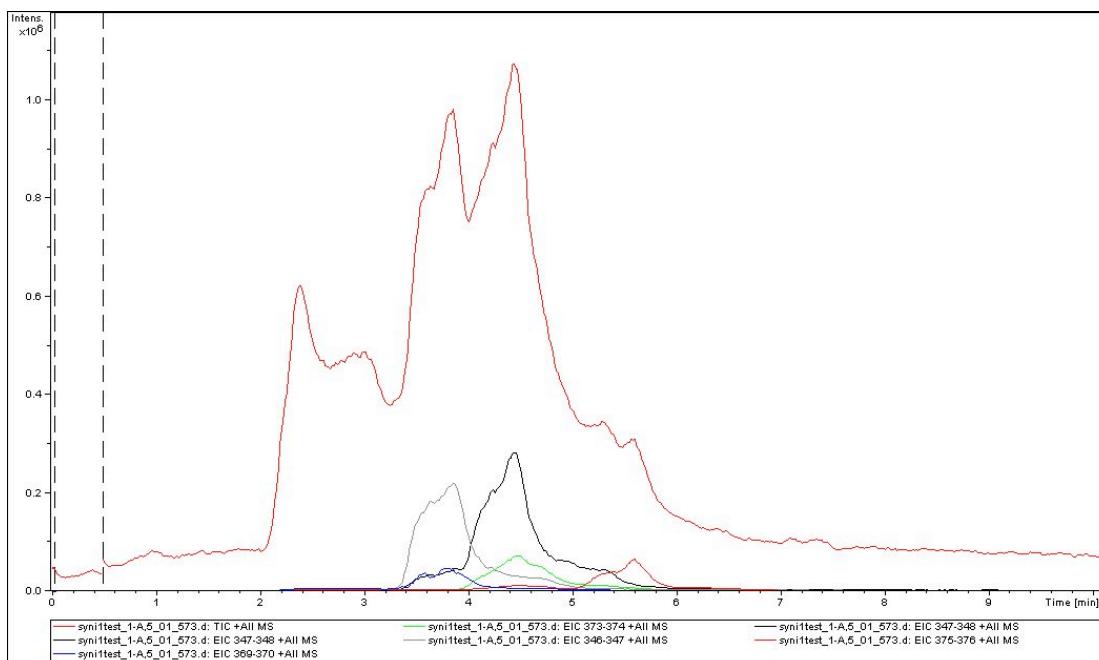
Heimildir fyrir myndum

Mynd 1. Ms block schematic. Sótt 12. maí 2009 af vefsíðunni:
http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry

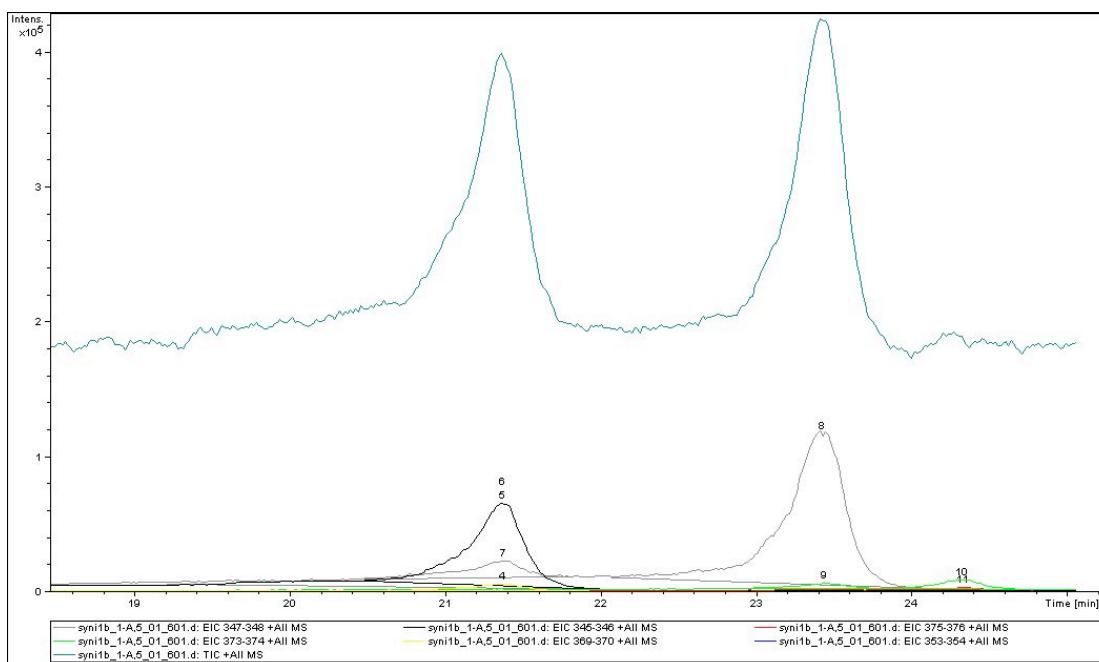
Mynd 2. primer_ms_Id_AP ESI figure. Sótt 12. maí 2009 af vefsíðunni:
http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primer_ms_Id_AP%20ESI%20figure.jpg

Mynd 3. quad_mass_spectrometers. Sótt 23. maí 2009 af vefsíðunni:
<http://www.clu-in.org/char/technologies/quadmass.htm>

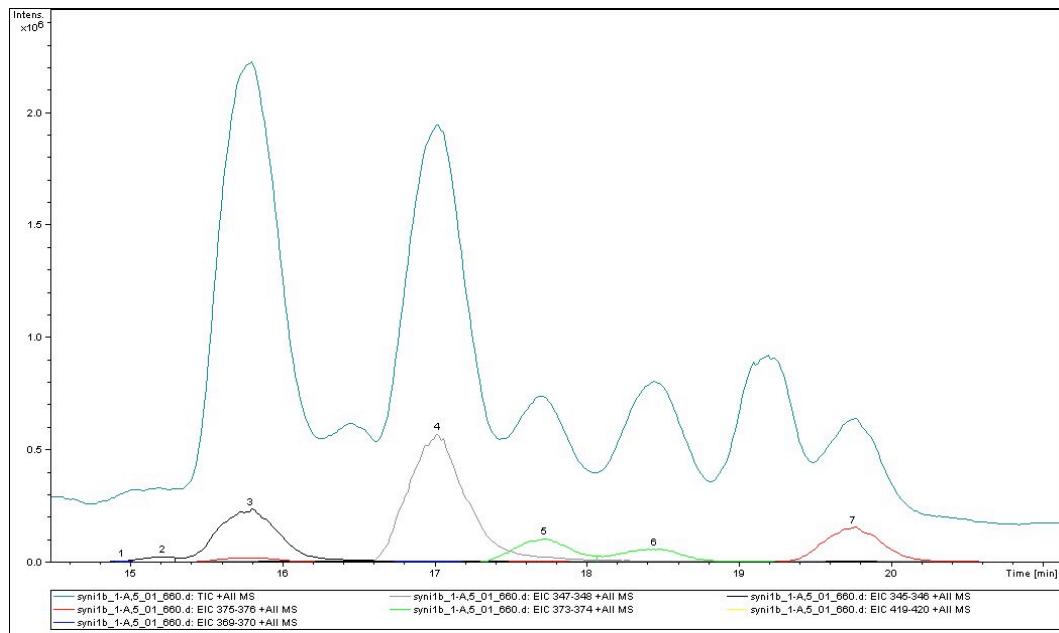
Viðauki 1



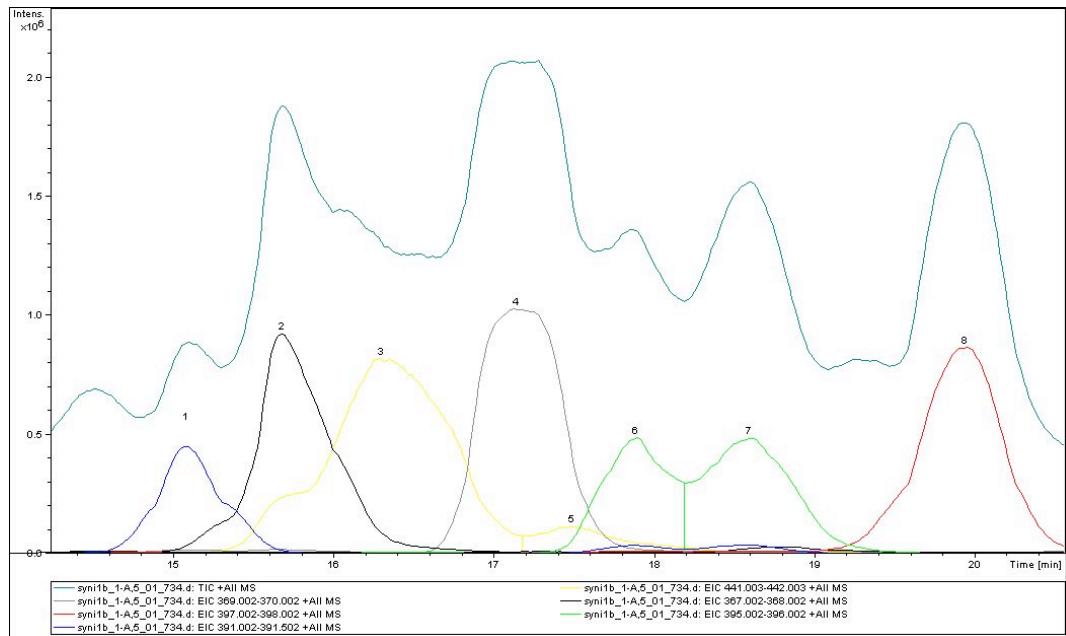
Mynd V1. Keyrsla með stigli vatns og IPR. Athugið að TIC er í vitlausum lit.



Mynd V2. Keyrsla með stigli vatns og ACN.



Mynd V3. Keyrsla með stigli vatns og MeOH á APCI.



Mynd V4. Keyrla á nýja sýninu á ESI. Rófið er tekið um 2 tímum eftir rófið á mynd 6. Takið eftir að toppurinn fyrir E hefur minnkað mikið.

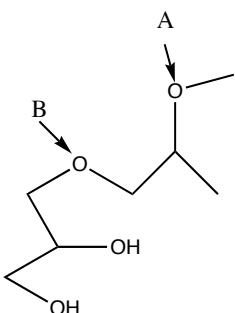
Viðauki 2

Útreikningar tengdir sérverkefni

Sérverkefnið byggist á því að ákvarða innbyrðishlutföll nokkurra metoxy-efna sem öll hafa sameiginlegan hluta sem sést á mynd 1, en mislangar keðjur og fjölda tvítengja út frá sameiginlega hlutanum. Spartan-verkefnið fólst í því að athuga hvar líklegt væri

jónun efnanna færi fram. Massagreinirinn er stilltur til að mæla jákvæðar jónir og yfirleitt sést $(M+H)^+$ toppur. Orka tveggja mögulegra jóna var reiknuð (á stöðum merktum A og B) og orkan borin saman við óhlaðið efnið.

Bæði voru reyndir semi-empirical (SE) reikningar og Hartree-Fock (HF) reikningar.



Mynd 1: Sameiginlegi hlutinn

Tafla 1: Niðurstöður reikninga. Orkan er í Hartree.

Jónir	SE: AM1	SE: RM1	SE: PM3	HF: 3-21G
A	-136,3254	-116,8609	-18,4547	-571,0184131
B	-145,4678	-116,8486	-15,7776	-570,6327983
Óhlaðið	-873,7245	-778,7666	-773,8069	-571,0116033

Frekari reikningar voru ekki reyndir vegna þess hve mikill tími fór í HF reikningana með 3-21G (u.p.b. 30 mínútur hvert efni).

Ómögulegt er að lesa út úr niðurstöðum reikninganna hvor jónin, A eða B, er stöðugri. Mikill munur er á niðurstöðum með mismunandi grunnum. Jón A er orkulægri í þremur grunnum af fjórum og er því líklegt að hún sé stöðugri. Áhugavert gæti verið að prófa að reikna þetta með stærri grunn fyrir HF en sökum þess hve langan tíma það tekur var það látið ógert. Ef þeir reikningar væru gerðir gæti komið betri mynd á hvor jónin er stöðugri og væri því líklegri til að myndast.