



# Einangrun og greining 2-metoxýleraðra alkýlglýseróla í hákarlalýsi

Edda Katrín Rögnvaldsdóttir



Raunvísindadeild  
Háskóli Íslands  
2010

# Einangrun og greining 2-metoxýleraðra alkýlglýseróla í hákarlalýsi

Edda Katrín Rögnvaldsdóttir

16 eininga ritgerð sem er hluti af  
*Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefnafræði

Leiðbeinendur  
Guðmundur G. Haraldsson  
Anna Valborg Guðmundsdóttir

Raunvísindadeild  
Verkfræði- og náttúruvísindasvið  
Háskóli Íslands  
Reykjavík, júní 2010

Einangrun og greining 2-metoxýleraðra alkýlglýseróla í hákarlalýsi  
Isolation and analysis of 2-methoxylated alkylglycerols in shark liver oil  
16 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefnafræði

Höfundarréttur © 2010 Edda Katrín Rögnvaldsdóttir  
Öll réttindi áskilin

Raunvísindadeild  
Verkfræði- og náttúruvísindasvið  
Háskóli Íslands  
VR II, Hjarðarhaga 2-6  
107 Reykjavík

Sími: 525 4700

Skráningarupplýsingar:

Edda Katrín Rögnvaldsdóttir, 2010, *Einangrun og greining 2-metoxýleraðra alkýlglýseróla í hákarlalýsi*, BS ritgerð, Raunvísindadeild, Háskóli Íslands, 28 bls.

Prentun: Háskólafjölritun ehf.  
Reykjavík, júní 2010

# Yfirlýsing höfundar

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

---

Edda Katrín Rögnvaldsdóttir

030387-2449

# Ágrip

Aðalmarkmið verkefnisins var að rannsaka samsetningu metoxýleraðra alkýlglyseróla sem finnast í hákarlalýsi. Einangrun metoxýleruðu alkýlglyserólanna var í þremur megin-skrefum. Fyrsta skrefið fól í sér metanólrof lýsisins sem leiddi til myndunar metýlestera fitusýranna og 1-O-alkýlglyseróla. Í öðru skrefinu var blandan sett á kísilgelssúlu þar sem sýni með metoxýleruðum og venjulegum alkýlglyserólum var safnað saman. Í þriðja skrefinu var sýninu komið fyrir á prep. TLC-plötu þar sem metoxýleruðu alkýlglyserólin voru einangruð. Greining á hreinleika efnisins var gerð með  $^1\text{H-NMR}$ -mælingu en greining á samsetningu metoxýleruðu eterlípiðanna í lýsinu með HPLC-MS-mælingum.

Ennfremur fól verkefnið í sér greiningu á fitusýrusamsetningu hreins hákarlalýsis. Lýsinu var komið fyrir á prep. TLC-plötu og tvö lög aðgreind, annað með tríasýlglyserólum (TAG) og hitt með diasýlglyseróleterum (DAGE). Hvort um sig var sett í  $^1\text{H-NMR}$  greiningu og GLC-greiningu.

## Abstract

The main objective of the project was to investigate the methoxylated alkylglycerol content in shark liver oil. Isolation of the methoxylated alkylglycerols was preformed in three steps. In step one the oil underwent methanolysis to afford fatty acid methyl esters and 1-O-alkylglycerols. In step two a silica gel column chromatography was used to separate the methoxylated and ordinary alkylglycerols and in step three the sample was further purified by prep. TLC-plate. The sample's purity was then analysed by means of  $^1\text{H-NMR}$ -measurement and the composition of the methoxylated alkylglycerols analysed by HPLC-MS-measurements.

A second part of the project was the analysis of the fatty acid composition in the shark liver oil. Triacylglycerol (TAG) and diacylglycerol ethers (DAGE) were seperated from the oil with prep. TLC-plate and analysed by means of  $^1\text{H-NMR}$ -measurement and fatty acid analysis by GLC.

# Efnisyfirlit

Ágrip.....	i
Abstract.....	i
Efnisyfirlit .....	ii
Myndaskrá .....	iii
Töfluskrá.....	iv
Þakkir.....	v
<b>1 Inngangur .....</b>	<b>1</b>
1.1 Almennt um hákarlalýsi .....	1
1.2 Tríasýlglyseról .....	1
1.3 Metýlesterar .....	2
1.4 Alkýlglyseról .....	2
1.5 Metoxýleruð alkýlglyseról.....	3
1.6 Kólesteról.....	4
1.7 Skvalen .....	4
<b>2 Verkefnið .....</b>	<b>6</b>
<b>3 Niðurstöður og umræður .....</b>	<b>8</b>
3.1 Almennt .....	8
3.2 Metanólfrof hákarlalýsis .....	8
3.3 Aðskilnaður metoxýleraðra alkýlglyseróla.....	8
3.4 Hreinsun metoxýleraðra alkýlglyseróla.....	9
3.5 Fitusýrusamsetning hákarlalýsis .....	11
<b>4 Tilraunahluti .....</b>	<b>14</b>
4.1 Almennt .....	14
4.2 Metanólfrof hákarlalýsis .....	14
4.3 Aðskilnaður metoxýleraðra alkýlglyseróla.....	15
4.4 Hreinsun metoxýleraðra alkýlglyseróla.....	16
4.5 Fitusýrusamsetning hákarlalýsis .....	16
<b>5 Lokaorð.....</b>	<b>18</b>
<b>Heimildir .....</b>	<b>19</b>
<b>Viðauki .....</b>	<b>21</b>

# Myndaskrá

<i>Mynd 1: A. Almenn bygging tríasýlglyseróla. B. Þrjár mismunandi mettaðar fitusýrur á tríasýlglyseróli .....</i>	<i>1</i>
<i>Mynd 2: Metanólrof hákarlalýsis .....</i>	<i>2</i>
<i>Mynd 3: Bygging 1-O-alkýl-2,3-díasýl-sn-glyseróls .....</i>	<i>3</i>
<i>Mynd 4: Byggingar: A. Kímýl- (C16:0), B. Batýl- (C18:0) og C. Selakýlalkóhóla (C18:1). .....</i>	<i>3</i>
<i>Mynd 5: Bygging metoxýleraðra alkýlglyseróla .....</i>	<i>4</i>
<i>Mynd 6: Bygging kólesteróls.....</i>	<i>1</i>
<i>Mynd 7: Bygging skvalens.....</i>	<i>5</i>
<i>Mynd 8: Hvarfgangur fyrir metanólrof.....</i>	<i>6</i>
<i>Mynd 9: Samanburður á innbyrðis hlutfalli metoxýleraðra alkýlglyseróla.....</i>	<i>10</i>
<i>Mynd 10: Bygging kólesteróls.með <sup>1</sup>H-NMR-toppum .....</i>	<i>1</i>

# Töfluskrá

<i>Tafla 1: HPLC-greining á metoxýleruðum alkýlglyserólum.....</i>	9
<i>Tafla 2: Samanburður á reiknuðum og mældum mössum úr HRMS-mælingu metoxýleraðra alkýlglyseróla .....</i>	10
<i>Tafla 3: Samaburður á mettunarstigum milli metoxýleraðra alkýlglyseróla.....</i>	11
<i>Tafla 4: Samanburður á fitusýrusamsetningu díasýlglyseróletera (DAGE) og tríasýl-glyseróla (TAG) .....</i>	12
<i>Tafla 5: Samanburður á mettunarstigum fitusýra hjá díasýlglyseróleterum (DAGE) og tríasýlglyserólum (TAG) .....</i>	12
<i>Tafla 6: Aðskilnaður EKRI-1 á kísilgelsaðskilnaðarsúlu .....</i>	15



## **Þakkir**

Ég þakka Guðmundi Gunnari Haraldssyni fyrir að hafa veitt mér tækifæri til að vinna að verkefninu og fyrir leiðsögn hans í því. Einnig þakka ég Carlosi Davíð Magnússyni og Önnu Valborgu Guðmundsdóttur fyrir leiðsögn við vinnslu verkefnisins og fyrir að hafa verið mér innan handar á rannsóknarstofunni. Ennfremur þakka ég Sigríði Jónsdóttur fyrir umfangsmiklar NMR-mælingar, Birni Kristinssyni fyrir fitusýrugreiningar og Aðalheiði Dóru Albertsdóttur fyrir massagreiningar. Að lokum þakka ég Margréti Unni Rögnvaldsdóttur fyrir aðstoð við frágang ritgerðarinnar.

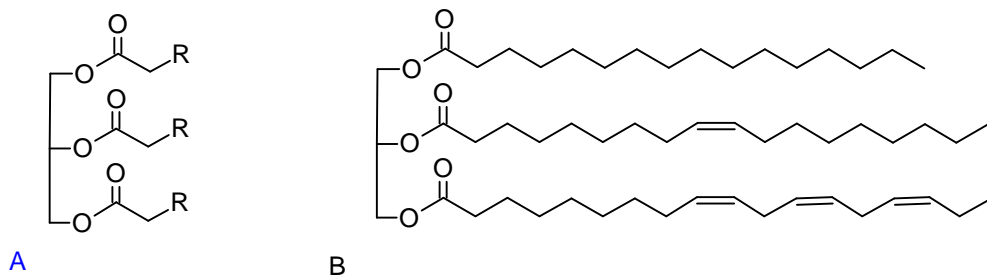
# 1 Inngangur

## 1.1 Almennt um hákarlalýsi

Í lifur hákarla er að finna mikið af lípíðum með lágan eðlismassa, einkum skvalen og díasýlglyseróletera (DAGE). Nokkur munur er á samsetningu lýsis milli tegunda og einnig getur samsetning þess verið breytileg innan sömu tegundar, eftir stærð og þroskunarstigi dýrsins.<sup>1</sup> Hákarlalýsið sem notað var í verkefninu var tilbúið til manneldis. Lýsið var fengið úr nokkrum tegundum hákarla og hafði samsetningu þess verið breytt á þann hátt að nánast allt skvalen hafði verið fjarlægt. Hér á eftir verður helstu efnunum lýsisins lýst stuttlega.

## 1.2 Tríasýlglyseról

Fitur dýra og olíur plantna eru myndaðar með tríasýlglyserólum og eru náskyldar. Tríasýlglyseról samanstendur af glyseróli og þremur fitusýrum sem tengjast glyserólinu með estertengjum. Helsti munurinn á fitum dýra og olíum plantna er samsetning fitusýra, en kolefniskeðjur þeirra geta verið mislangar og mettunarstig mismunandi,<sup>2</sup> samanber mynd 1. Kolefniskeðjurnar innihalda yfirleitt jafna tölu kolefna, sem stafar af myndun þeirra úr asetýl CoA. Við nýmyndun fitu breytir líkami dýra umfram orkuforða, sem er gjarnan í formi kolvetna, í fitu í gegnum lífefnafræðileg ferli. Fitun er svo geymd í fituvef dýra þar til þau þurfa á orkunni að halda.<sup>3</sup>



Mynd 1: A. Almenn bygging tríasýlglyseróla. Glyseróllhluti sameindarinnar er vinstra megin en á honum eru þrjár fitusýrur, sem tengjast honum með esterböndum. B. Þrjár mismunandi mettaðar fitusýrur á tríasýlglyseróli. Efst er palmitíksýra (C16:0), næst oleíksýra (C18:1) og neðst alfa-linoleníksýra (C18:3).

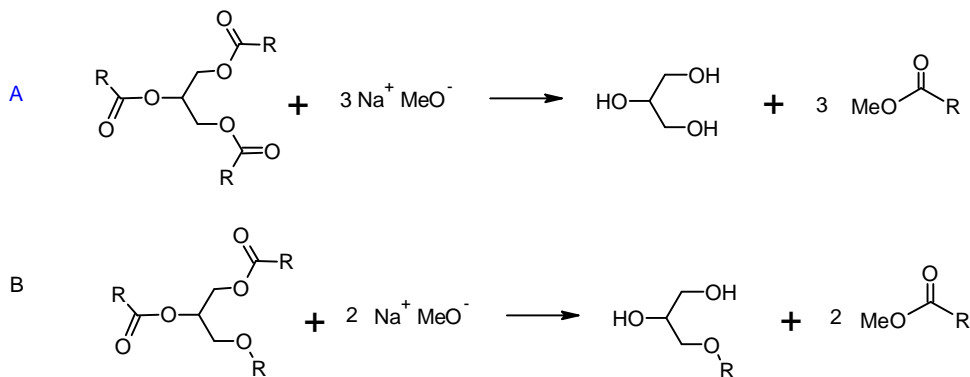
Yfirleitt eru á milli 12 og 20 kolefni í fitusýrukeðjum, algengustu lengdirnar eru þó með 16 og 18 kolefnum. Eins og áður hefur komið fram er mettunarstig fitusýra mismunandi eftir fjölda tvítengja, en þær geta verið mettaðar, einómattaðar eða fjölolmettaðar. Til hægðarauka er ritháttur fyrir lengd keðja gjarnan stytur þannig að hann sýni fjölda kolefna og fjölda ómettaðra atóma. Sem dæmi má nefna C16:0 og C16:1, og er í fyrra tilvikinu átt við keðju sem er með 16 kolefnum og mettuð, en í hinu seinna er átt við einómattaða 16 kolefna keðju. Olíur plantna hafa lægra bræðslumark en fitur dýra þar sem þær innihalda herra hlutfall ómettaðra fitusýra. Bræðslumarksmuninn má skýra með kristalpökkun fitusýranna. Mettaðir fitusýruhalar eiga auðveldara með að leggjast saman í þetta pökkun en

ómettaðir halar. Aukinn fjöldi tvítengja torveldar þetta þökkun, þar eð tvítengin valda skekkjum og beygjum í fitusýruhölunum.<sup>2</sup>

## 1.3 Metýlesterar

Tríasýlglyseról myndar, ásamt öðrum efnum, sápanlegan hluta lýsisins. Estertenging fitusýranna við glyserólið gerir það að verkum að unnt er að nota basa til að vatnsrjúfa lýsið og mynda sápu. Fitusýrurnar geta síðan myndað fitudropa, eða mísellur, í vatninu. Tríasýlglyseról má einnig metanólrjúfa með aðstoð hvata.<sup>2</sup>

Við metanólrof hákarlálýsis myndast umtalsvert magn af metýlesterum. Við rofið er mynduð metoxíðanjón með natríummálm og metanóli og verkar hún sem kjarnsækir í hvarfinu. Metoxíðanjónin klýfur fitusýrur, þ.e. estera, af glyseróhluta fitunnar og myndar með því glyseról og metýlestera. Við ferlið myndast einnig alkýlglyseról, en metoxíðanjónin hefur engin áhrif á etertengið á milli alkýlkeðjunnar og glyseróhlutans.

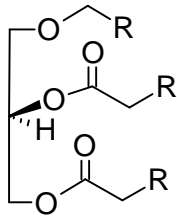


Mynd 2: Metanólrof hákarlálýsis. A. Hvatað metanólrof tríasýlglyseróls gefur af sér glyseríð og þrjú metýlestera. B. Hvatað metanólrof 1-O-alkýls-2,3-díasýlglyseróls gefur af sér alkýlglyseról og tvo metýlestera.

Metýlesterar eru gjarnan notaðir til fitusýrugreininga með svokölluðum GLC-mælingum. Mælingarnar greina samsetningu fitusýranna í olíum og fitum. Metanólrof er þá notað til að ná efnunum á form stakra fitusýra og eru þær síðan greindar með gasskilju eða sambærilegri tækni. Greining á metýlesterum fitusýra (FAME) er töluvert notuð við tegundagreiningu á örverum, en munur er á fitusýrusamsetningu í frumuhimnum þeirra.<sup>4</sup>

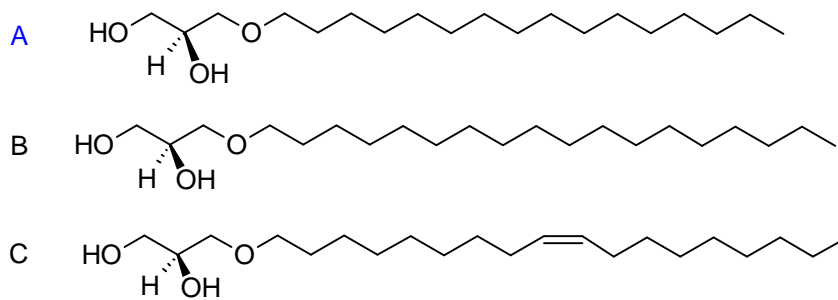
## 1.4 Alkýlglyseról

Hákarlálýsi hefur verið notað í yfir 50 ár, bæði gegn kvillum og sem fyrirbyggjandi meðferð gegn sjúkdómum.<sup>5</sup> Óskautuð eterlípið af gerð 1-O-alkýl-2,3-díasýl-*sn*-glyseróla koma fyrir í umtalsverðu magni í lýsi ýmissa tegunda brjóskfiska, t.d. hákarla og háfa, og má einangra þessi verðmætu efni úr ósápanlega hluta lýsisins. Hlutfall þeirra í lýsinu nemur oft tugum prósentu.<sup>6,7</sup>



Mynd 3: Bygging 1-O-alkýl-2,3-díasýl-*sn*-glýseróls.

Alkýlglýseról hafa reynst vera virk á ýmsum sviðum og verið talin heillavænleg heilsu manna. Alkýlglýseról virðast örva ónæmiskerfið og hafa til að mynda verið notuð gegn hvítblæði og til þess að hjálpa krabbameinssjúklingum að jafna sig eftir geislameðferð. Einnig eru vísbendingar um að þau hafi áhrif á stjórnun frumvaxtar og gætu því komið að gagni við að hemja æxlisvöxt.<sup>4</sup>



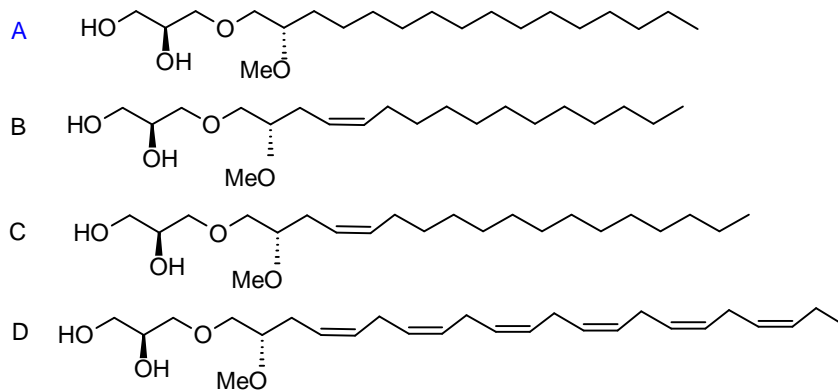
Mynd 4: Byggingar: A. Kímýl- (C16:0), B. Batýl- (C18:0) og C. Selakýlalkóhóla (C18:1).

Í hákarla- og háfalýsi eru algengustu alkýlglýserólin gerð úr kímýl (C16:0), batýl (C18:0) og selakýl alkóhólum (C18:1), sjá mynd 4. Efnin hafa *S*-skipan á hendna kolefninu eins og nafnið, 1-O-alkýl-2,3-díasýl-*sn*-glýseról, gefur til kynna.<sup>7</sup>

## 1.5 Metoxýleruð alkýlglýseról

Metoxýleruð eterlípið hafa verið þekkt í nærri hálföld<sup>8</sup> og hafa umtalsverðar rannsóknir verið gerðar á þessum áhugaverða en fágæta hópi lípíða. Bygging þeirra einkennist af metoxýlhóp á alkýlkeðju eterlípiðanna og má skipta þeim upp í fjóra flokka: 2-metoxýl-alkýlglýseról, -metoxýlfítusýrur, miðlungslangar metoxýlfítusýrur og -metoxýlfítusýrur.<sup>9</sup>

Árið 1967 voru metoxýleruð alkýlglýseról af gerðinni (2'R)-1-O-(2'-metoxýalkýl)-*sn*-glýseról fyrst uppgötvuð og einangruð úr ósápanlegum hluta lýsis Grænlandshákarlsins, af Hallgren og Stállberg. Metoxýlsetnu alkýlglýserólin voru um 4% af glýseróleterum lýsisins og í ljós kom að algengust þeirra voru 1-O-(2-metoxýhexadekýl)-glýseról, 1-O-(2-metoxý-4-hexadekenýl)-glýseról, og 1-O-(2-metoxý-4-oktadekenýl)-glýseról.<sup>8</sup> Nokkru síðar fundu Hallgren og samstarfsmenn hans fjölmættað metoxýlsetið alkýlglýseról í hákarlalýsinu, sem hafði byggingu dókósahexaenóíksýru (DHA).<sup>10</sup>



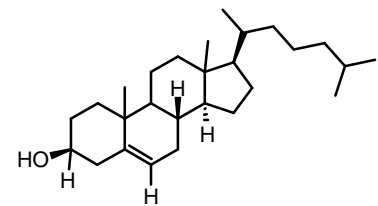
Mynd 5: Bygging metoxýleraðra alkýlglýseróla. A. 1-O-(2-metoxýhexadekýl)-glýseról (C16:0), B. 1-O-(2-metoxý-4-hexadekenýl)-glýseról (C16:1), C. 1-O-(2-metoxý-4-okta-dekenýl)-glýseról (C18:1) og D. Dókósaheksenóksýru-bygging (allt-cis-1-O-(2-metoxý-4,7,10,13,16,19-dókósaheksenýl)-glýseról).

Þau metoxýleruðu alkýlglýseról sem fyrirfinnst í náttúrunni hafa 1-O-alkýl-*sn*-glýseról-byggingu, það er 2*S*-skipan. Hendna kolefnið, sem metoxýlhópurinn situr á, hefur R-skipan í alkýlkeðjunni.<sup>11</sup> Í náttúrunni finnast efnin bæði meðal óhlaðinna lípíða og fosfólípíða. Þau finnast hjá brjóskfiskum og öðrum sjávardýrum, sem og hjá spendýrum. Til að mynda er þau að finna í rauðum beinmerg manna, rauðum blóðfrumum og blóðvökva mannsins, sem og í mjólk manna, kindu og kúu.<sup>12</sup> Metoxýlsetna fitusýrukeðjan í alkýlglýserólunum getur verið mislönng og innihaldið 14 til 22 kolefni. Eins og fyrr kom fram finnst þó mest af 2-metoxýsetnum hexadekýl-, hexadekenýl- og oktadekenýlalkýlglýserólum, þ.e. C16:0, C16:1, og C18:1.<sup>9</sup>

Rannsóknir á metoxýleruðum alkýlglýserólum hafa sýnt fram á fjölbreytilega líffræðilega virkni þeirra. Meðal áhugaverðustu eiginleika efnanna eru örvun ónæmiskerfisins, mótefnavirkni gegn bakteríum og sveppum, auk æxlisbælingar.<sup>13, 14</sup>

## 1.6 Kólesteról

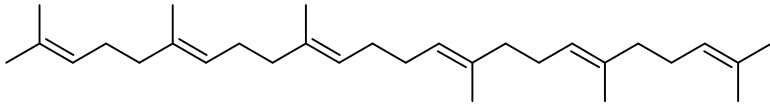
Kólesteról er vaxkennt steraefni sem finnst í frumuhimnum manna og dýra og er flutt um líkama þeirra með blóðvökva. Kólesteról er mikilvægt efni í mannlíkamanum. Það hefur áhrif á hleypni efna í gegnum frumuhimnur og er einnig mikilvægt forefni fyrir ýmis fituleysanleg vítamin og önnur steraefni.<sup>15</sup>



Mynd 6: Bygging kólesteróls.

## 1.7 Skvalen

Skvalen er lífrænt efni sem má finna víða í náttúrunni og kemur við sögu í ýmsum efnaferlum í mannlíkamanum, meðal annars sem forefni fyrir stera.<sup>16</sup> Skvalen er eðlisléttara en vatn og finnst í ríkum mæli í lifur brjóskfiska, svo sem hákarla. Brjóskfiska skortir sundmaga og vega þeir upp á móti því með því að létta sig með fitum og olíum.<sup>1</sup>



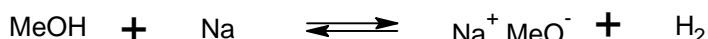
Mynd 7: Bygging skvalens.

Skvalen er vinsælt efni í snyrtivörur þar sem það er náttúrulega rakagefandi. Það hefur einnig verið notað sem fylliefni í bóluefni og lyf, en talið er að það ýti undir virkni lyfja með því að virkja ónæmiskerfið.<sup>17, 18</sup>

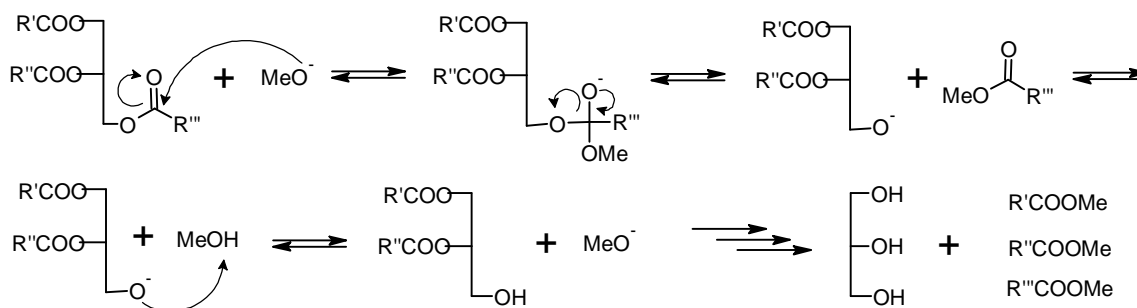
## 2 Verkefnið

Markmið verkefnisins var annars vegar að greina samsetningu og magn metoxýleraðra alkýlglyseróla í hákarlalýsi og hins vegar að greina almenna fitusýrusamsetningu þess. Fyrri hluti verkefnisins hófst með metanólrofi hákarlalýsis, sem leiddi til myndunar blöndu af glyserólum, metýlesterum og 1-O-alkýlglyserólum, sjá mynd 8. Við rofið klauf metoxíðanjónin estertengin í sundur og myndaði glyseról og fitusýrur, en hafði hins vegar engin áhrif á etertengi alkýlglyserólanna.

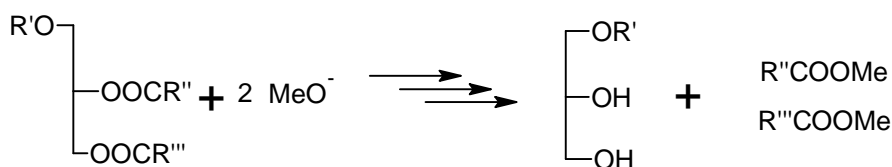
A. Forspil metanólrofs:



B. Metanólrof tríasýlglyseróla:



C. Metanólrof 1-O-alkýl-2,3-díasýlglyseróla:



Mynd 8: Hvarfgangur fyrir metanólrof. A. Forspil metanólrofs, myndun metoxíðanjónar. B. Metanólrof tríasýlglyseróla gefur glyseról og þrjá metýlestera. C. Metanólrof 1-O-alkýl-2,3-díasýlglyseróla gefur 1-O-alkýlglyseról og tvo metýlestera.

Þessu næst var skiljun (*e.* chromatography) notuð til þess að einangra metoxýleruð alkýlglyseról frá öðrum efnum í blöndunni. Einangrun efnisins hófst með notkun kísilgelsaðskilnaðarsúlu, þar sem stöðufasi úr kísilgeli var notaður til að aðskilja efni út frá skautun þeirra. Nokkrar misskautaðar leysablöndur voru notaðar sem ferðafasar í súlunni, til að sjá um að losun efna af henni. Kísilgelsaðskilnaðarsúlan var *normal phase*-súla sem þýddi að óskautuð efni skiluðu sér fyrir út af henni en skautuð. Súlan skildi að metýlestera,

kólesterólblöndu, venjuleg alkýlglyseról og blöndu af metoxýleruðum og venjulegum alkýlglyserólum. Þessum súluhlutum var safnað saman, leysar fjarlægðir og efnin greind með  $^1\text{H-NMR}$ .

Til að greina metoxýleruðu alkýlglyserólin frá hinum venjulegu var notuð prep. TLC-plata. Líkt og aðskilnaðarsúlan hafði hún stöðufasa úr kísli og skildi efnin að út frá mismunandi skautun þeirra. Sýninu var hlaðið í þunna, lárétta grunnlínu neðarlega á plötuna og henni komið fyrir í ferðafasa. Þegar ferðafasinn fór upp eftir plötunni ferðuðust efnin með honum af grunnlínunni og aðskildust. Venjulegu alkýlglyserólin mynduðu band ofar á plötunni en hin metoxýleruðu, þar eð þau ferðuðust lengra upp plötuna vegna minni skautunar. Böndin voru síðan fjarlægð af plötunni og losuð af kíslinum. Að lokum voru leysar fjarlægðir til að fá hreint sýni metoxýleraðra alkýlglyseróla. Samsetning metoxýleruðu alkýlglyserólanna var svo könnuð með  $^1\text{H-NMR}$ -greiningu og HPLC-MS-tækni.

Seinni hluti verkefnisins hafði þann tilgang að greina almenna fitusýrusamsetningu hákarlalýsisins. Hreinu hákarlalýsi var komið fyrir á prep. TLC-plötu og hún keyrð og meðhöndluð á sama hátt og áður hefur verið lýst. Böndum með tríasýlglyserólum (TAG) og díasýlglyseróleterum (DAGE) var safnað saman. Að lokum voru efnin metanólrofin og fitusýrugreind með GC-MS-tækni.



## 3 Niðurstöður og umræður

### 3.1 Almennt

Hér á eftir koma lýsingar á niðurstöðum tilrauna og umræður um hvern hluta verkefnisins. Fyrst er stuttlega farið í lýsingu á hverjum hluta fyrir sig en síðan kemur túlkun á þeim með vísun í myndir rófanna, sem tekin voru af efnunum, og finna má í viðauka ritgerðarinnar.

### 3.2 Metanólrof hákarlalýsis

Fyrsti hluti tilraunarinnar fól í sér metanólrof hákarlalýsis, sem vó 48.78 g, með natríum-málmni og metanóli. Þegar TLC-greining sýndi að hvarfinu væri lokið var það unnið upp með skiltrekt, þurrkað með  $MgSO_4$  og leysar eimaðir í burtu. Blandan (EKRI\_1) reyndist veга 63.92 g.

$^1H$ -NMR róf blöndunnar, sjá mynd I, gefur til kynna að metanólrofið hafi gengið eftir. Á rófinu má sjá toppa sem ekki voru til staðar fyrir metanólrofið, svo sem stóran metoxýltopp við 3.65 ppm, sem kemur frá metýlesterum blöndunnar, og toppa fyrir alkýlglyseról við 3.88-3.55 ppm. Þegar róf af hreinu lýsi, mynd VIII, er borið saman við róf metanólrofnu blöndunnar kemur í ljós að toppar fyrir tríasýlglyseról og díasýlglyseróletera hafa horfið, sem staðfestir enn frekar að metanólrof hafi gengið.

Heildarheimtur úr hvarfinu reyndust minni en heimtur úr samsvarandi tilraun, gerðri af Carlosi D. Magnússyni. Þar sem TLC-greining og  $^1H$ -NMR-róf blöndunnar gefa til kynna að metanólrofið hafi gengið er líklegt að töp á heimtum hafi orðið við meðhöndlun blöndunnar eftir metanólrofið, það er við útdrátt, hreinsun eða þurrkun. Þrátt fyrir slakar heimtur var ákveðið að halda áfram með tilraunina og kanna hvort heimturnar úr fyrsta hluta hennar hefðu áhrif á heildarniðurstöður.

### 3.3 Aðskilnaður metoxýleraðra alkýlglyseróla

Einangrun metoxýleruðu alkýlglyserólanna hófst með kísilgelsaðskilnaðarsúlu. Grófu blöndunni (EKRI\_1) var komið fyrir á súlunni og hún keyrð með ýmsum leysablöndum. Metýlesterum, grófri blöndu kólesteróls og venjulegum alkýlglyserólum var safnað saman auk blöndu af venjulegum og metoxýleruðum alkýlglyserólum. Efnin voru svo greind með  $^1H$ -NMR-greiningu, en hver hluti hefur sína auðkennandi toppa á rófunum.

Fyrst komu metýlesterar niður af súlunni. Á  $^1H$ -NMR-rófi þeirra (EKRI\_3\_1D), sjá mynd II, má sjá einkennandi toppa fyrir metýlestera, svo sem metoxýltopp við 3.66 ppm og toppa fyrir þau kolefni sem næst eru sýruafleiðunni við 2.41-2.25 ppm og 1.70-1.52 ppm.

Næstu hlutar sem komu af súlunni innihéldu kólesteról lýsisins.  $^1H$ -NMR-róf þeirra (EKRI\_3\_3D), mynd III, sýndi að bæði mátti finna snofil af metýlesterum, auk venjulegra alkýlglyseróla í blöndunni. Sá toppur sem er hvað mest einkennandi fyrir kólesteról kemur við

0.68 ppm, en hann stendur fyrir metýlhópinum sem er á mótum fimm- og sexhrings kólesterólsins. Toppinn má sjá greinilega á mynd III, en á hana eru einnig merktir aðrir kólesteróltoppar.

Því næst komu venjuleg alkýlglyseról niður af súlunni. <sup>1</sup>H-NMR-róf þeirra (EKRI\_3\_4D), sjá mynd IV, sýnir þekkt mynstur fyrir prótónurnar á glyserólhuta sameindarinnar, þ. e. merki við 3.89-3.82 ppm fyrir miðjuprótonuna og tvisvar sinnum tvöfalda klofnun við 3.72 og 3.65 ppm fyrir glyserólprótónurnar sem sitja lengst frá etertenginu og alkýlkeðjunni. Merki fyrir prótónurnar sitt hvoru megin við etertengið má svo sjá við 3.56-3.41 ppm.

Af síðasta hluta súlunnar fengust venjuleg og metoxýleruð alkýlglyseról. Á <sup>1</sup>H-NMR-rófi blöndunnar (EKRI\_3\_D6), sjá mynd V, má sjá toppa metoxýlhópsins og prótónunnar, sem tilheyrir sama kolefnisatómi, við 3.44-3.29 ppm. Merkin fyrir metoxýlhópinum koma fram sem tveir singlettar, annars vegar fyrir mettaðar alkýlkeðjur og hins vegar fyrir ómettaðar keðjur. Staðsetning merkisins fyrir prótónuna á sama kolefnisatómi er einnig breytileg vegna mismunandi mettunarstigs og fellur að hluta til undir annan singlettinn. Þegar sú nálgun er notuð að merkin standi fyrir fjórar prótónur, þ. e. að hlutföll milli mettaðra og ómettaðra efna í blöndunni séu jöfn, sést á miðprótonu glyserólhlutans, við 3.91-3.81 ppm, að töluvert er af venjulegum alkýlglyserólum í blöndunni, eða um 80%. Af þessum sökum reyndist nauðsynlegt að hreinsa efnið betur með prep. TLC-plötu, þ. e. til að unnt væri að greina samsetningu metoxýleruðu alkýlglyserólanna. Á rófinu má enn fremur sjá að hlutfall fjölmottaðra keðja jókst mjög í blöndunni miðað við hlutfall þeirra hjá venjulegum alkýlglyserólum, enda eru þau metoxýleruðu ríkari af fjölmottuðum keðjum í hákarlalýsinu.

### 3.4 Hreinsun metoxýleraðra alkýlglyseróla

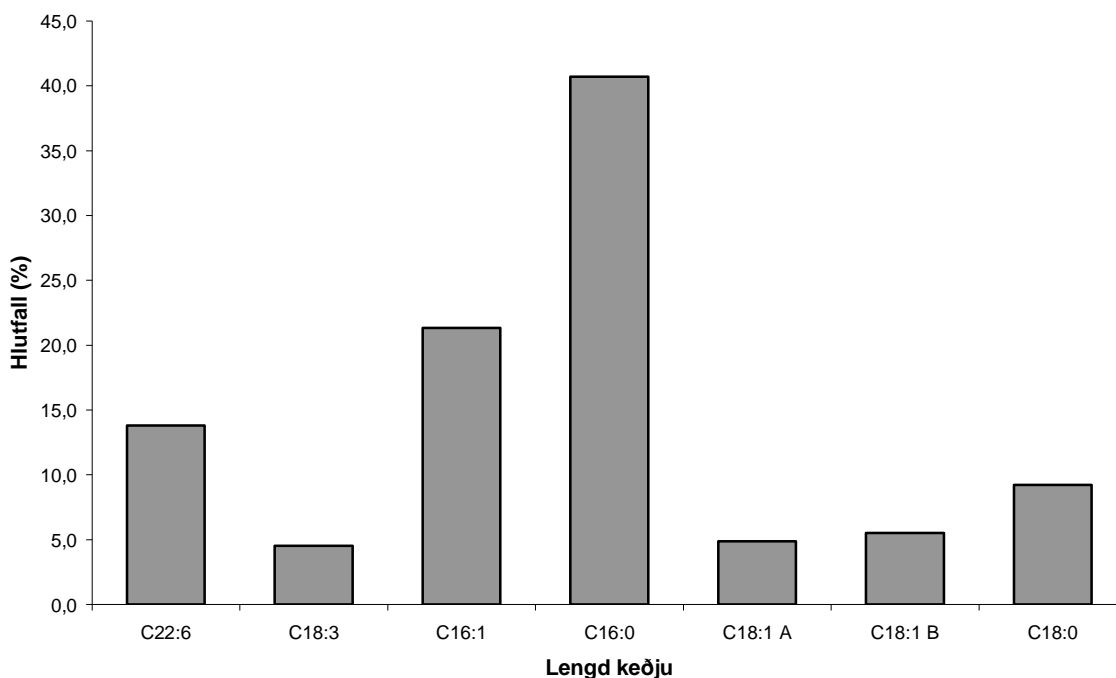
Metoxýleruðu alkýlglyserólin voru hreinsuð frekar með prep. TLC-plötum. Fyrsta keyrslan gaf 70/30 blöndu af metoxýleruðum og venjulegum alkýlglyserólum. Blandan var nógu hrein fyrir HPLC-MS-greiningu, en frekari hreinsunar var þörf fyrir greiningu á samsetningu þeirra. Prep. TLC-keyrsla á 70/30 blöndunni gaf hrein metoxýleruð alkýlglyseról.

HPLC-mæling af metoxýleruðu alkýlglyserólunum, sjá mynd VI, sýnir að hlutfallslega er mest af keðjulengdunum C16:0 og C16:1, þ. e. rúmlega 60%, samanber töflu 1. Hlutfall fjölmottaðra efna í hópi metoxýleruðu alkýlglyserólanna er einnig nokkuð hátt en töluvert er af C22:6 (DHA) og C18:3, eða rúm 18%.

*Tafla 1: HPLC-greining á metoxýleruðum alkýlglyserólum. Taflan sýnir röð efnanna út af HPLC-súlunni, gerð og lengd keðjanna, rástíma (RT), auk hlutfalls hverrar gerðar í blöndunni.*

Toppur	Lengd keðju	RT (min)	Hlutfall (%)
1	C22:6	3,4	13,8
2	C18:3	3,5	4,5
3	C16:1	6,0	21,3
4	C16:0	8,9	40,7
5	C18:1 A	9,3	4,9
6	C18:1 B	10,3	5,5
7	C18:0	12,8	9,2
<b>Samtals</b>	---	---	<b>100,0</b>

Hlutföll milli keðjulengdanna eru svipuð því sem komið hefur fram við aðrar rannsóknir,<sup>19</sup> þó að einhver breytileiki sé til staðar. Líklegast er að munurinn stafi af því að lýsið, sem notað var í tilrauninni, er blanda frá nokkrum hákarlategundum á meðan aðrar niðurstöður byggja á lýsi fengnu frá einstökum tegundum. Athyglisvert er að þegar niðurstöður af fersku sýni eru bornar saman við niðurstöður af eldri sýnum er nokkur munur á samsetningu keðjanna. Samsetningin er svipuð fyrir mettaðar keðjur en þegar um ómettaðar keðjur er að ræða er hún talsvert breytt. Munurinn stafar að öllum líkindum af skemmdum á eldri sýnunum, sem hafa orðið vegna langvarandi geymslu.<sup>20</sup> Samanburð á hlutfalli keðjulengda hjá fersku sýni metoxýleraðra alkýlglyseróla má sjá á mynd 9.



Mynd 9: Samanburður á innbyrðis hlutfalli metoxýleraðra alkýlglyseróla.

Massar metoxýleruðu alkýlglyserólanna sem fundust með HPLC-tækni voru kannaðir með HRMS-tækni. Í öllum tilvikum var nákvæmur massi staðfestur með innan við 4 ppm mun, en viðmið fyrir rétta greiningu er 5 ppm. Sjá töflu 2.

Tafla 2: Samanburður á reiknuðum og mældum mössum úr HRMS-mælingu metoxýleraðra alkýlglyseróla.

Lengd keðju	Gerð massa	Reiknaður massi [m/z]	Mældur massi [m/z]	Munur [ppm]
C22:6	M+Na	441,2975	441,2966	2,1
C18:3	M+Na	391,2819	391,2827	2,0
C16:1	M+Na	367,2819	367,2827	2,2
C16:0	M+Na	369,2975	369,2972	0,9
C18:1 A	M+Na	395,3132	395,3132	2,3
C18:1 B	M+Na	395,3132	395,3147	3,8
C18:0	M+Na	397,3288	397,3301	3,2

Að lokum var  $^1\text{H-NMR}$ -róf metoxýleruðu alkýlglyserólanna greint. Sýnið sem kom af seinni prep. TLC-plötunni (EKRI\_7DI), sjá mynd VI, sýndi að hreinsun metoxýleruðu alkýlglyserólanna hefði tekist. Sú nálgun að metoxýlhópurinn og prótónan sem tengd er sama kolefni, við 3.44-3.28 ppm, gefi heildi upp á fjóra á móti einum fyrir miðprótónu glyseróhlutans, við 3.91-3.81 ppm, gildir ef jafn mikið er af mettuðum og einómettuðum metoxýleruðum alkýlglyserólum í blöndunni. Niðurstöður HPLC-greininga sýna að nálgunin sé réttlætunleg þar sem hlutfall mettaðra og ómettaðra metoxýleraðra alkýlglyseróla er nánast jafnt, sjá töflu 3.

Tafla 3: Samaburður á mettunarstigum milli metoxýleraðra alkýlglyseróla.

Gerð metoxýleraðra alkýlglyseróla	Hlutfall (%)
Mettuð	49,9
Einómettuð	31,7
Fjölómettuð	18,3
<b>Alls</b>	<b>100,0</b>

Niðurstöður  $^1\text{H-NMR}$ -rófsins fyrir EKRI\_7DI gáfu einnig til kynna að hlutfallið væri nokkuð jafnt milli mettaðra og ómettaðra metoxýleraðra alkýlglyseróla.

Útreiknaður massi fyrir hrein metoxýleruð alkýlglyseról var 76 mg, sem telst vera 0.5% af hákarlalýsinu. Út frá forskrift tilraunarinnar var gert ráð fyrir að heimtur yrðu nær 1.0% og því er ljóst að einhver töp hafa orðið á heimtum efnisins. Tilraunaniðurstöðum, svo sem greiningu á samsetningu og innbyrðis hlutföllum metoxýleruðu alkýlglyserólanna, ber saman við áður þekkt gildi. Því er líklegast að skýra megi þetta lága hlutfall metoxýleraðra alkýlglyseróla í olíunni út frá tapi á heimtum í fyrsta skrefi tilraunarinnar.

### 3.5 Fitusýrusamsetning hákarlalýsis

Fitusýrusamsetning hákarlalýsis var könnuð með GLC-mælingu. Sýnin fyrir mælinguna voru fengin með prep. TLC-keyrslu á hreinu lýsi. Alls fengust þrjú bönd út úr keyrslu plötunnar. Böndin voru send í  $^1\text{H-NMR}$ -greiningu, sem gaf til kynna að efsta bandið væri skvalen, miðbandið díásýlglyseróleterar (DAGE) og neðsta bandið tríásýlglyseról (TAG).

Tafla 4: Samanburður á fitusýrusamsetningu díásýlglyseróletera (DAGE) og tríásýlglyseróla (TAG).

Lengd keðju	DAGE	TAG
14:0	0,7	1,7
16:0	15,2	11,6
16:1	2,9	4,0
16:2	0,4	0,0
18:0	2,6	3,1
18:1	34,6	33,5
18:2	0,5	0,6
18:3	0,4	0,0
20:1	12,0	18,5
22:1	15,4	10,9
24:1	6,9	4,2
Greinanlegt	91,5	88,1
Ógreint	8,5	11,9

Út frá rófi af hreinu hákarlalýsi má áætla að hlutfall milli tríásýlglyseróla og díásýlglyseróletera sé um það bil 60/40. Þegar fitusýrusamsetning hlutanna var könnuð með GLC-mælingu kom í ljós að hún var mjög svipuð fyrir bæði efnin, sjá töflu 4. Áþekk fitusýrusamsetning efnanna gefur til kynna að lítil sérvirkni sé til staðar, í lifur hákarlanna, þegar kemur að vali fitusýra á annars vegar díásýlglyseróletera en hins vegar á tríásýlglyseról.

Ekki náðist að greina 8.5% fitusýrana í tilviki díásýlglyseróletera og 11.9% í tilviki tríásýlglyseróla með GLC-tækni. Líklegt er að þar sé um að ræða fágætar keðjur og fjölómattanir. Athyglisvert er að sjá að tækið nam einungis snefil af C18:3 og ekkert af C22:6 (DHA). Í töflu 5 má sjá samantekt á mettnarstigi fitusýrana. Þar kemur í ljós að hlutur einómattaðra fitusýra (MUFA) var miklum mun hærri en hlutur mettaðra fitusýra (SAT).

Tafla 5: Samanburður á mettnarstigum fitusýra hjá díásýlglyseróleterum (DAGE) og tríásýlglyserólum (TAG). Í töflunni má finna mettaðar (SAT), einómattaðar (MUFA) og fjölómattaðar (PUFA) fitusýrur en einnig hlutfall ógreindra efna (annað).

Gerð fitusýra	DAGE	TAG
SAT	18,4	16,4
MUFA	64,9	66,9
PUFA	8,1	4,8
Annað	8,6	11,9
<b>Samtals</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

Eins og áður sagðu fundust vart fjölómettuð efni, eins og C18:3 og C22:6 (DHA), meðal fitusýranna. Hlutur fjölómettaðra efna í hákarlalýsi ræðst af því frá hvaða hákarlstegundum lýsið kemur, en tegundirnar eru ólíkar þegar kemur að samsetningu þess. Rannsóknir á lýsi, sambærilegu því sem hér var notað, hafa þó oft gefið hærra hlutfall fjölómettaðra efna. Hlutföllum milli mettaðra, ein- og fjölómettaðra fitusýra ber þó saman við eldri rannsóknir sem gerðar hafa verið á mismunandi brjóskfiskategundum.<sup>19</sup> Ennfremur er athyglisvert að sjá að óvenju mikið var af fitusýrunni C24:1 í lýsinu, en hún er yfirleitt ekki algeng í hákarlalýsi. Ákjósanlegt hefði verið að endurtaka fitusýrugreiningu á lýsinu, í ljósi framangreindra niðurstaðna, en því miður vannst enginn tími til þess.

## 4 Tilraunahluti

### 4.1 Almennt

Við greiningar á  $^1\text{H}$ -kjarnaspunarfófum var notað *Bruker Avance 400 MHz NMR*-tæki. NMR-sýnin voru öll leyst upp í deuteruðu klóróformi (99.8% D, Aldrich).

Við HPLC-MS-greiningar var HPCL-hlutinn gerður á 150 mm langa *reverse phase C18 Gemini-NX*-súlu með 3  $\mu\text{m}$  kornastærð og 2 mm innri vídd. Massagreiningar voru framkvæmdar á tæki af gerðinni *micrOTOF-Q* frá Bruker Daltonics. Tækið getur framkvæmt hágæða massagreiningar (HRMS) og á að geta mælt massa á bilinu 20-4000m/z með nákvæmni upp á 3 ppm. Rafúðajónun (ESI) var notuð við massagreiningarnar en með henni finnast massajónir á forminu M+X.

GLC-greiningar voru framkvæmdar á metýlesterum lýsisins eftir metanólrof með GC-MS-tækni. Greiningarnar voru gerðar með tækjum frá Hewlett Packard, annars vegar GC-mæling á *HP6890 series GC-system* og hins vegar MS-mæling á *5973 mass selective detector*.

### 4.2 Metanólrof hákarlalýsis

Natríummálmur (206 mg, 8.9 mmól, 22.99 g/mól) var þvegin með petróleumeter (3 x 20 mL) og leystur upp í metanóli (16 mL) í 100 mL suðufloösku. Hákarlalýsi (48.78 g) var bætt rólega út í flöskuna og blöndunni komið fyrir undir refluxi með segulhræru. Á meðan hvarfið gekk breyttist litur blöndunnar frá gulleitum yfir í rauðleitann lit. Eftir rúmar 3 klst. sýndi TLC að hvarfinu væri lokið og var blandan þá látin kólna við herbergishita.

Við uppvinnslu hvarfsins var blöndunni komið fyrir í skiltrekt og sýrustig hennar stillt á hlutlaust, samkvæmt litmuspappír. Var þetta gert með vatni, 2 M HCl og 14%  $\text{NaHCO}_3$ . Því næst var lífræna efnið dregið út í klóróform og skilið frá og vatnslagið síðan þvegið með klóróformi. Þá var lífrænu lögunum safnað saman, þau þvegin einu sinni með mettaðri NaCl-laun og síðan þurrkuð yfir  $\text{MgSO}_4$ . Að lokum voru leysar eimaðir í burtu með lækkuðum hlutþrýstingi á hverfissvala. Blandan (EKRI-1) var vegin og vó hún 63.92 g. Sýnið var síðan sent í  $^1\text{H}$ -NMR-greiningu.

**$^1\text{H}$ -NMR:** 5.44-5.28 (m,  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ : ein- og fjölómettuð efni), 3.66 (s,  $-\text{OCH}_3$ ), 3.88-3.83 (m,  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OR}$ ), 3.75-3.61 (m,  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOHCH}_2\text{OR}$ ), 3.55-3.42 (m,  $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OCH}_2\text{R}$ ), 2.88-2.75 (m,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 2.41-2.25 (m,  $\text{RCH}_2\text{COOCH}_3$ : mettuð og ómettuð efni), 2.12-1.92 (m,  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ : ein- og fjölómettuð efni), 1.69-1.53 (m,  $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ ), 1.39-1.07 (m,  $-(\text{CH}_2)_x$ ), 0.97 (t,  $J$  7.5,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$  fjölómettuð efni), 0.88 (t,  $J$  6.8,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.68 (s,  $-\text{CH}_3$  á mótum fimm og sexhring kólesteróls).

## 4.3 Aðskilnaður metoxýleraðra alkýlglyseróla

Fyrir aðskilnað efna var kísilgelssúla útbúin annars vegar úr 180 g af kísilgeli (0.060 - 0.200 nm, 9 nm þvermál) og hins vegar úr 10/90 blöndu af etýlasetati (EtOAc) og petróleumeter (peteter). Súlustærðir voru eftirfarandi:  $h = 38$  cm og  $r = 1.75$  cm. Súlan var hlaðin með 20.405 g af grófu blöndunni (EKRI\_1) og voru leysablöndur af peteter, etýlasetati og metanóli notaðar til að ná efnum af súlunni, sjá töflu 6.

Tafla 6: Aðskilnaður EKRI-1 á kísilgelsaðskilnaðarsúlu. Efnum var náð af súlunni með eftirfarandi leysablöndum úr petróleumeter (peteter), etýlasetati (EtOAc) og metanóli.

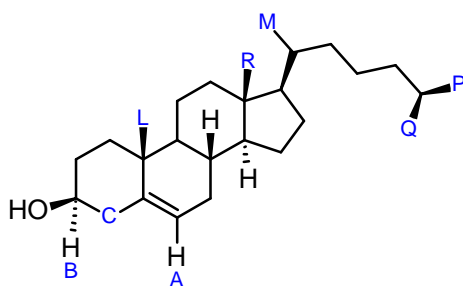
Hluti	Leysablanda	Efni af súlu skv. TLC (peteter/EtOAc/metanól; 50:40:7)
0	400 mL EtOAc/peteter (10:90)	metýlesterar
1	300 mL EtOAc /peteter (30:70)	metýlesterar
2	250 mL EtOAc /peteter (50:50)	metýlesterar og kólesteról
3	200 mL EtOAc /peteter (70:30)	kólesteról og venjuleg alkýlglyseról
4	300 mL EtOAc	venjuleg alkýlglyseról
5	400 mL EtOAc	venjuleg alkýlglyseról
6	400 mL EtOAc og 600 mL metanól	venjuleg og metoxýleruð alkýlglyseról

Þegar efnin komu út af súlunni var annars vegar hlutum 0 og 1 safnað saman og hins vegar hlutum 4 og 5. Leysar voru fjarlægðir af hverjum hlut fyrir sig með eimingu á hverfissvala og efnin síðan greind frekar með  $^1\text{H-NMR}$ -mælingum. Til einföldunnar var hvert róf greint fyrir sig.

### Metýlesterar: EKRI\_3\_1D (hlutar 0 og 1)

$^1\text{H-NMR}$ : 5.44-5.28 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ : ein- og fjölmettuð efni), 3.66 (s, 3H,  $-\text{OCH}_3$ ), 2.90-2.74 (m, 1H,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 2.41-2.25 (m, 2H,  $\text{RCH}_2\text{COOCH}_3$ : mettuð og ómettuð efni), 2.11-1.93 (m, 3H,  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ : ein- og fjölmettuð efni), 1.70-1.52 (m, 2H,  $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$ ), 1.40-1.02 (m, 20H,  $-(\text{CH}_2)_x-$ ), 0.97 (t, 0.4H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $J$  7.5, fjölmettuð efni), 0.88 (t, 3H,  $J$  6.8,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ )

### Kólesterólblanda: EKRI\_3\_3D (hluti 3)



$^1\text{H-NMR}$ : 5.35 (m, merkt A), 3.53 (m, merkt B), 2.29 (m, merkt C), 1.05 (m, merkt L), 1.01 (m, merkt M), 0.90 (m, merkt P), 0.87 (m, merkt Q), 0.68 (s, merkt R)

Mynd 10: Bygging kólesteróls. Á mynd-ina eru merktir þeir toppar sem eru auðþekkjanlegir í  $^1\text{H-NMR}$  rófi efnisins.



#### Venjuleg alkýlglyseról: EKRI\_3\_4D (hlutar 4 og 5)

<sup>1</sup>H-NMR: 5.41-5.27 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-: ein- og fjölómettuð efni), 3.89-3.82 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH-CHOH-CH<sub>2</sub>OR), 3.72 (dd, 1H, *J* 11.4, *J* 3.9, -CH<sub>2</sub>OH), 3.65 (dd, 1H, *J* 11.4, *J* 5.3, -CH<sub>2</sub>OH), 3.56-3.41 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>R), 2.88-2.74 (m, 0.3H, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-), 2.66-2.40 (s, 2H, -OH), 2.38-1.94 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-: ein-og fjölómettuð efni), 1.67-1.47 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R), 1.45-1.07 (m, 23H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>), 0.97 (t, 0.1H, *J* 7.5, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: fjölómettuð efni), 0.88 (t, 3H, *J* 6.8, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### Venjuleg og metoxýleruð alkýlglyseról: EKRI\_3\_6D (Hluti 6)

<sup>1</sup>H-NMR: 5.54-5.28 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-: ein- og fjölómettuð efni), 3.91-3.81 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH-CHOH-CH<sub>2</sub>OR), 3.76-3.44 (m, 7H, CH<sub>2</sub>OH-CHOH-CH<sub>2</sub>OR), 3.44-3.29 (m, 2H, -CH(COCH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>R), 2.89-2.73 (m, 1H, CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH), 2.59 (s, 0.6H, -OH), 2.38-1.93 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-: ein- og fjölómettuð efni), 1.66-1.42 (m, 3H, -CH(COCH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>R: mettuð og ómettuð efni), 1.42-1.18 (m, 22H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>), 0.98 (t, 0.3H, *J* 7.5, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: fjölómettuð efni), 0.88 (t, 3H, *J* 6.8, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

## 4.4 Hreinsun metoxýleraðra alkýlglyseróla

Síðasti hluti súlunnar (EKRI\_3\_6D), sem innihélt bæði venjuleg alkýlglyseról og metoxýleruð alkýlglyseról, var hreinsaður betur með prep. TLC-plötu (1000 µL). Efninu var hlaðið á plötuna og hún keyrð með blöndu af peteter/etýlasetati/metanóli (50:40:7). Band metoxýleraðra alkýlglyseróla á plötunni var skafið af, mulið og þvegið með etýlasetati. Í fyrstu keyrslu náðist 70% hrein blanda af metoxýleruðum alkýlglyserólum. Blöndunni var skipt í tvennt og helmingur settur á aðra prep. TLC-plötu til frekari hreinsunnar en hinn helmingurinn sendur í HPLC-MS-greiningu. Samkvæmt <sup>1</sup>H-NMR gaf sú síðari af sér hrein metoxýleruð alkýlglyseról, en platan var meðhöndluð og keyrð við sömu aðstæður og sú fyrri. Útreiknaður massi metoxýleraðra alkýlglyseróla reyndist vera 73 mg, sem má túlka sem 0.5% af hákarlaolíunni.

<sup>1</sup>H-NMR: 5.54-5.29 (m, 3H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-: ein- og fjölómettuð efni), 3.91-3.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH-CHOH-CH<sub>2</sub>OR), 3.76-3.44 (m, 7H, CH<sub>2</sub>OH-CHOH-CH<sub>2</sub>OR), 3.44-3.28 (m, 4H, -CH(COCH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>R), 2.88-2.73 (m, 1H, CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH), 2.40-1.97 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>-: ein- og fjölómettuð efni), 1.66-1.42 (m, 2H, CH(COCH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>R: mettuð og ómettuð efni), 1.42-1.19 (m, 23H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>), 0.97 (t, 0.5H, *J* 7.5, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: fjölómettuð efni), 0.88 (t, 4H, *J* 6.8, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**HPLC:** C16:0 (40.7%), C16:1 (21.3%), C18:0 (9.2%), C18:1 A (4.9%), C18:1 B (5.5%), C18:3 (4.5%), C22:6 (13.8%).

**MS-MS:** C16:0 (0.9 ppm), C16:1 (2.2 ppm), C18:0 (3.2 ppm), C18:1 A (2.3 ppm), C18:1 B (3.8 ppm), C18:3 (2.0 ppm), C22:6 (2.1 ppm).

## 4.5 Fitusýrusamsetning hákarlalýsis

Hákarlalýsi (96 mg) var hlaðið á prep. TLC-plötu og hún keyrð í blöndu peteters/dietyleters/ísediks (80:20:2). Í ljós komu þrjú bönd sem voru fjarlægð af plötunni, hreinsuð og loks greind sem skvalin (*R<sub>f</sub>* = 0.84), díásýlglyserólererar (*R<sub>f</sub>* = 0.66) og tríásýlglyseról (*R<sub>f</sub>* = 0.55) með <sup>1</sup>H-NMR-tækni. Seinni böndin tvö voru svo send í GLC-mælingu.

**Hreint hákarlalýsi: EKRI\_O**

**<sup>1</sup>H-NMR:** 5.43-5.29 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>: ein- og fjölmömettuð efni), 5.29-5.07 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OORH-CHOOR-CH<sub>2</sub>OOR), 4.36-4.25 (m, 1.2H, CH<sub>2</sub>OORCHOOR-CH<sub>2</sub>OR/CH<sub>2</sub>OOR-CHOOR-CH<sub>2</sub>OOR), 4.20-4.10 (m, 1.2H, CH<sub>2</sub>OOR-CHOOR-CH<sub>2</sub>OR), 3.57-3.48 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OOR-CHOOR-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>R), 3.48-3.37 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OOR-CHOR-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>R), 2.88-2.70 (m, 1H, CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH), 2.40-2.25 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OOOCR: mettuð og ómettuð efni), 2.13-1.91 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>: ein- og fjölmömettuð efni), 1.70-1.47 (m, 7H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOOCR), 1.42-1.05 (m, 57H, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>), 1.01-0.81 (m, 9H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: mettuð og ómettuð efni), 0.68 (s, 0.2H, -CH<sub>3</sub> á mótum fimm og sexhring kólesteróls).

**Tríasýlglyseról (TAG): EKRI\_11\_3**

**<sup>1</sup>H-NMR:** 5.40-5.31 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>: ein- og fjölmömettuð efni), 5.30-5.23 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OORH-CHOOR-CH<sub>2</sub>OOR), 4.30 (dd, 2H, *J* 11.9, *J* 4.3, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>OORH-CHOOR-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>OOR), 4.15 (dd, 2H, *J* 11.9, *J* 6.0, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>OORH-CHOOR-CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>OOR), 2.88-2.70 (m, 1H, CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH), 2.36-2.27 (m, 5H, CH<sub>2</sub>OOOCR: mettuð og ómettuð efni), 2.09-1.95 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>: ein- og fjölmömettuð efni), 1.67-1.52 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOOCR), 1.42-1.08 (m, 58H, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>), 1.01-0.79 (m, 9H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: mettuð og ómettuð efni).

**Díacylglyseróleter (DAGE): EKRI\_11\_2**

**<sup>1</sup>H-NMR:** 5.41-5.28 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>: ein- og fjölmömettuð efni), 5.24-5.15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OR-CHOOR-CH<sub>2</sub>OOR), 4.34 (dd, 1H, *J* 11.9, *J* 3.7, CH<sub>2</sub>OORCHOORCH<sub>2</sub>OR), 4.16 (dd, 1H, *J* 11.9, *J* 6.4, CH<sub>2</sub>OOR-CHOOR-CH<sub>2</sub>OR), 3.57-3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OOR-CHOR-CH<sub>2</sub>OR), 3.47-3.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OOR-CHOR-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>R), 2.88-2.72 (m, 0.2H, 1H, CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH), 2.35-2.26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>OOOCR: mettuð og ómettuð efni), 2.08-1.93 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>: ein- og fjölmömettuð efni), 1.68-1.49 (m, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OOOCR), 1.40-1.04 (m, 63H, (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>), 0.99-0.77 (m, 9H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>: mettuð og ómettuð efni).

## 5 Lokaorð

Markmið verkefnisins var tvíþætt, annars vegar að rannsaka samsetningu metoxýleraðra alkýlglyseróla sem finnast í hákarlalýsi og hins vegar að greina fitusýrusamsetningu þess. Greining á samsetningu og gerð keðja hjá metoxýleruðum alkýlglyserólum heppnaðist vel. Niðurstöðum greininganna bar saman við áður þekkt gildi, en bygging, hreinleiki og samsetning þeirra var sannkennd með  $^1\text{H-NMR}$ -, HPLC- og MS-mælingum. Heildarferlið gekk með ágætum, þó að heimtúr úr hvarfinu hefðu verið lakari en búist hafði verið við. Líklegast er að það megi skýra með tapi á heimtum við vinnslu fyrsta skrefs hvarfsins.

Fitusýrugreining hákarlalýsisins gekk greiðlega og leiddi í ljós að fitusýrusamsetning tríasýlglyseróla og díasýlglyseróletera er mjög áþekkt. Niðurstaðan kemur heim og saman við áður þekkt gildi. Eins og í fyrri hluta verkefnisins var bygging og hreinleiki efnanna sannkenndur með  $^1\text{H-NMR}$ -mælingum, en sjálf fitusýrugreiningin fór fram með hefðbundinni GLC-mælingu.

Meginmarkmiðum verkefnis var náð, þ. e. greiningu á samsetningu og hlutföllum metoxýleruðu alkýlglyserólanna og fitusýrugreiningu lýsisins. Á hinn bóginn væri ákjósanlegt að endurtaka tilraunarferlið í heild sinni til að hámarka afköst fyrsta skrefsins og lágmarka tap á heimtum. Það myndi auðvelda mat á gagnsemi heildarferilsins til einangrunar metoxýleraðra alkýlglyseróla, auk þess sem það gæfi kost á að finna leið til að bæta framkvæmdarhluta tilraunarinnar í framangreindu skyni.

Reykjavík, júní 2010

---

Edda Katrín Rögnvaldsdóttir

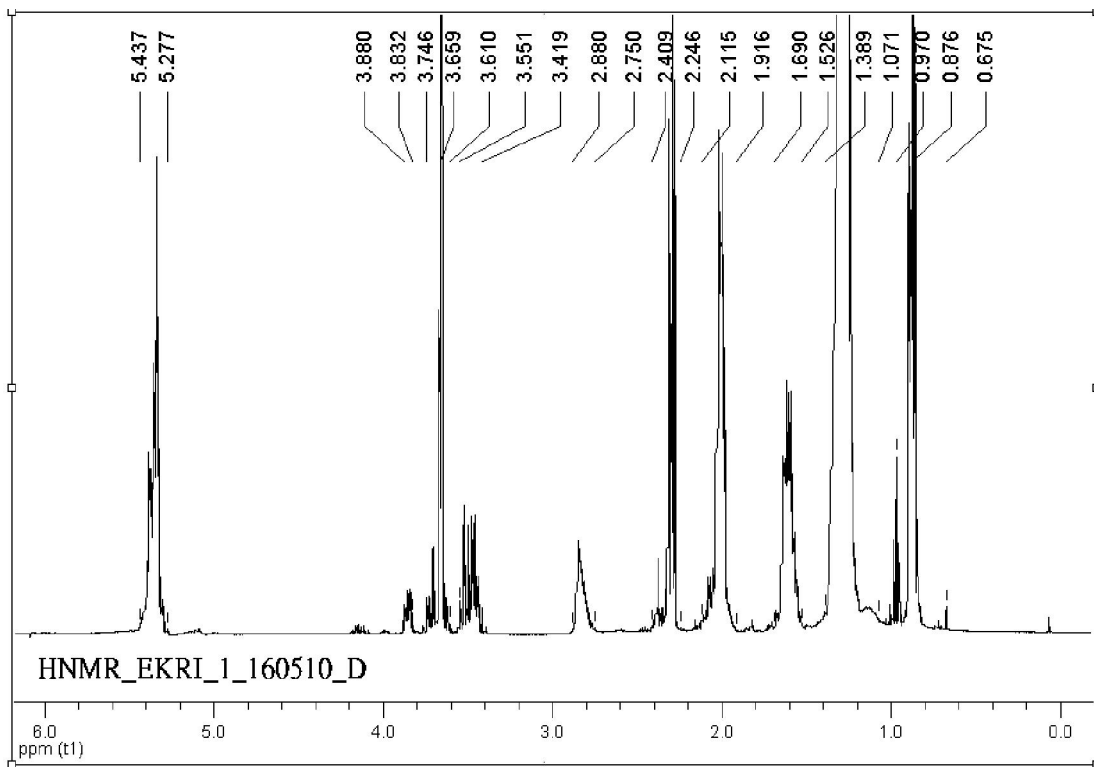
# Heimildir

- 1 Wetherbee, B.M.; Nichols, P.D. 2000. „Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise, New Zealand“, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and molecular biology*. 125(4), bls. 511-521.
- 2 McMurry, J. 2008. *Organic Chemistry*, 7. útgáfa. Thomson. Belmont, CA. Bls. 1061-1065.
- 3 Silverthorn, D. U. 2007. *Human Physiology: an intergrated approach*, 5. útgáfa. Pearson. San Francisco. Bls. 729-736.
- 4 Schutter, M. E.; Dick, R. P. „Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities“, *Soil Science Society of America Journal*. 64, bls. 1659-1668.
- 5 Pugliese, P. T.; Jordan, K.; Cederberg, H.; Brohult, J. 1998. „Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil“, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 4, bls. 87-99.
- 6 Kayama, M.; Mankura, M. 1998. „Natural olechemicals in marine fishes“, *Journal of the American Oil Chemists Society*. 9, bls. 794-799.
- 7 Mangold, H. K; Palthauf, F. 1983. „Ether Lipids. Biochemical and Biomedical Aspects“, Academic Press, New York.
- 8 Hallgren, B.; Ställberg, G. 1967. „Methoxy-substituted Glycerol Ethers Isolated from Greenland Shark Liver Oil“, *Acta Chemica Scandinavica*. 21, bls. 1519-1529.
- 9 Carballeira, N. M. 2002. „New advances in the chemistry of methoxylated lipids“, *Progress in Lipid Research*. 41(6), bls. 437-356.
- 10 Hallgren, B.; Ställberg, G.; Thorin, H. 1971. „The Separation and Identification of a Methoxy-Substituted Polyunsaturated Glycerol Ether from Greenland Shark Liver Oil“, *Acta Chemica Scandinavica*. 25, bls. 3781-3784.
- 11 Ställberg, G. 1990. „Synthesis of the Stereoisomers of 1-O-(2'-Methoxyhexadecyl)-glycerol and some Phosphocholine Derivatives“, *Acta Chemica Scandinavica*. 44, bls. 368-376.
- 12 Hallgren, B.; Niklasson, A.; Ställberg, G.; Thorin, H. 1974. „On the Occurrence of 1-O-Alkylglycerols and 1-O-(2-Methoxyalkyl)glycerols in Human Colostrum, Human Milk, Cow's Milk, Sheep's Milk, Human Red Bone Marrow, Red Cells, Blood Plasma and a Uterine Carcinoma“, *Acta Chemica Scandinavica*. 28B, bls. 1029-1034.

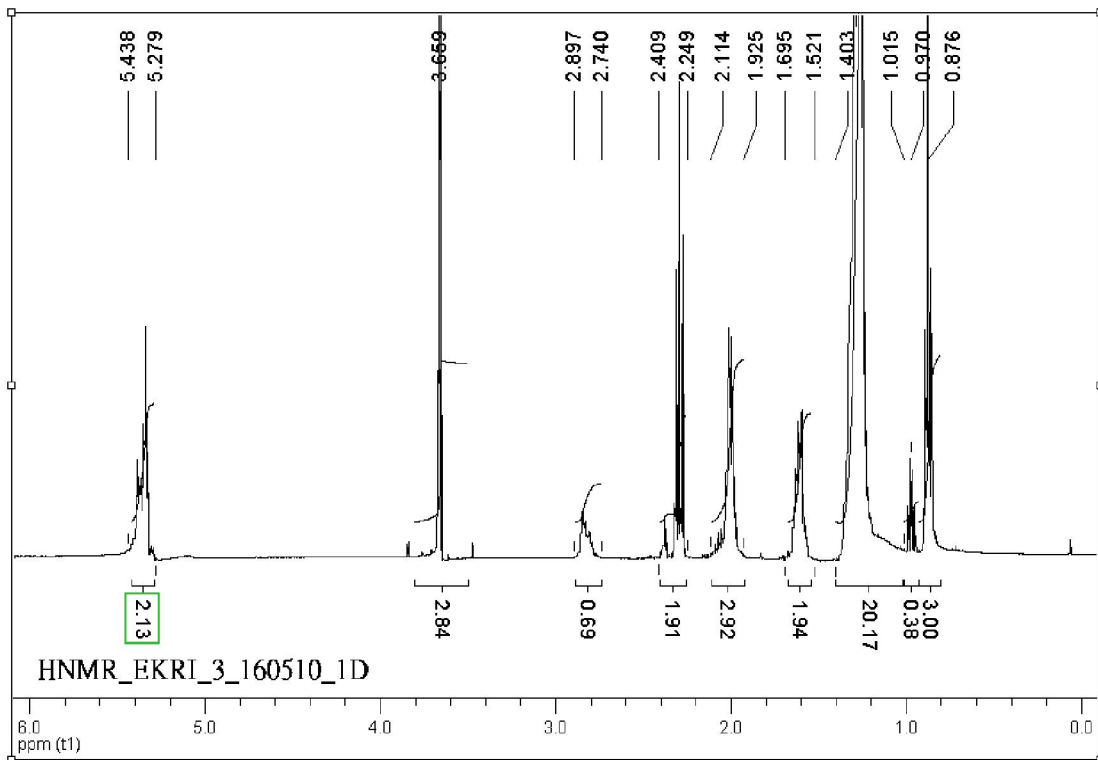
- 13 Boeryd, B.; Hallgren, B.; Ställberg, G. 1971. „Studies on the effect of methoxy-substituted glycerol ethers on tumour growth and metastasis formation“, *British Journal of Experimental Pathology*. 52, bls. 221-230.
- 14 Hallgren, B. í: Mangold, H.K. og Paltauf, H. ritsjórar. 1993. „Ether lipids, biochemical and biomedical aspects“, Academic Press, New York, bls. 261–274.
- 15 Silverthorn, D. U. 2007. *Human Physiology: an intergrated approach*, 5. útgáfa. Pearson. San Francisco. Bls. 31.
- 16 Bloch, K. 1983. „Sterol structure and membrane function“, *CRC Critical Reviews in Biochemistry Rev*,14(1), bls. 47-92.
- 17 Smith, T. J. 2000. „Squalene: potential chemopreventive agent“, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 9(8), bls. 1841–1848.
- 18 Pollack, A. „Benefit and Doubt in Vaccine Additive“, *The New York Times*, 21. september 2009.
- 19 Hayashi, K; Takagi, T. 1982. „Characteristics of Methoxy-Glyceryl Ethers from Some Cartilaginous Fish Liver Lipids”, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48 (9), bls. 1345-1351.
- 20 Ómarsson, F. H.; Haraldsson, G. G.; Smáráson, S. V. 2009. „Greining metoxýleruðum alkýl glýseríðum úr hákarlalýsi með vökvaskilju og massagreini“, sérverkefni í efnagreiningum við Raunvísindadeild Háskóla Íslands.

## Viðauki

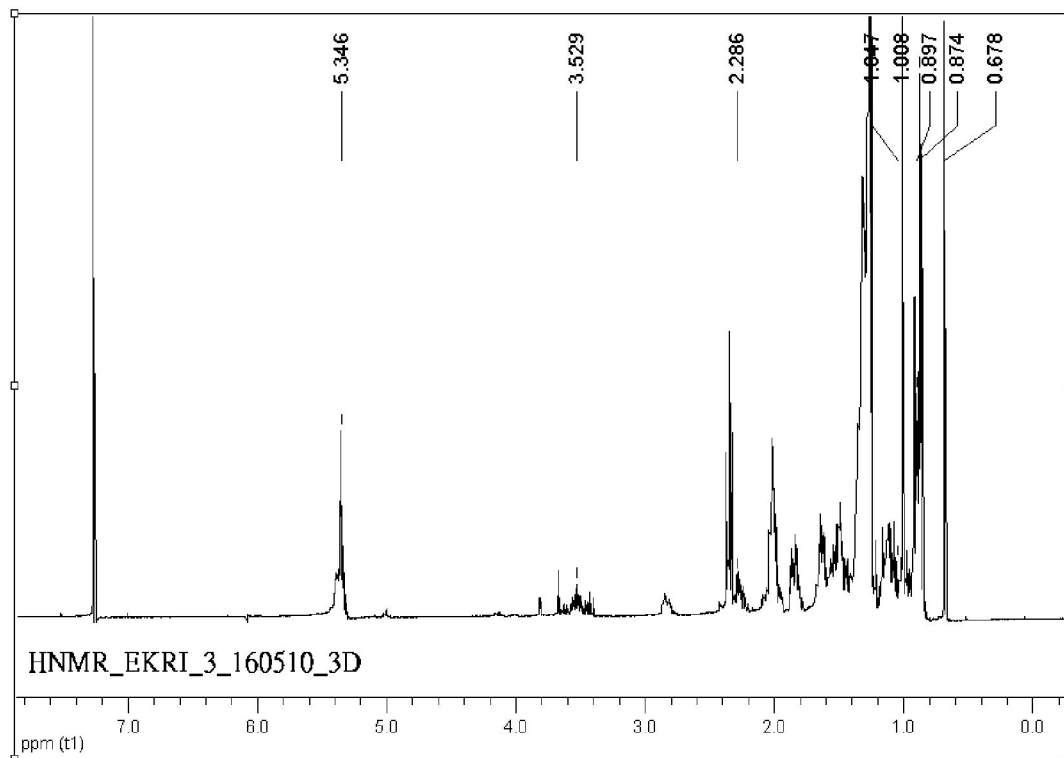
Hér á eftir gefur að líta myndir af þeim rófum sem mæld voru við gerð tilraunarinnar. Um er að ræða  $^1\text{H}$ -MNR-róf þeirra efna sem mæld voru, auk HPLC-rófs metoxlýseraðra glýseróla.



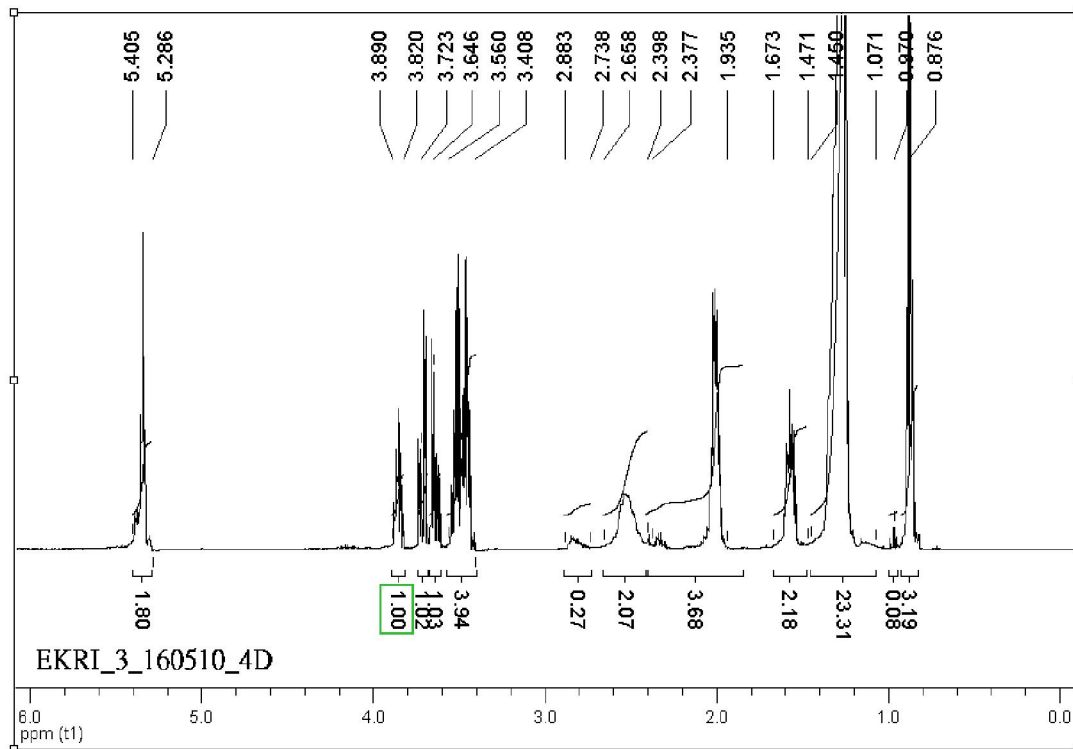
Mynd I: EKRI\_1D. Hákarlalýsi eftir metanólrof. Á rófinu má sjá staðsetningu toppa.



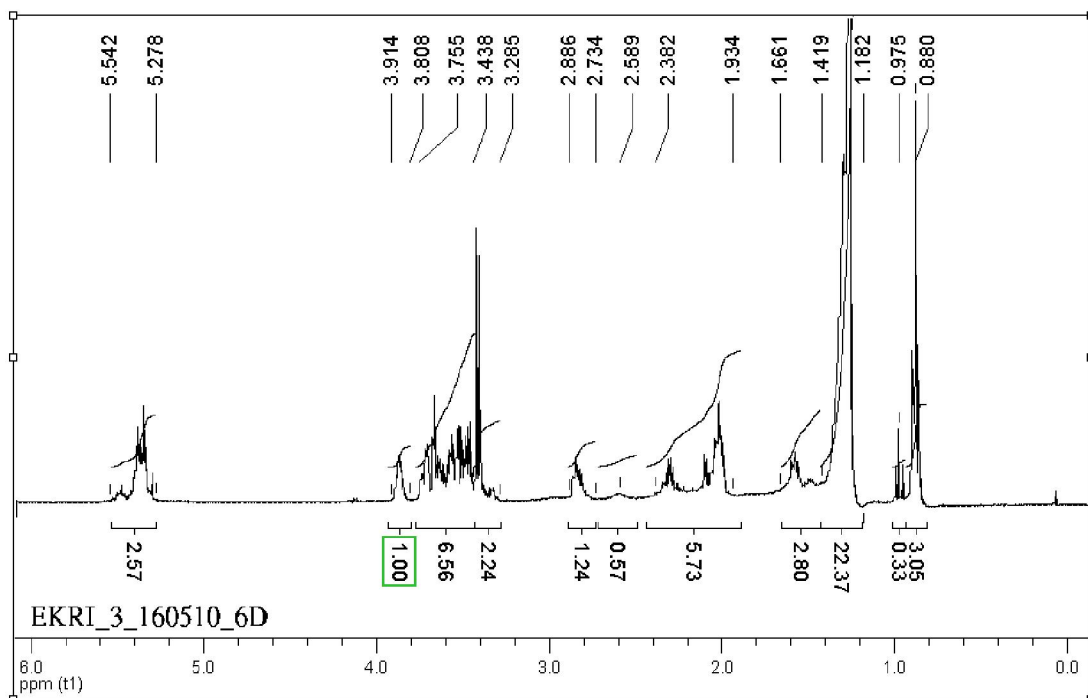
Mynd II: EKRI\_3\_1D. Blanda metýlestera. Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.



Mynd III: EKRI\_3\_3D. Blanda kólesteróls, venjulegra alkýlglýseróla og metýlestera. Á rófinu má sjá staðsetningu helstu toppa kólesteróls en toppar venjulegra alkýlglýseróla og metýlestera eru ekki merktir inn á myndina.

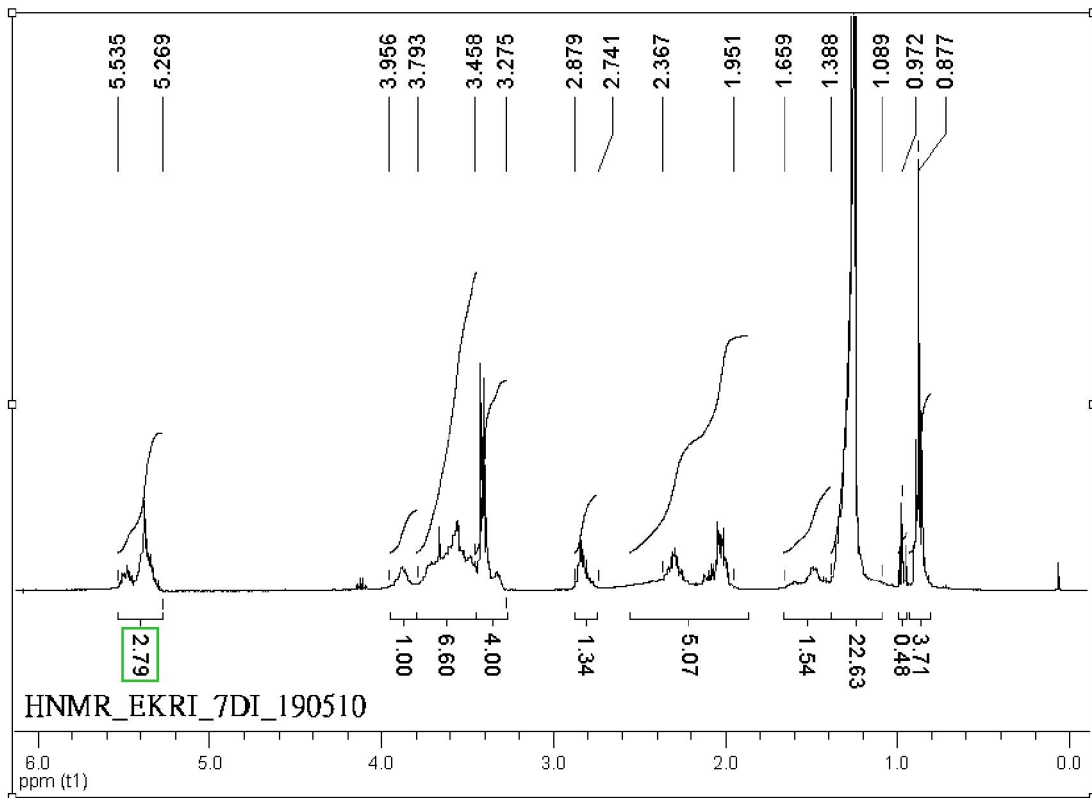


Mynd IV: EKRI\_3\_4D. Blanda venjulegra alkýlglyseróla. Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.

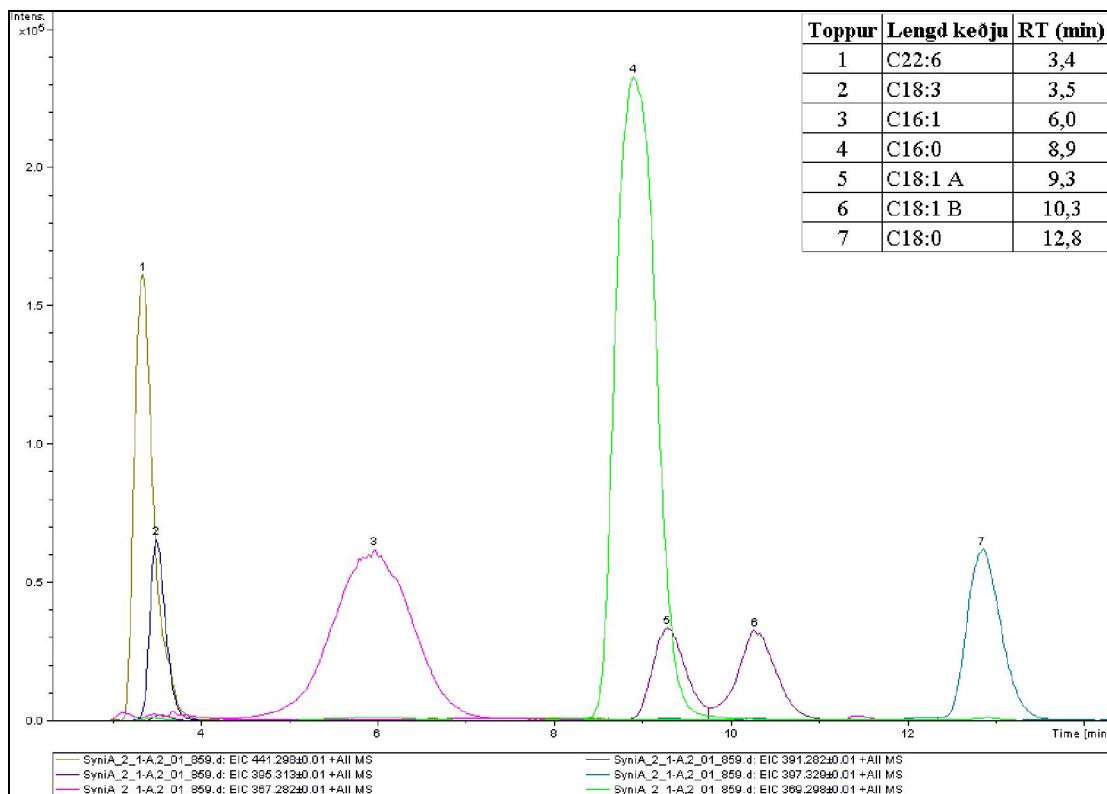


Mynd V: EKRI\_3\_6D. Blanda venjulegra og metoxýleraðra alkýlglyseróla. Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.

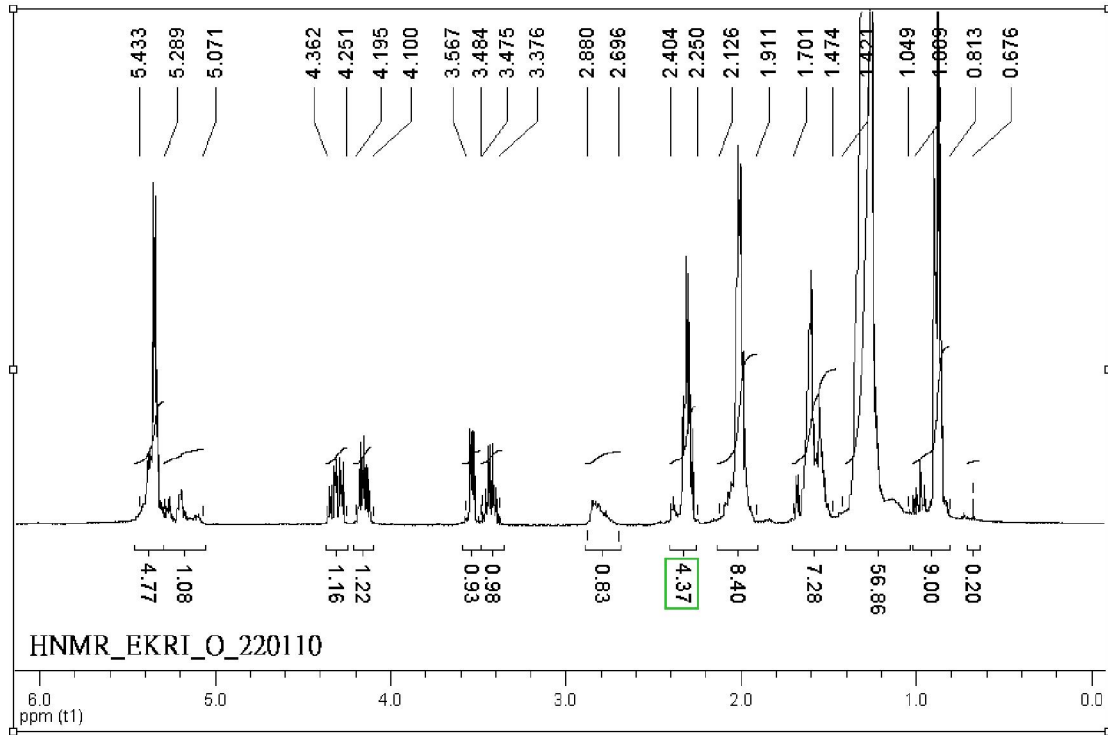




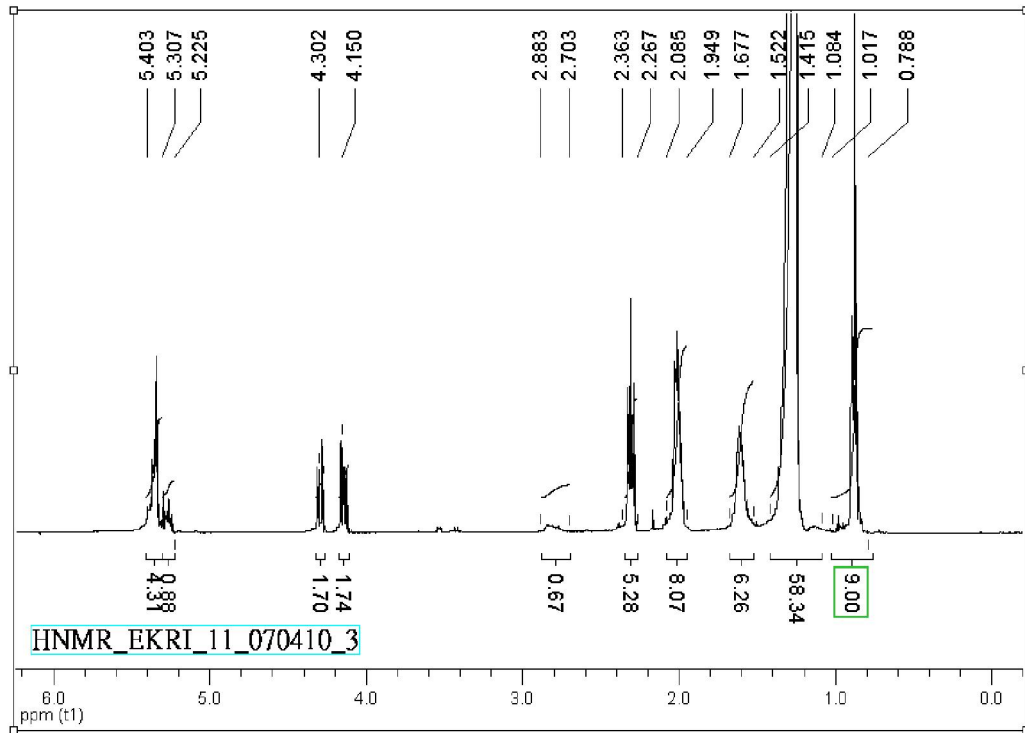
Mynd VI: EKRI\_7DI. Metoxýleruð alkýlglýseról. Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.



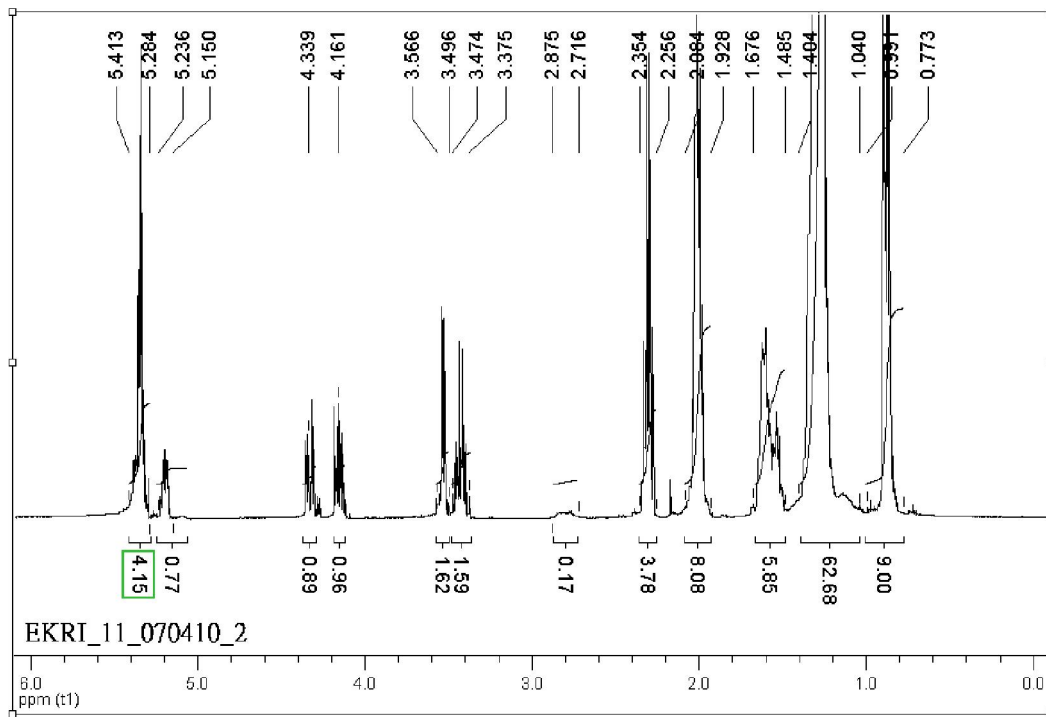
Mynd VII: Röð metoxýleraða alkýlglýseróla af HPLC-súlu. Á rófinu má sjá lengd og gerð keðjanna auk rástíma efnanna af súlunni.



Mynd VIII: EKRI\_O. Hákarlalýsi. Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.



Mynd IX: EKRI\_11\_3. Tríasýlglyseról (TAG). Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.



Mynd X: EKRI\_11\_2. Díasýlglyseróleterar (DAGE). Á rófinu má sjá staðsetningu toppa og heildi undir þeim.