

MASTEROPPGÅVE I ORGANISK KJEMI

**UTVIKLING AV METODE FOR Å
OPPARBEIDE ORGANISK MATERIALE
FRÅ HYDROTHERMALT SEDIMENT TIL
BIOMARKØR-ANALYSE**

AV

PER-OLA RASMUSSEN

JUNI 2008



KJEMISK INSTITUTT
UNIVERSITETET I BERGEN

FORORD

Dette arbeidet er utført ved Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen, og utgjør den praktiske delen av studie Master i organisk kjemi.

Takk til Tanja Barth for god fagleg veiledning, for at du alltid har hatt tid og for inspirerende samtaler når frustrasjonen har vært størst.

Takk til Ingunn Thorseth og Lise Øvreås på Senter for Geobiologi for utlevering av prøver og for at dykk har vært behjelpelig med spørsmål.

Takk til Marian Vaage for Rock Eval analyser.

Takk til mine gode medstudentar Jone Mortensen og Anne-Birgit Skåtøy. Dykk har gjort at eg har mange gode minner frå studenttida på UiB.

Takk til familie og venner som har fått tankane over på andre ting på fritida.

Bergen, juni 2008

Per-Ola Rasmussen

SAMANDRAG

Det første hydrotermale feltet på store havdjup vart oppdaga utanfor Galapagos i 1977. Det var forventa å finne varmekjelder også på havbotnen, men det ein ikkje forventa å finne var å finne eit rikt liv av virvellaus fauna rundt desse felta. Korleis desse organismane kunne leve under utan tilgang på sollys vekte interessa hjå mange forskarar. I desse felta vart det påvist svoveloksiderande bakteriar som nyttar seg av kjemosyntesen og danna basen i næringskjeda. I lys av dette oppstod kanskje den mest oppsiktvekkjande teorien rundt desse hydrotermale felta, forskarar trur nemlig at det kan være rundt slike felt at liv først oppstod.

Seinare vart det påvist fleire hydrotermale felt og i 2005 vart det første norske feltet oppdaga 60 km aust for Jan Mayen. I denne oppgåva vart det jobba med sedimentprøver frå dette feltet. Oppgåva tek for seg å utvikle ein metode til å ekstrahere ut organisk materiale frå sedimenta og opparbeide ekstrakt som kan egne seg til analyse på GC/MS. Målet er å identifisere biomarkørar og feittsyreprofilar og spore desse tilbake til levande organismar. På denne måten kan ein finne ut kva slags liv som lever rundt desse felta. Konsentrasjonen av det organiske materialet var liten i sedimenta, så å opparbeide store nok konsentrasjonar til at ekstrakta var egna til analyse på GC/MS var tidkrevjande.

Det vart jobba både med sediment som var lufttørka og sediment som var frosne. For å opparbeide ekstrakt med organisk materiale vart desse vart prøvd ekstrahert med Soxhlet ekstraksjon og det vart prøvd ein metode med forsåping. Det vart og prøvd ut ulike metodar for å derivatisere feittsyrene til metylester. Sedimenta viste seg å løyse seg godt i syre, og det vart testa ut ulike metodar for å oppkonsentrere det organiske materiale i sedimentet ved å behandle det med syre.

Det viste seg at det var dei frosne sedimenta som gav best resultat. Dei to beste metodane for å ekstrahere ut det organiske materiale av sedimenta var enten å først behandle sedimenta med 2,5 M saltsyre eller å frysetørke sedimenta før Soxhlet ekstraksjon. I ekstrakta frå sedimenta vart det identifisert for det meste hydrokarbonar, feittsyrer og fleire sterol. For å kunne analysere feittsyrene på GC/MS måtte dei omdannast til meir stabile stoff. Derivatisering med metanol (BF_3) viste seg å være ein metode som fungerte godt for å omgjere feittsyrene til metylester.

INNHALDSFORTEIKNING

FORORD.....	2
SAMANDRAG	3
INNHALDSFORTEIKNING.....	4
1 INNLEIING	6
1.1 Bakgrunn	6
1.2 Målsetjing.....	7
1.3 Hydrotermale felt	8
1.3.1 Korleis hydrotermale felt blir danna	8
1.3.2 Biologien rundt dei hydrotermale felta	9
1.3.3 Kvifor er hydrotermale felt interessante for oss?.....	11
1.4 Tre livsformer.....	11
1.5 Biomarkørar	13
1.6 Feittsyrer.....	13
1.7 Bruk av biomarkørar og feittsyrer i hydrotermale felt	14
1.8 Eksperimentell tilnærming av biomarkørar og kerogen analyse.....	15
2 METODAR OG EKSPERIMENTELT	16
2.1 Innleiing	16
2.2 Flytdiagram	17
2.2.1 Flytdiagram for Soxhlet ekstraksjonar	17
2.2.2 Flytdiagram for derivatisering med diazometan	19
2.2.3 Flytdiagram for hydrolyse og derivatisering med metanol (BF ₃)	20
2.3 Rock Eval analyse	21
2.4 Prosedyre for å finne vektprosent vatn i frosne sediment	23
2.5 Soxhlet ekstraksjon	23
2.5.1 Standard Soxhlet ekstraksjon	23
2.5.2 Tørka sediment.....	25
2.5.3 Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment	25
2.5.4 Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment forbehandla med saltsyre	26
2.5.5 Soxhlet ekstraksjon av frysetørka vått sediment	26
2.6 Mikrovekt	27
2.7 Forsåping.....	29
2.8 Syrebehandling.....	30
2.8.1 Frosne sediment behandla med saltsyre og lut.....	30
2.8.2 Test av løysingsevne til sedimentet i ulike syrer.....	31
2.8.3 Syrebehandling av frosne sediment med oksalsyre.....	32
2.9 Derivatisering	32
2.9.1 Derivatisering med diazometan.....	33
2.9.2 Test av hydrolyse og derivatisering av modellforbinding.....	34
2.9.3 Hydrolyse og derivatisering med metanol (BF ₃).....	35
2.10 Gasskromatografi/ massespektrometri (GC/MS).....	36
3 RESULTAT	38
3.1 Rock Eval	38
3.2 Vektprosent vatn i frosne sediment.....	39
3.3 Soxhlet ekstraksjon	39
3.3.1 Soxhlet ekstraksjon av tørka sediment	41
3.3.2 Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment	43

3.3.3	Soxhlet ekstraksjon av sediment behandla med saltsyre.....	43
3.3.4	Soxhlet ekstraksjon av frysetørka sediment	46
3.4	Forsåping	48
3.5	Frose sediment behandla med saltsyre og lut.....	48
3.6	Løysingsevne i ulike syrer.....	50
3.7	Syrebehandling av frose sediment med oksalsyre.....	53
3.8	Derivatisering med Diazometan.....	53
3.9	Derivatisering med MeOH (BF ₃)	54
3.9.1	Derivatisering med MeOH (BF ₃) av modellforbindingar	54
3.9.2	Derivatisering med MeOH (BF ₃) av ekstrakt frå frysetørka sediment.....	55
4	DISKUSJON	58
4.1	Rock Eval	58
4.2	Vektprosent vatn i frose sediment	59
4.3	Soxhlet ekstraksjon	60
4.3.1	Soxhlet ekstraksjon av tørka sediment	61
4.3.2	Soxhlet ekstraksjon av frose sediment	61
4.3.3	Soxhlet ekstraksjon av sediment behandla med saltsyre.....	62
4.3.4	Soxhlet ekstraksjon av frysetørka sediment	62
4.4	Forsåping	64
4.5	Frose sediment behandla med saltsyre og lut.....	64
4.6	Løysingsevne i ulike syrer.....	65
4.7	Syrebehandling av frose sediment med oksalsyre.....	66
4.8	Derivatisering med diazometan.....	66
4.9	Derivatisering med metanol (BF ₃)	67
4.9.1	Derivatisering med metanol (BF ₃) av modellforbindingar	67
4.9.2	Derivatisering med metanol (BF ₃) av ekstrakt frå frysetørka sediment.....	68
4.10	Potensialet for å finne biomarkørar i hydrotermale sediment	70
5	KONKLUSJON	71
6	VIARE ARBEID.....	72
7	REFERANSELISTE	73
	APPENDIKS	76
	Appendiks A.....	76
	Appendiks B.....	77
	Appendiks C.....	79
	Appendiks D.....	81
	Appendiks E	84

1 INNLEIING

1.1 Bakgrunn

Sommaren 2005 blei det oppdaga to aktive hydrotermale felt 60 km aust for Jan Mayen. Felta blei kald Gallionella Garden og Soria Moria og vart funnen på 600-700 meters djup (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>). Temperaturen i dei hydrotermale væskene vart målt opp mot 270°C. Figur 1 syner eit av desse felta som vart funnen.



Figur 1: Skorsteinar frå eit av dei hydrotermale felta utan for Jan Mayen (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>)

I slike miljø er det heilt spesielle livsvilkår og stor biologisk aktivitet. Ein ser for seg at dei første organismane på jorda kan ha oppstått under slike vilkår. Det er derfor av interesse å undersøke kva form for liv som lever der. Senter for Geobiologi forskar mykje på dette og denne oppgåva er kobla opp mot dette prosjektet, og tar for seg ein kjemisk problemstilling innanfor denne forskinga.

Prøvematerialet til oppgåva er sedimentprøver som er henta opp frå desse hydrotermale felta. Figur 2 syner sedimentprøvene rett etter dei er henta opp frå havbotnen. Oppgåva gjekk ut på å finne ein metode for å ekstrahere ut det organiske materiale i sedimenta og opparbeide ekstrakt som egna seg for analyse på GC/MS. Ved å identifisere kva stoff som er i sedimenta vil profiler av organiske komponentar kunne fungere som biomarkørar for å identifisere typar mikroorganismar som lev i sedimenta rundt dei hydrotermale kjeldene.



Figur 2: Botnprøver frå dei hydrotermale felta rett etter dei er henta opp i frå havbotnen.
(<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>)

1.2 Målsetjing

- Utvikle prosedyrar for å ekstrahere ut organisk materiale av sediment frå dei hydrotermale områda.
- Finne ein god metode for derivatisering av feittsyrer i ekstrakta.
- Analyse av feittsyre og hydrokarbon-biomarkørar ved hjelp av GC/MS.
- Identifisering av organiske molekyl som kan brukast som biomarkørar.
- Lage feittsyreprofilar for det organiske materialet i sedimentet.

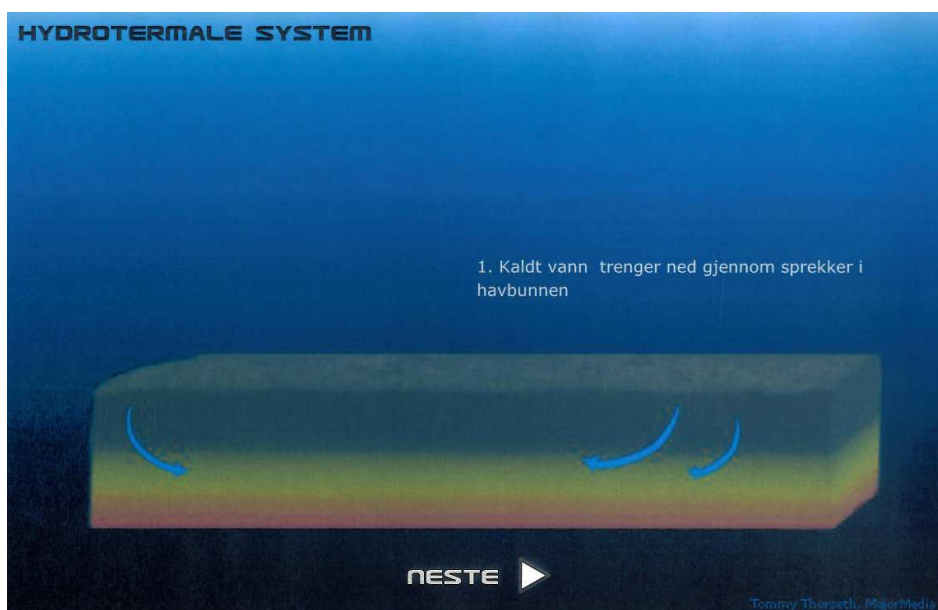
1.3 Hydrotermale felt

1.3.1 Korleis hydrotermale felt blir danna

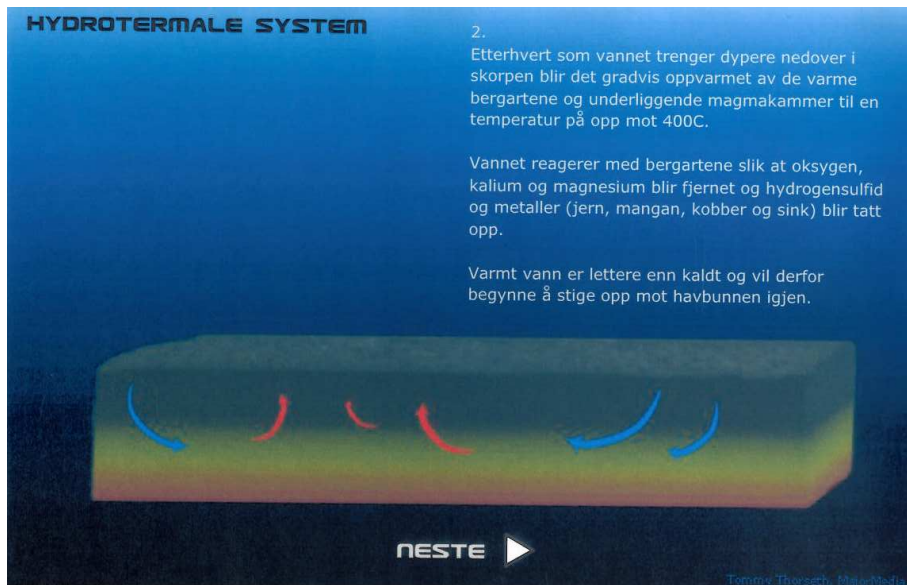
Hydrotermale felt er ei sprekk i planeten si overflate der vatn som er blitt oppvarma i jorda sitt indre blir slept ut. Desse felta finn ein vanlegvis i nærleiken av aktive vulkanske områder.

Hydrotermale områder fins både på land og til havs. På land finn ein dei ofte som geysir, varme kjelder og fumaroler. Undersjøiske hydrotermale felt danner skorsteinsliknande strukturar. Ein har funne slike skorsteinar på djup frå 3600 meter til så grunt som 30 meter (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>).

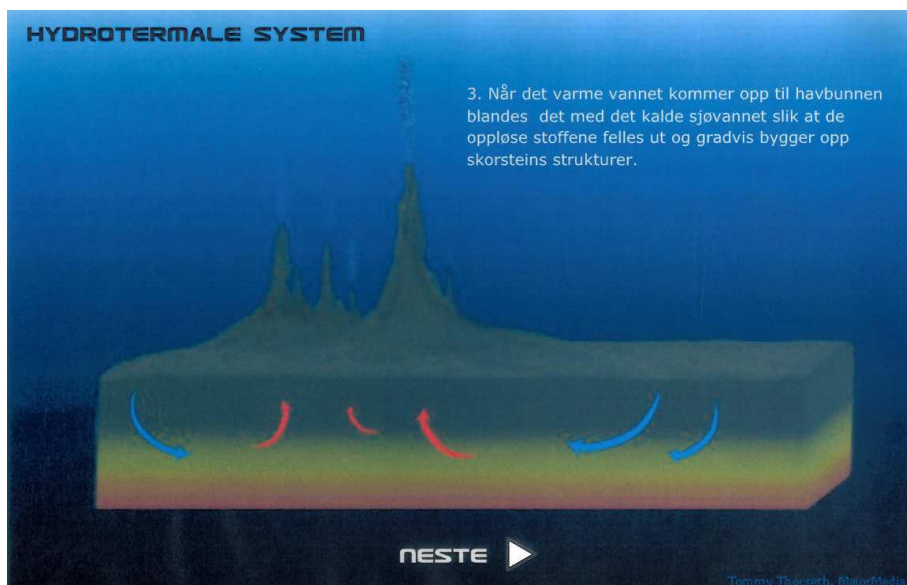
Hydrotermale felt blir danna ved at kaldt vatn trengjer ned gjennom sprekker i havbotnen (Figur 3). Etter kvart som vatnet trengjer djupare ned i jordskorpa vil det gradvis bli oppvarma av dei varme bergartane og underliggjande magmakammer til ein temperatur opp mot 400°C. Vatnet reagerar med bergartane slik at oksygen, kalium og magnesium blir fjerna og hydrogensulfid og metall (jern, mangan, kobbar og sink) blir tatt opp. Når vatnet blir varma tilstrekkeleg opp vil det til slutt begynne å stige opp mot havbotnen igjen (Figur 4). Når det varme vatnet kjem opp til havbotnen blandast det med det kalde sjøvatnet slik at dei oppløyste stoffa fellast ut og gradvis bygg opp skorsteinsstrukturar (Figur 5) (Van Dover 2000).



Figur 3: Illustrasjon av korleis hydrotermale felt blir danna (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>)



Figur 4: Illustrasjon av korleis hydrotermale felt blir danna (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>)



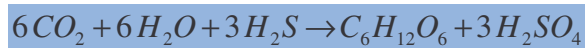
Figur 5: Illustrasjon av korleis hydrotermale felt blir danna (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>)

1.3.2 Biologien rundt dei hydrotermale felta

Med utfordringar som eit totalt mørke, høgt trykk og vatn som strømmer ut av skorsteinane på mange hundre gradar saman med giftige stoff, skulle ein tru at det var lite liv rundt dei hydrotermale felta. Dette vil være eit heilt utenkelig miljø å leve i for dei fleste organismar. Det visar seg likevel at økosystema rundt desse hydrotermale felta er biologisk meir produktive enn resten av dei store havdjupa. Sollyset trengjer ikkje lenger enn ca 200 meter

ned i sjøen, så fotosyntesen vil være umogleg å utføre. Organismane som lev her må derfor bruke ein heilt anna type energi for å skaffe seg næring. I desse økosystema lev det mikroorganismar som nyttar seg av kjemosyntese. Kjemosyntesen er ein prosess der bakteriar tar energi frå kjemikalie, slik som hydrogensulfid, for å kombinere vatn og karbondioksid til å produsere karbohydrat. Den kjemiske formelen som mikroorganismane i dei hydrotermale felta nyttar seg av er vist i Formel 1.

Formel 1: Kjemosyntesen med hydrogensulfid (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemosynthesis>)



Kjemosyntesen til mikroorganismane dannar basen i næringskjeda og gir grunnlaget for diverse høgare organismar som røyrdannande mangebørstemark, muslingar, krabber og reker.



Figur 6: Makrofauna funne rundt dei hydrotermale felta ved Jan Mayen. 1. Ti arma blekksprut, 2. Amphipode, 3. Stor slangesjøstjerne, 4. Hårstjerne (<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>)

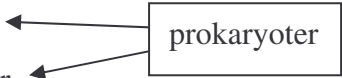
1.3.3 Kvifor er hydrotermale felt interessante for oss?

Det er mange ulike grunnar til at forskning på hydrotermale felt kan komme til nytte for oss.

- Ved forskning og studiar av slike ekstreme miljø og organismar, kan vi kanskje løyse gåta om korleis liv oppstod.
- Ein annan teori er at når det kan leve organismar i slike ekstreme miljø på vår eigen planet, er det ikkje noko i vegen for at det er liknande organismar som kan leve på andre planeter, der det er ekstreme miljø og det ikkje er tilgang på oksygen. Det er og teoriar om at det eksisterar hydrotermale felt på Mars og på Jupiter sin måne, Europa.
- Organismane som lev rundt hydrotermale felt kan og være til nytte i industrien. Sidan dei er konstruert så dei tåler høge temperaturar og høgt trykk, kan dei brukast i industriell samanheng. På havbotnen omgjer dei skadelege stoff til ufarlege produkt, som sukker. Dette kan utnyttast kommersielt ved at dei til dømes kan uskadeliggjere og bryte ned farlege stoff i avfall.

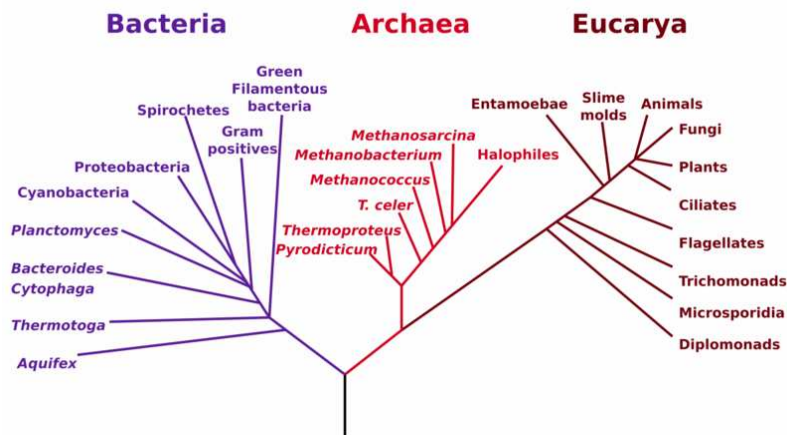
1.4 Tre livsformer

Levande organismar kan bli delt inn i tre ulike kategoriar (domains of life) (Woese and Wolfe 1985).

- Arkea
 - Eubakterier
 - Eukarya (eukaryote og høgare organismar)
- 
- ```
graph LR; A[prokaryoter] --> B[Arkea]; A --> C[Eubakterier];
```

Desse blir vidare delt inni i ulike underartar illustrert i Figur 7.

## Phylogenetic Tree of Life



Figur 7: Inndeling av dei tre livsformene. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic\\_tree](http://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic_tree))

I motsetning til prokaryoter har eukaryoter blant anna cellekjerne og andre komplekse celleorganeller. Eukaryote mikroorganismar inkluderar algar, amøbar og sopp. Alle høgare fleircella organismar er også eukaryoter.

Prokaryoter består av millionar av ulike eincella arke og eubakteriar. Mange av dei er enda ikkje karakterisert. Arke og eubakteriar blir skilt frå kvarandre biokjemisk og ved dei ulike miljøa dei lev i (White 1999). Arke finn ein vanlegvis i ekstreme miljø som til dømes ved store saltkonsentrasjonar eller høg varme. Men ein har no også funne dei i meir moderate miljø, som jordsmonn og sjøvatn (Torsvik, Ovreas et al. 2002).

Det er mange skilnadar mellom desse tre livsformer. Nokre av desse forskjellane kontrollerar kva type biomarkør ein finn i desse gruppene. Til dømes, steran i petroleum stammar frå sterol i cellemembran til eukaryoter. Prokaryoter brukar hopanoider i deira cellemembran. Så hopaner i petroleum kan difor sporast tilbake til prokaryoter (Peters, Moldowan et al. 2005). Ei rekkje isoprenoider med særeigne asykliske og sykliske strukturar funne i sediment, kan berre stamme frå Arke (Brocks and Summons 2003).

Andre biomarkørar er enda meir spesifikke og gjer at ein kan spore dei til enda finere inndeling enn dei tre livsformene vist i Figur 7.

## 1.5 Biomarkørar

I kjemien er biomarkørar eit slags molekylært fossil, det vil seie at desse komponentane stammar frå tidlegare levande organismar. Biomarkørar er komplekse organiske komponentar som består av karbon, hydrogen og andre element. Ein finn dei i sediment, stein og råolje og dei viser lite eller ingen teikn til forandring i strukturen frå det molekylet dei stamma frå i levande organismar.

Biomarkørar er nyttig fordi dei kan gi meir informasjon om kor dei stammar frå enn andre forbindingar. I motsetning til biomarkørar, gir til dømes metan og graffit forholdsvis lite informasjon, praktisk talt alle organiske forbindingar vil generere desse produkta når dei blir tilstrekkeleg oppvarma.

Det som er særmerke for ein biomarkør er følgjande (Peters and Moldowan 1993):

1. Forbindinga visar ein struktur som indikerar at den har, eller kunne ha vert, ein komponent i levande organismar.
2. Forbindinga som biomarkøren stammar frå har høge konsentrasjonar i organismen.
3. Ein kan identifisere karakteristiske strukturelle forbindingar som følgje av at dei er kjemisk stabile under sedimentering over lang tid.

## 1.6 Feittsyrer

Feittsyre er ei karboksylsyre, ofte med ein lang uforgreina alifatisk hale som enten kan være metta eller umetta. Karboksylsyre så korte som butansyre (smørsyre) med fire karbon blir rekna for å være feittsyre (<http://goldbook.iupac.org>). Ein finn feittsyrer i levande organismar og dei er uløseleg i vatn, men løyseleg i organiske løysemiddel.

Ein kan finne frie feittsyrer naturleg i små mengder, men vanlegvis er dei ein del av meir komplekse molekyl gjennom ester eller amid bindingar. Å isolere frie feittsyrer frå biologisk materiale er omfattande og ein må være forsiktig så ein unngår at strukturen blir endra. (<http://www.cyberlipid.org/>).

Feittsyrer kan være gode biomarkører. Men sidan ein finn dei fleste i mange ulike organismar er ikkje dei alltid gode biomarkører i seg sjølv. Men samansetjinga av dei ulike feittsyrene i organismen kan ofte vere meir unik (Lechevalier and Laskin 1977). Dette kallar ein for feittsyreprofilen til organismen. Ved å identifisere alle dei ulike feittsyrene som er i sedimentet kan ein difor ofte klare å spore dei tilbake til levande organismar (Colaco, Desbruyeres et al. 2007) (Quezada, Buitron et al. 2007).

### **1.7 Bruk av biomarkører og feittsyrer i hydrotermale felt**

Fauna som er basert på kjemosyntese har blitt observert rundt mange aktive hydrotermale skorsteinar på havbotnen. Ein trur at dyra i desse systema ernærer seg på primær produksjon frå bakteriar. Dyr og bakteriar kan være den dominerande kjelda til organisk materialet i sedimenta på dei hydrotermale felta (Yamanaka and Sakata 2004). Noko av det organisk materiale avsett rundt dei hydrotermale skorsteinane, kan dermed bli brukt som biomarkører for å forstå økologien og fysiologien til desse systema.

Feittsyrer utgjer den viktigaste bestanddelen til lipid i levande organismar. Det er svært mange forskjellige feittsyrer som ulike organismar kan danne (Vanvleet and Quinn 1979), dette gjer at feittsyrer er nyttige når ein skal spore organisk materiale tilbake til opphavs organismen.

Vanlegvis vil komposisjonen av feittsyrer i marine virvellause dyr bestå av to fleirumetta feittsyrer:

- Eicosapentaenoic acid (20:5n-3)
- Docosahexaenoic acid (22:6n-3)

Dette kan sporast tilbake til at desse organismane ernærer seg av organisk materiale produsert av phytoplankton, som er primær produsent der fotosyntesen er mogleg (Sargent 1976).

I hydrotermale felt på havbotnen vil dei virvellause dyra innehalde veldig små mengder eller mangle desse fleirumetta feittsyrene. Dei har rikelige mengder av einumetta feittsyrer som palmitoleic acid (16:1n-7) og cis-vaccenic acid (18:1n-7) som stammar hovudsakleg frå bakteriar (Benmlih, Marty et al. 1992). Desse einumetta feittsyrene er betrakta som den

største komponenten i svoveloksiderande bakteriar (Fullarton, Wood et al. 1995), som har vist seg å være den viktigaste primær produsenten ved kjemosyntese i hydrotermale miljø (Jannasch 1983).

### **1.8 Eksperimentell tilnærming av biomarkørar og kerogen analyse**

Geokjemisk analyse av organisk materiale i sediment startar vanlegvis med å måle innhald av totalt organisk karbon (TOC) og ei evaluering av termisk modning og type av organisk materie ved til dømes Rock Eval pyrolyse. Dette kan også underbyggjast med organisk petrografisk analyse, palynology, bestemming av karbon, hydrogen, oksygen, nitrogen, og svovel innhald og isotop analyser (Brocks and Summons 2003).

Vidare kan løyseleg organisk materiale (bitumen) bli isolert frå sedimentet ved ekstraksjon med løsemiddel som diklorometan og metanol og vidare separert i komponentar av ulik molekylær størrelse og polaritet ved væske kromatografi. Metta hydrokarbon, aromatiske hydrokarbon og ein polar fraksjon med organisk oksygen, nitrogen, og svovel bindingar blir på denne måten skild frå makromolekylært materiale av asfalten fraksjonen.

Etter dette kan ein få tak i dei uløselege organiske bindingane (kerogen eller forstadiet til kerogen) frå rest sedimentet ved demineralisering med saltsyre og flussyre.

Gasskromatografi (GC) kombinert med gasskromatografi- massespektrometri (GC/MS) er den viktigaste metoden for å identifisere biomarkørar i dei metta og aromatiske hydrokarbonfraksjonane av løyselege organiske komponentar i sedimentet.

Væskrokromatografi og massespektrometri opnar nye muligheiter til å analysere intakte polare lipid frå opphavs organismen. Denne analyse metoden kan bli svært viktig for å få betre kunnskap om biomarkørar og identifikasjon av store molekyl som er umogleg å analysere med GC/MS.

Å skaffe informasjon om innhaldet av biomarkørar i det uløselege organiske materiale er krevjande. Ved kombinasjon av kontrollert kjemisk og pyrolytisk degraderings teknikkar og analyse med kjernemagnetisk resonans (NMR) kan det likevel være mogleg.

## 2 METODAR OG EKSPERIMENTELT

### 2.1 Innleiing

Prøvematerialet som skulle analyser på var mikrobielle matter avsett rundt hydrotermale felt på havbotnen. Sedimenta varierte i farge frå mørkare til lysare raudbrun. Dei lyse felta var meir porøs medan dei mørke var hardare. Men både dei lyse og dei mørke felta var lett å pulverisere med mortar.

Det vart først jobba med tørka sedimentprøver (Figur 8). Desse var lufttørket og lagra mørkt og tørt i plastposar ved romtemperatur. Prøvene var tatt opp frå havbotnen i juni 2005. Det blei totalt analysert åtte prøver av desse sedimenta fordelt på to ulike klumpar. Desse blei nummerert frå 1t-8t. Der prøve 1t-6t er henta frå ein klump og 7t og 8t er frå ein annan.



**Figur 8:** Tørka sedimentprøver frå hydrotermale felt.



**Figur 9:** Frose sedimentprøver frå hydrotermale felt.

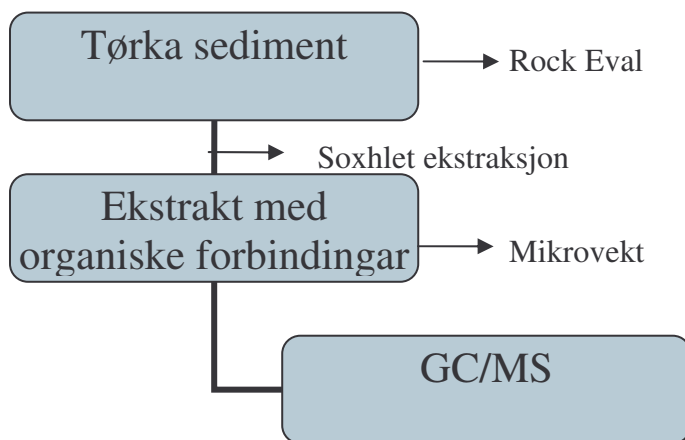
Seinare vart det jobba med frosne sedimentprøver (figur 9). Desse prøvene var pakka inn i aluminiumsfolie og frosne ned til  $-80^{\circ}\text{C}$  med ein gang dei var tatt opp frå havbotnen. Sidan det ikkje er frysar med den kapasitet på våre laboratorium så vart sedimentprøvene blei lagra på  $-20^{\circ}\text{C}$  frå desember 2007 – april 2008. Prøvene var tatt opp frå havbotnen i juni 2006. Det blei totalt analysert sju prøver av desse sedimenta fordelt på to ulike klumpar. Desse blei nummerert frå 1f-7f. Der prøve 1f-5f er henta frå ein klump og 6f og 7f er frå ein annan.



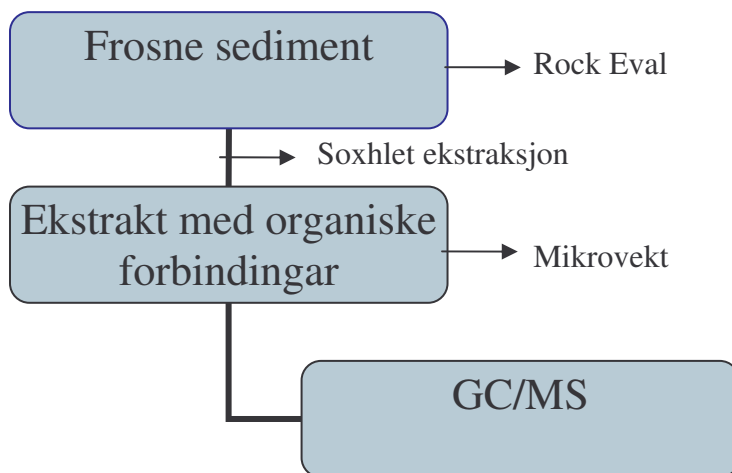
## 2.2 Flytdiagram

### 2.2.1 Flytdiagram for Soxhlet ekstraksjonar

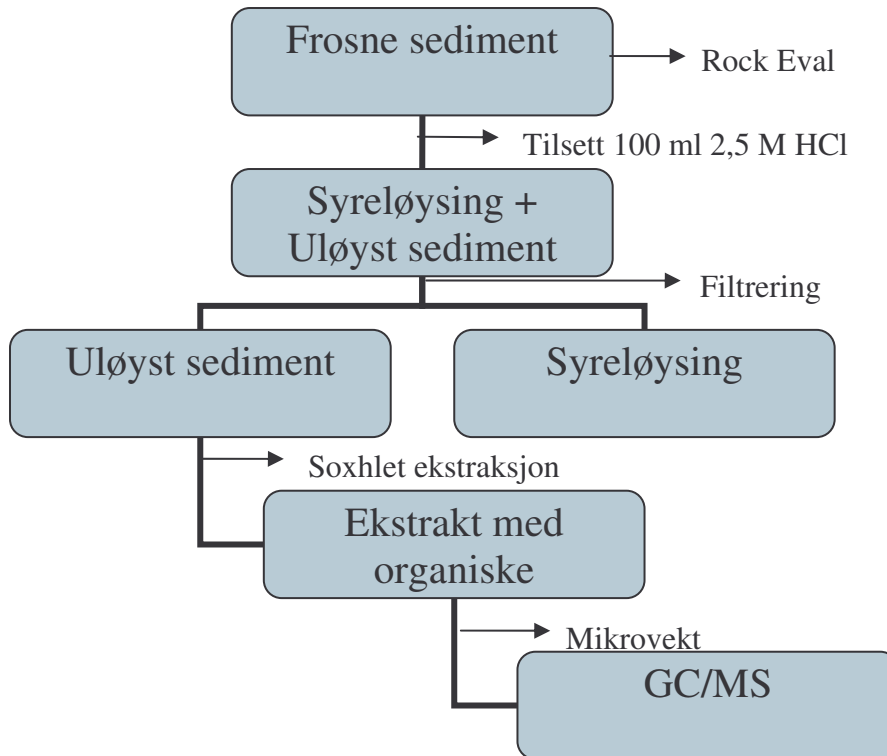
Sidan denne oppgåva gjekk mest ut på å finne ein metode for opparbeiding av organiske materiale til analyse på GC/MS, så endra flytdiagram seg fleire gongar undervegs. Alle dei utprøvde metodane er vist i Figur 10- Figur 13 Det siste flytdiagrammet som vart nytta er vist i Figur 13. Dette var det flytdiagrammet som såg ut til å gi best resultat.



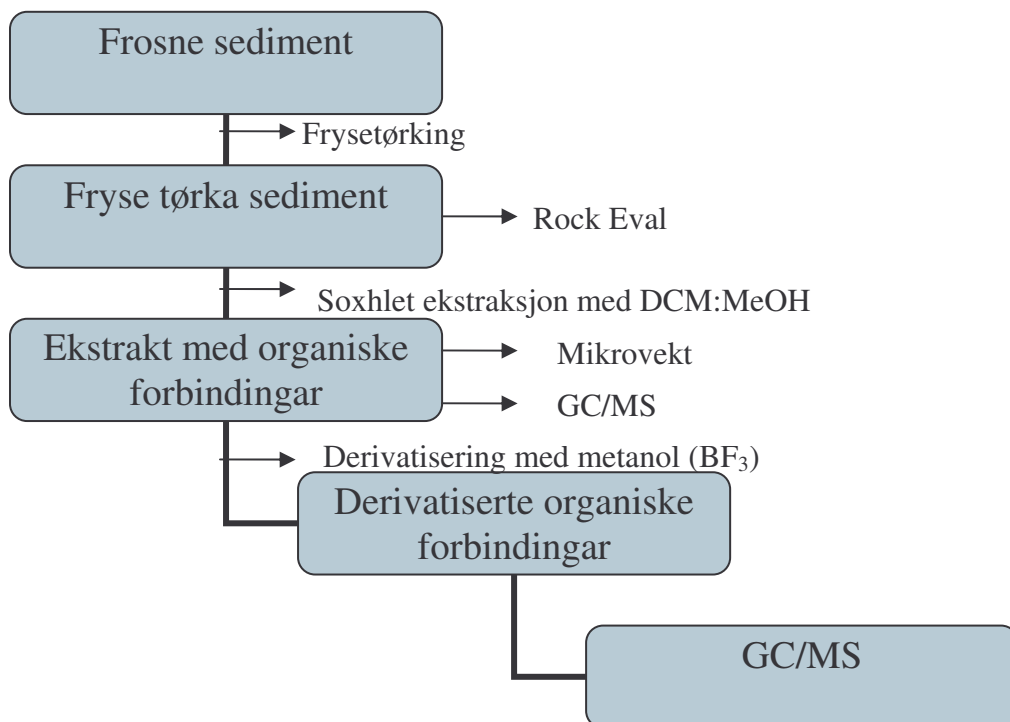
Figur 10: Flytdiagram for Soxhlet ekstraksjon av tørka sediment.



Figur 11: Flytdiagram for Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment.

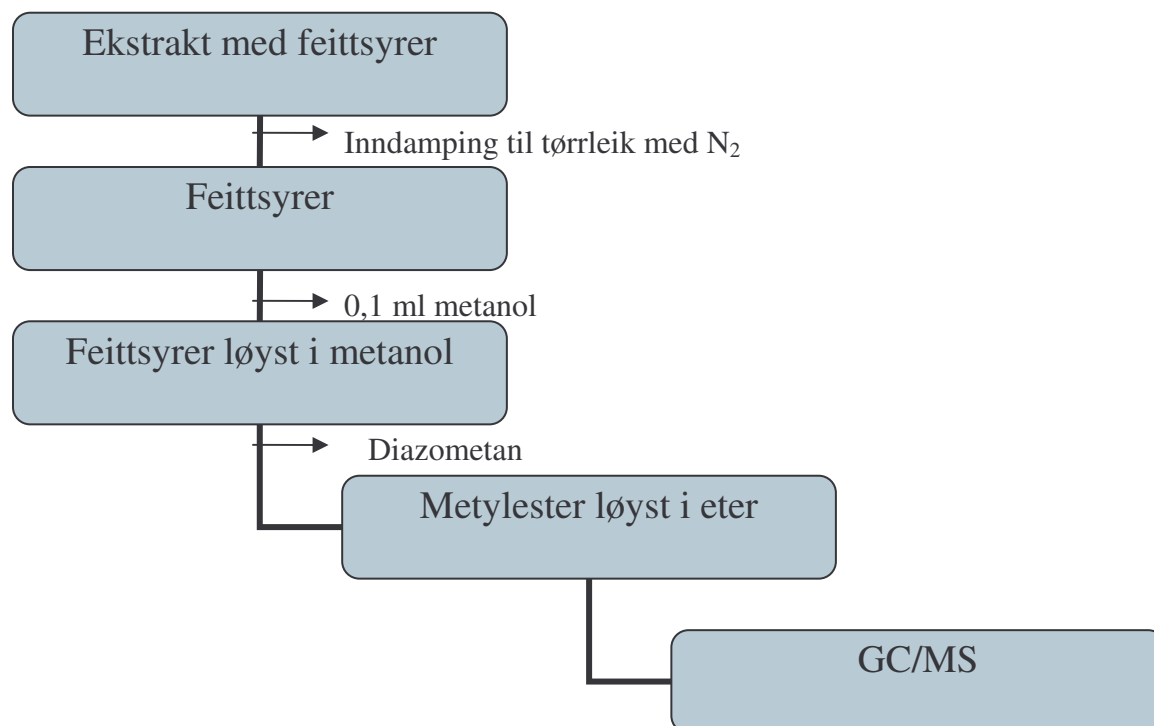


Figur 12: Flytdiagram for Soxhlet ekstraksjon av syrebehandla sediment.



Figur 13: Flytdiagram for Soxhlet ekstraksjon av frysetørka sediment.

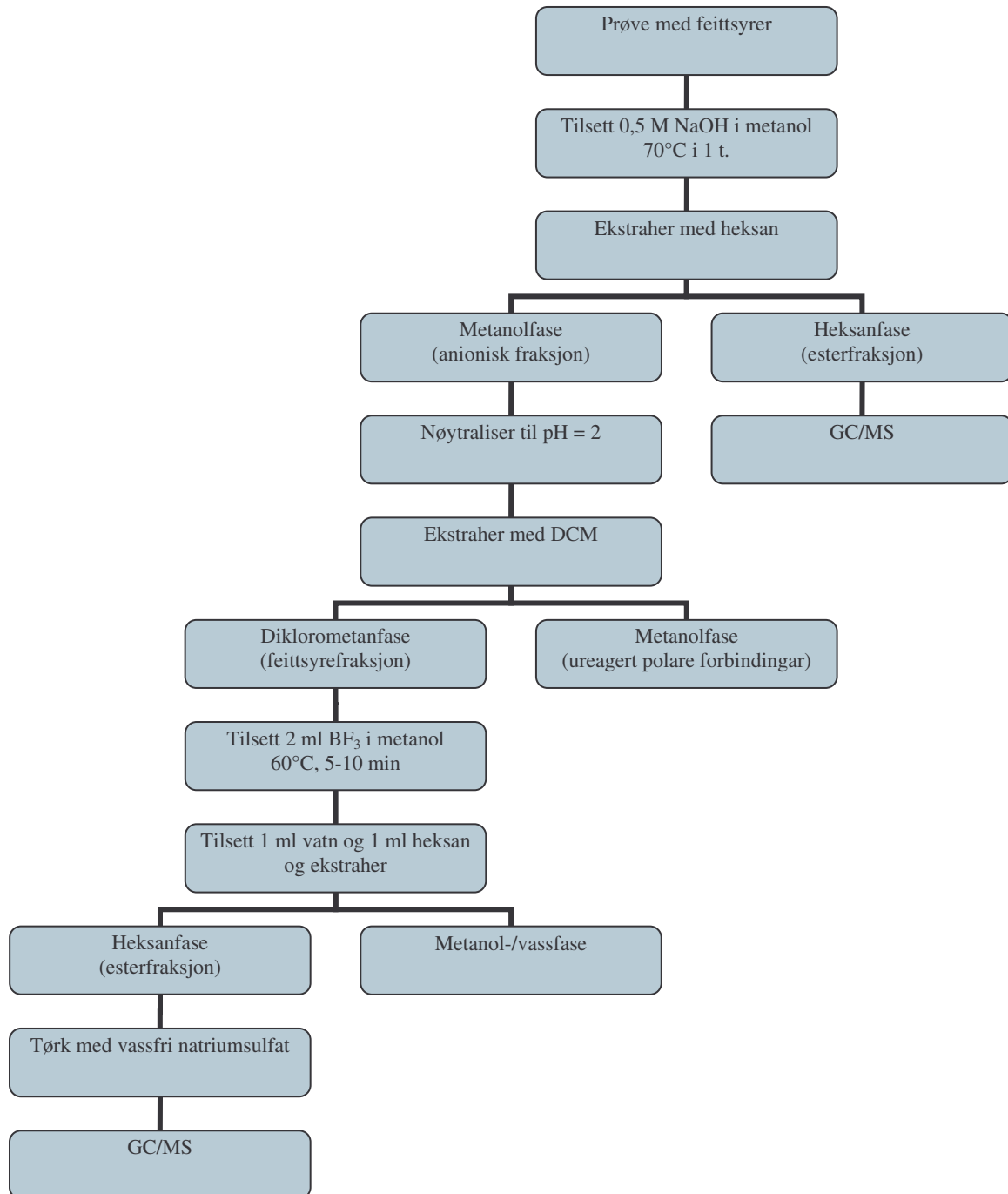
### 2.2.2 Flytdiagram for derivatisering med diazometan



Figur 14: Flytdiagram for derivatisering med diazometan.

### 2.2.3 Flytdiagram for hydrolyse og derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ )

Derivatisering av modellforbindingane blei utført med ei hydrolyse før  $\text{BF}_3$  i metanol blei tilsett. Derivatisering av sediment ekstraktene blei utført utan hydrolyse.



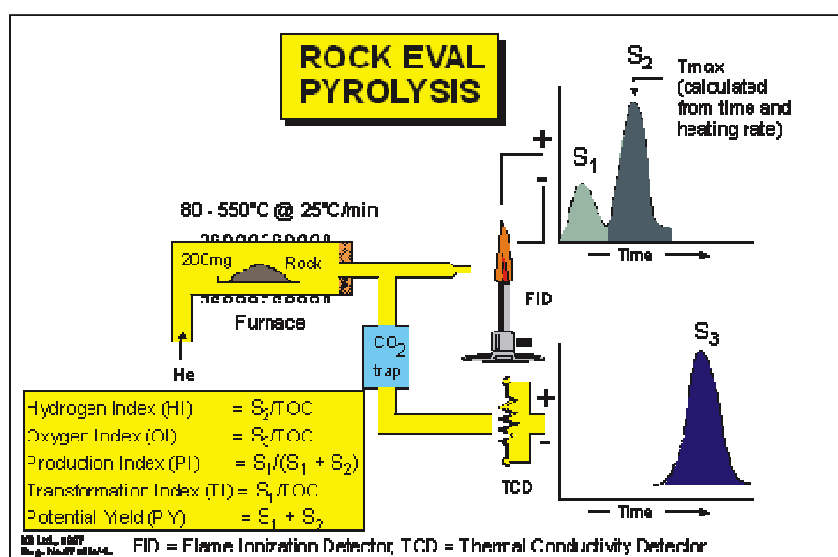
Figur 15: Flytdiagram for hydrolyse og derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ).

## 2.3 Rock Eval analyse

### Prinsipp:

Rock Eval pyrolyse kan fortelje modningsgraden av kjeldebergartar og kva type organisk materiale sediment består av. Ved Rock Eval pyrolyse blir prøva forbrent i ein pyrolyseomn ved oppvarming og det blir mogleg å måle mengd HC-gass som dannast. Dette skjer i ei inert atmosfære (helium). På denne måten kan ein kvantitativt og selektivt finne ut:

- mengd av frie hydrokarbon.
- forbindingar som inneheld hydrokarbon- og oksygen som blir flyktig i løpet av cracking av det organiske materie som ikkje er mogleg å ekstrahere ut (kerogen).



Figur 16: Skisse av Rock Eval pyrolyse og korleis parameterane blir målt (<http://www.igiltd.com>)

Temperaturprogrammet i pyrolyseomnen er som følgjer:

I 3 min blir omnen haldt isothermisk på 300°C og dei frie hydrokarbona blir fordampa og målt som  $S_1$  topp. Temperaturen blir så auka frå 300°C til 550°C. I denne fasen blir dei svært tunge hydrokarbona (>C<sub>40</sub>) og det ikkje-flyktige organiske materie analysert og målt som  $S_2$  topp. Temperaturen der  $S_2$  når sitt maksimum er avhengig av samansetninga og modenskap av kerogen og blir kalla  $T_{max}$ . CO<sub>2</sub> som blir avgitt frå kerogen cracking blir fanga frå 300-390°C. Dette blir målt og gir  $S_3$  toppen.

- $S_1$  (mg/g) = mengd av frie hydrokarbonar i prøva i mg/g
- $S_2$  (mg/g) = mengd av hydrokarbon som blir generert ved termisk cracking av ikkje-flyktige organisk materiale.
- $S_3$  (mg CO<sub>2</sub>/g rock) = mengd av CO<sub>2</sub> som blir produsert i løpet av pyrolyse av kerogen.
- $T_{\max}$  (°C) = temperaturen der det avgis mest hydrokarbonar frå cracking av kerogen i pyrolysen.
- TOC (%) = Totalt organisk karbon

Ved å analysere sedimenta med Rock Eval kan ein rekne ut omtrentlege mengder sediment ein vil trenge til Soxhlet ekstraksjon. Tabell 1 viser anbefalte mengder sediment ein bør vege inn for å få gode konsentrasjonar av organisk material i ekstrakta.

| S1 (mg/g) | Sediment           |
|-----------|--------------------|
| < 0,5     | 20 gram eller meir |
| 0,5-1     | 20-15 gram         |
| 1-2       | 15-10 gram         |
| 2-3       | 10-5 gram          |

Tabell 1: Omtrentleg gram sediment som skal vegast inn til Soxhlet ekstraksjon, berekna ut i frå  $S_1$  (Weiss, Wilhelms et al. 2000).

Analysane blei utført på Forskningscenteret til StatoilHydro på Sandsli.

Forbehandling for dei ulike prøvene:

- Dei tørka prøvene vart pulverisert.
- Dei frosne prøvene vart tint, tørka i eksikator og pulverisert.
- Dei ekstraherte prøvene vart lagt i avtrekkskap etter ekstraksjonen til løysingsmiddelet var dampa av.
- Botnfallet etter Soxhlet vart pulverisert.

For at prøvene skulle kunne kjørast på Rock Eval måtte dei vere grundig tørka og pulverisert i morter. Det vart vegd inn 50-100 mg i kvar patron.

Utstyr:

Rock Eval analyse instrument

Morter

Kjemikalium:

Sediment

## **2.4 Prosedyre for å finne vektprosent vatn i frose sediment**

Det vart vegd inn 3-8 gram av det frose sedimentet i eit begerglas som var vegd på førehand. Begerglaset vart sett i varmeskåp til prøva var tørr. Begerglaset med innhald vart vegd og vektprosent vatn i sedimentet kunne bli rekna ut.

## **2.5 Soxhlet ekstraksjon**

### Prinsipp:

Meininga med Soxhlet ekstraksjon er å ekstrahere ut løyseleg organisk materiale frå sedimentprøver for gjenvinne løyselege organiske bindingar til vidare analyse. En Soxhlet ekstraksjon er grundig, og ein ekstraherer kontinuerlig ved å la apparaturen stå i opptil fleire timar.

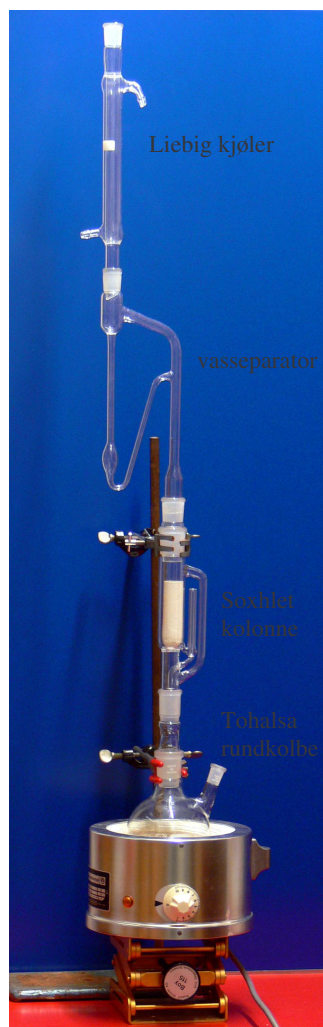
### **2.5.1 Standard Soxhlet ekstraksjon**

Det vart prøvd ulike behandlingar av sedimentprøvene for å optimalisere metoden. Under følgjar en standard prosedyre for Soxhlet ekstraksjon av sedimentprøvene. For spesifikk prosedyre for kvar enkelt behandling sjå kap 2.5.2 - 2.5.5.

### Prosedyre:

Sidan det var lite organisk materiale i prøvene, var det gjennom heile forsøket spesielt viktig å unngå forureining ved å jobbe på reine flater og bruke hanskar når ein behandla sedimentet. Vaska alle flater med 93% diklorometan/7% metanol før sedimenta var i kontakt med dei.

Soxhlet apparaturet ble satt opp som vist på Figur 17 og vasket tre gangar med 93% diklorometan/7% metanol. Dette er ei azeotrop blanding, det vil sei ei blanding av to eller fleire reine kjemikalium i slike blandingsforhold at samansetjinga ikkje kan bli endra ved enkel destillering. Det er viktig at både Soxhlethylsa og bomull til å legge over sedimentet også blei vasket. Vasseparator var berre nødvendig om ein jobba med våte sediment.



Figur 17: Oppsett av Soxhlet apparatur med vasseparator.

Om ein har kjørt Rock Eval på sedimenta kan mengd prøve ein skal vege inn til Soxhlet bereknast frå  $S_1$  verdiane (Tabell 1)

Sedimentprøvene frå dei hydrotermale felta hadde  $S_1$  verdier som var under 0,5. Over 20 gram prøve er då tilrådd. Sedimentet blei knust ein morter og overført til den vaska Soxhlethylsa som var tørka og vegd på førehand. Soxhlethylsa blei vegd igjen og den vaska bomulla blei lagt oppå sedimentet som lokk før den blei lagt tilbake i Soxhletkolonna. Apparaturet blei sett opp igjen, og omtrent 350 ml 93% diklorometan/7% metanol vart tilført i rundkolben saman med kokstein. Sedimentet blei destillert slik i minst 24 timar. Vart det vegd inn svært store mengder av sediment, kunne det være nødvendig å ekstrahere i 48 timar. Ved bruk av vasseparator, måtte ein ekstrahere i 24 timar etter at separatoren ikkje skilte ut vatn.



Etter ekstraksjonen vart ekstraktet overført kvantitativt til ein rotavapor kolbe og dampa inn til nokon få ml. Ei pipette blei fylt med litt av den vaska bomulla frå Soxhlet ekstraksjonen og ekstraktet blei filtrert gjennom den og over i eit prøveglas. Det vart vaska med 3 x 2 ml DCM:MeOH (93:3). Ekstraktet vart dampa inn til omtrent 1 ml. Konsentrasjonen vart bestemt ved mikrovekt. Ekstraktet vart så overført til eit GC-glas og analysert på GC/MS.

Utstyr:

500 ml tohalsa rundkolbe

200 ml Soxhletkolonne

Liebig reflukser

Varmeplate for rundkolbar

Kokstein

Regulerbart stativ

Kjemikalium:

Tørka sediment

93% diklorometan/7% metanol

### **2.5.2 Tørka sediment**

Det tørka sedimentet trengte ingen spesiell behandling.

### **2.5.3 Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment**

Det var svært mykje vatn i dei frosne prøvene. Det blei likevel forsøkt å ekstrahere dei direkte utan tørking.

Prosedyre:

Banka av ein klump av det frosne sedimentet på minst 50 gram og tinte det. Knuste det i ein mortar til ein tynn graut og overført til den vaska Soxhlethylsa som var tørka og vegd på førehand. Sedimentet blei destillert i 24 timar etter at det ikkje var meir vatn som blei skilt ut. Vasseparatoren måtte tømmast ein til to gongar i døgnet fordi den var full. Denne ekstraksjonen er svært tidkrevjande og kan ta over ei veke.

Det kunne framleis være små mengder med vatn i ekstraktet. I staden for at ekstraktet blei filtrert med bomull, blei det laga ei kolonne for å tørke ekstraktet. Det ble dytta ein liten bit med bomull nedi ei eingangs pipette for å plugge den. Deretter blei den fylt med vassfri natriumsulfat. Kolonna ble vaska med noen ml DCM:MeOH (93:7). Ekstraktet blei kjørt

gjennom kolonna og deretter vasket med 3x2 ml DCM:MeOH (93:7). Ekstraktet blei så dampa inn på nitrogenblås til det berre var nokon dråpar igjen. Dette vart overført kvantitativt til eit innlegg i eit GC glas og analysert på GC/MS.

#### **2.5.4 Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment forbehandla med saltsyre**

##### Prosedyre:

Tinte minst 100 gram frosne sediment. Den konsentrerte saltsyra blei fortynna til 2,5 M. 100 ml 2,5 M saltsyre blei tilsett det våte sedimentet. Løysinga begynte å boble og ein del av sedimentet løyste seg. Løysinga stod i ein time før den blei sentrifugert og syreløysinga blei pipetert frå botnfallet. Botnfallet blei skylt med destillert vatn og sentrifugert enda ein gang. Dette vart gjentatt til pH i skyljevotnet var nesten nøytral.

Sidan sedimenta ikkje var tørre blei dei ekstrahert med Soxhlet ekstraksjon med vasseparator. Ekstraksjonen vart stoppa 24 timar etter vasseparatoren ikkje lenger skilte ut vatn.

Vasseparatoren måtte tømmast ein til to gongar i døgnet fordi den var full. Det vart etterfylt løysemiddel om mengda minka i rundkolben, sidan det er viktig at den ikkje blei tørr.

Etter ekstraksjonen blei ekstraktet behandla på same måte som vått sediment (kap 2.5.3 avsnitt 3).

##### Utstyr:

Sentrifuge

##### Kjemikalium:

37% HCl

#### **2.5.5 Soxhlet ekstraksjon av frysetørka vått sediment**

Sidan det var tidkrevjande og større fare for forureining å jobbe med våte sediment, så var det ønskeleg å finne ein metode som tørka prøvene på ein skånsam måte som ikkje forandra det organiske materialet. Det vart då prøvd ein metode som heite frysetørking. Ved frysetørking blir sedimentet fryst for så å redusere trykket rundt prøva og tilføre nok varme til at det frosne vatnet fordampar direkte frå is til gass.

Frysetørkinga vart utført på Molekylærbiologisk institutt ved Høgteknologisenteret i Bergen.

Prosedyre:

Dei frosne sedimenta vart tint og knust til blandinga var flytande. Deretter vart blandinga helt over i 50 ml prøverør av plast som passa til sentrifuga i frysetørkaren. Prøverøra vart satt i sentrifuga i frysetørkaren og tørka i minst 48 timar. Når sedimenta var fri for iskrystallar var tørkinga ferdig. Sedimenta vart oppbevart i  $-20^{\circ}\text{C}$  til dei skulle ekstraherast.

Sedimentet vart tint opp før frysetørring for at det då var enklare å behandle. Det kan være at opptining av sedimenta kan forandre det organiske materialet. Dette kan undersøkast ved å frystørre ein gang utan å tine opp sedimentet.

Vidare følgjar standard prosedyre for Soxhlet ekstraksjon.

Utstyr:

Frysetørkar

Prøverør

## **2.6 Mikrovekt**

Prinsipp:

Mikrovekt er ein gravimetrisk målemetode (Skoog, West et al. 1996) som bestemmer massen til forbindingar som ikkje er flyktige i løysinga.

Prosedyre:

Det vart tatt ut 5  $\mu\text{l}$  av ei sprøyte som var grundig vaska med løysemiddelet i ekstraktet. Dette vart overført på mikrovekta. Etter 20 min, då alt løysemiddelet var fordampa, vart vekta av ikkje-flyktige forbindingar lest av.

Berekning av stoff mengde:

Ved berekning av stoffmengda i løysinga, må ein ta omsyn til tettleiken av løysinga. Sidan det som oftast er svært små konsentrasjonar av forbindingar som ikkje er flyktige i løysinga, går ein ut frå at tettleiken er den same som for løysemiddelet. Ulike tettleikar kan ein finne i

(Weast 1975-1976). Ein kan rekne ut mengde ikkje-flyktige forbindingar i løysinga ut frå Formel 2.

$$m_T = \frac{1000 \cdot m_E \cdot m_M}{V_s \cdot \rho_L}$$

**Formel 2: Formel for utrekning av mengde ikkje-flyktige forbindingar i løysinga.**

$m_T$  = stoffmengde totalt i mg

$m_E$  = massen av total ekstraktmengde

$m_M$  = stoffmengde lest av på mikrovækt

$V_s$  = volum av sprøyte i mikroliter ( $\mu\text{l}$ )

$\rho_L$  = tetthet til løysinga

## 2.7 Forsåping

### Prinsipp:

Sidan det var problem med å få ut nok mengde organisk materiale ved Soxhlet ekstraksjon, var det av interesse å prøve ut andre metodar som kanskje gav betre resultat. Ved forsåping så blir sedimentet refluksert i ei blanding av metanol og kaliumhydroksid. Sidan Rock Eval viste at det var ein del hydrokarbon som ikkje var frie, så var tanken at ein del av desse hydrokarbonane kunne løyse seg ved høg pH.

### Prosedyre :

Omtrent 50 gram sediment blei vegd inn i ein 250 ml einhalsa rundkolbe. Metanol (100 ml), kaliumhydroksid (3 g) og nokon koksteina vart tilsett saman med 1,0 ml av ei løysing som innehaldt ca. 1,0 µg/ml av den interne standarden bifenyld<sub>10</sub>. Blandinga blei deretter refluksert i 1,5 t. Det var vanskelig å unngå støytoking, sidan det var så masse finkorna sediment i løysinga.

Sedimentet vart filtrert frå metanolløysinga under vakuum. Ekstraktet med dei oppløyste hydrokarbona vart ekstrahert med heksan (2 x 25 ml) i ei 250 ml skiljetrakt. Ekstrakta blei kombinert og totalvolumet blei redusert til ca 0,5 ml ved hjelp av rotavapor.

Ekstrakta blei reinsa opp ved hjelp av kolonnekromatografi med Bond Elut fast fase ekstraksjonskolonner med 500 mg silika. Den oppkonsentrerte prøva blei kvantitativt overført til kolonna og hydrokarbona blei eluert med 3 x 2 ml heksan og deretter med 2 x 2 ml diklorometan.

Til slutt blei eluatet oppkonsentrert til ca 1 ml ved hjelp av rotavapor og overført kvantitativt til eit GC-glas. Analyse av eluatet blei utført med GC/MS (Mannvik, Wasbotten et al. 2005)

### Utstyr:

500 ml tohalsa rundkolbe  
200 ml Soxhletkolonne  
Liebig reflukser  
Varmeplate for rundkolbar

### Kjemikalium:

Tørka sediment  
93% diklorometan/7% metanol  
Bifenyld<sub>10</sub>

## 2.8 Syrebehandling

### Prinsipp:

Fordi resultatene frå Rock Eval viste at sediment prøvene frå dei hydrotermale felt hadde lågt innhald av organisk materiale, var det av interesse å prøve å oppkonsentrere organisk materialet i sedimentet før det vart vegd inn til Soxhlet ekstraksjon. Sidan sedimenta bestod av ein del Fe-oksyhydroksid (meir enn 50 wt%) og Al-oksyhydroksid (Kruber 2007) så skal dette kunne løysast om pH blir låg nok. Delar av det uorganiske materiale kan då fjernast ved filtrering, medan det organiske materialet vil framleis være i sedimentet.

### 2.8.1 Frose sediment behandla med saltsyre og lut

#### Prosedyre:

Vog inn omtrent 100 gram sediment i eit 1000 ml begerglas. Tilsatt 37% saltsyre til løysinga slutta å boble, det tilsvarte omtrent 100 ml. Det oppstod da ein oransje gel som ikkje var mogleg å filtrere.

Sentrifugert geleen og pipeterte ut syreløysinga. Skylte den resterande geleen med destillert vatn og sentrifugerte det igjen og pipeterte det av. Utførte dette tre gongar til geleen var lys gul. Etter at geleen var skylt med destillert vatn vart det tilsett 25 ml 1 M NaOH. Geleen løyste seg og løysinga vart brun. Løysinga vart sentrifugert igjen og eit brunt botnfal låg att på botn. Dette vart lagt på eit vegd papir og tørka i eksikator.

Botnfallet med papir vart så vegd igjen og utbytte vart utrekna. Botnfallet vart så overført til eit 7 ml prøveglas og knust så godt som råd med ein spatel før det vart tilført 5 ml DCM:MeOH (93:7). Løysinga blei godt blanda i 10 min på ultralyd. Botnfallet vart filtrert frå ved å pipeterte løysinga gjennom ei eingangspipette fylt med glasull. Ekstraktet vart dampa inn til 1 ml og overført til eit GC-glas. Analyse av ekstraktet blei utført med GC/MS.

#### Utstyr:

100 gram frosne sediment  
1000 ml begerglas  
Sentrifuge

#### Kjemikalium:

1 M NaOH  
37% HCl  
Diklorometan/Metanol (93:7)

## 2.8.2 Test av løysingsevne til sedimentet i ulike syrer

### Innleiing:

Sedimentet danna ein gele ved behandling av konsentrert saltsyre og det vart ikkje opparbeid store nok mengder organisk materiale til analyse. Det va difor av interesse å opparbeide ei prosedyre der geleen ikkje blei danna.

### Prinsipp:

Undersøke om ulike syrer og konsentrasjonar for å finne dei beste vilkåra for oppløysing av sedimentet.

### Prosedyre:

Minst 10 gram av det tørre sedimentet vart knust til fint pulver i ein mortar. Omtrent 1 gram vart overført til 10 ulike begerglas.

Løysingsevna blei testa på desse syrene og konsentrasjonane.

|                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 12,08 M HCl                           | 0,58 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> |
| 5,07 M HCl                            | 0,06 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> |
| 0,51 M HCl                            | 1,13 M oksalsyre                      |
| 0,05 M HCl                            | 0,50 M oksalsyre                      |
| 5,78 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 0,05 M oksalsyre                      |

Det vart tilsett 40 ml av kvar syreløysing i kvart begerglas med sediment.

Noterte reaksjonen umiddelbart, etter 30 min og etter 1 døgn etter at syra var tilsatt.

Dei løysningane som var løyst såpass at dei lot seg filtrere, blei filtrert på eit vegd filterpapir og tørka i eksikator. Filterpapir og botnfall vart vegd på nytt og mengd av sediment som var løyst blei rekna ut.

### 2.8.3 Syrebehandling av frose sediment med oksalsyre

#### Prosedyre:

Tinte omtrent 50 gram frose sediment og finknuste det i ein mortar. Blandinga var no ein tynn graut. Det blei tilsatt 0,5 liter 1,13 M oksalsyre. Lot det stå til nesten alt var oppløyst og det var mindre enn 1 gram botnfall. Rørte med jamne mellomrom. Tilsatt meir syre om alt ikkje var oppløyst. Deretter vart løysinga filtrert med vakuu gjennom eit vegd filterpapir og skylt godt med destillert vatn.

For å sjekke om det var hydrokarbonar i filtrate vart det ekstrahert med DCM:MeOH (93:7). Ekstraktet vart dampa inn til 1 ml på rotavapor, overført til eit GC-glas og analysert på GC/MS.

Botnfallet med papir vart så vegd igjen og utbytte vart utrekna. Botnfallet vart så overført til eit 7 ml prøveglas og knust så godt som råd med ein spatel før det vart tilført 5 ml DCM:MeOH (93:7). Løysinga blei godt blanda i 10 min på ultralyd. Botnfallet vart filtrert frå ved å pipettere løysinga gjennom ei eingangspipette fylt med glasull. Ekstraktet vart dampa inn til 1 ml og overført til eit GC-glas. Analyse av ekstraktet blei utført med GC/MS.

## 2.9 Derivatisering

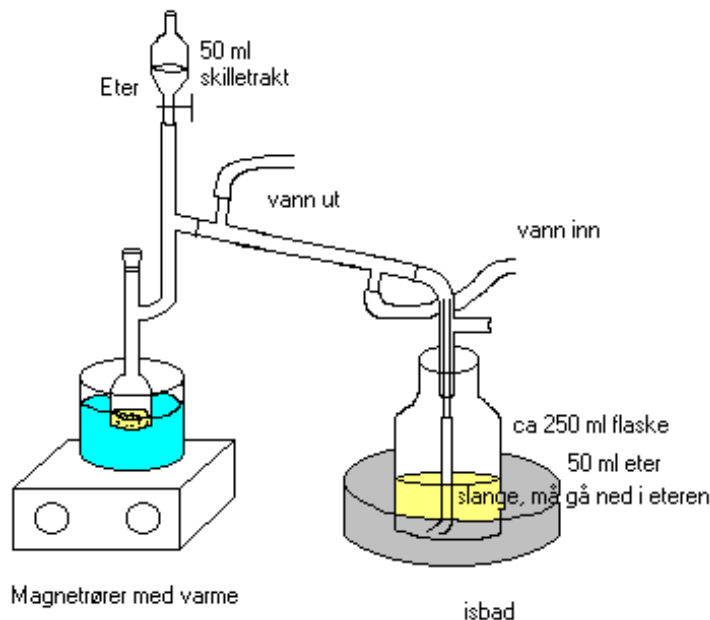
#### Prinsipp:

Ekstrakta viste seg å innehalde ein del polare forbindingar som feittsyrer som var nødvendig å derivatisere. Feittsyrer er lite egna til å analysere på GC/MS fordi dei har høge kokepunkt og kan dekomponerer gjennom kolonna. Når ein derivatiserar om omdannar ein polare forbindingar til termostabile forbindingar som ikkje dekomponerer i kolonna. Begge dei metodane som er brukt i oppgåva omdannar feittsyrene til metylester.



## 2.9.1 Derivatisering med diazometan

### Tillaging av diazometan:



Figur 18: Oppsett av apparatur brukt til tillaging av diazometan (Sepp, Scherer et al. 1974 ).

### Prosedyre:

Apparaturen ble montert som på Figur 18. 50 ml dietyleter ble tilsatt i skiljetrakta og 50 ml dietyleter ble tilsatt i mottakarkolbe. Viktig at slangen gikk ned i dietyleteren i mottakarkolben og at det var nok is rundt. Alle reagensane vart tilsett i rekkjefølgja på kjemikaliumlista. Kolben ble varma opp på vassbad under omrøring. Løysinga blei gul av diazometan og begynte å skumme. Etter at ein del væske var destillert over (ca. 20 ml) og løysinga i mottakarkolben og var blitt gul, vart det tilsatt dietyleter frå skiljetrakta for å halde volumet konstant. Fortsette destillasjonen til gulfargen i destillatet opphørte (ca. 1 time). Vanskeleg å sjå fargen på destillatet sidan det skumma mykje og det la seg eit mørkbrunt skum belegg langs kanten.

Dette gav omtrent 120-130 ml løysing. Satt den i frysaren og korka godt igjen for at den skulle halde seg lengst mogleg. Diazometanen kunne brukast så lenge løysinga var gul.

Derivatisering av prøve:

Ekstraktet vart dampa inn til tørrleik med nitrogen. Deretter vart det løyst i 0,1 ml metanol. Diazometan vart tilsett til løysinga slutta og boble og løysinga vart svak gul. Dette stod i omtrent i ½ time før det vart dampa inn til omtrent 1 ml.

Løysinga vart overført til eit vegd GC-glas, og innhaldet vart vegd før det blei analysert på GC/MS.

Utstyr:

50 ml skiljetrakt

Destillasjons flatkolbe

250 ml flaske

Liebig reflukser

Varmeplate

Slangar

Kjemikalium:

16 g KOH

9,6 g Kloroform

40+50+50 ml Eter

0,04 g 18-krom-6-eter

2,4 g Hydrasinhydrat (85%)

## 2.9.2 Test av hydrolyse og derivatisering av modellforbinding

Prosedyre:

Det blei vegd inn 5 mg av kvar modellforbinding i kvar sitt prøveglas. Deretter vart det tilsatt 5 ml DCM:MeOH (93:7) i begge prøveglasa for å løyse forbindingane. 1 ml av løysinga blei overført til eit GC-glas og analysert på GC/MS.

I resten av løysinga i prøveglasa vart det tilsett 1 ml 0,5 M NaOH før det vart sett i eit varmeskap på 70°C i 1 t. Etter at løysingane var avkjølt blei dei nøytralisert med konsentrert syre (HCl) til pH=2-3 (nokon få dråpar). Deretter vart den ekstrahert med 5 x 3 ml diklorometan. Diklorometanfasen vart deretter tørka med vassfri natriumsulfat. Det blei tilsett natriumsulfat til den ikkje klumpa seg lenger. Lot løysinga stå å tørke i 1 time. Deretter vart løysingane pipetert kvantitativt over i nye prøveglas utan at natriumsulfatet følgde med. Konsentrasjonen blei berekna på mikrovækt. Konsentrasjonen måtte være rundt 1 mg/ml for å analyserast på GC/MS. Om den var det vart den overført til eit GC-glas og analysert på GC/MS. Viss den ikkje var det, så vart løysinga oppkonsentrert ved å dampe av løysemiddel på nitrogenblås eller fortynne den med løysemiddelet.

Modellforbindingar:

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | 99% |
| Glyceryl tristearate                        | 99% |

Andre kjemikalium:

Diazometan

0,5 M NaOH

Diklorometan

Vassfri natriumsulfat

**2.9.3 Hydrolyse og derivatisering med metanol (BF<sub>3</sub>)**Prosedyre:

- Av triglyserid vart det vege inn 5 mg i eit 7 ml prøveglas.
- Av olivenolje vart det vege inn ein dråpe i eit 7 ml prøveglas.
- Av ekstraktet frå sedimenta, vart det tatt ut så mange ml over i eit 7 ml prøveglas, at det tilsvarte 1-5 mg organisk materiale.

*Gjeld berre olivenolje og triglyserid:*

Løys prøva i 5 ml DCM:MeOH (93:7) og 1 ml av dette vart overført til eit GC-glas og analysert på GC/MS.

*Gjelder alle prøvene:*

Hydrolyse:

Prøva vart dampa inn til tørrleik under nitrogen. Det vart tilsett 1 ml 0,5 M NaOH i metanol. Løysinga vart sett i varmeskåp på 70°C ein time. Viktig å passe på at korka var godt skrudd igjen så ikkje metanolen fordampa. Løysinga vart ekstrahert med 3 x 2 ml heksan over i eit nytt 7 ml prøveglas. Heksanfasen (esterfraksjon) vart dampa inn til 1 ml ved nitrogenblås og kjørt på GC/MS.

Derivatisering:

Metanolfasen (anionisk fraksjon) vart nøytralisert til pH = 2 med 1 M HCl. Løysingar vart så ekstrahert med 3 x 2 ml diklorometan over i eit nytt 7 ml prøveglas. Diklorometan blei dampa

av og det vart tilsett 2 ml  $\text{BF}_3$  i metanol. Prøveglaset vart korka godt igjen og satt i varmeskåp på  $60^\circ\text{C}$  i 5-10 min. Løysinga vart avkjølt og 1 ml vatn og 1 ml heksan blei tilsett og rista godt. Det er avgjerande at metylestera løyser seg i det upolare løysingsmiddelet. Den øvre organiske heksanfasen vart overført til eit nytt 7 ml prøveglas. Deretter vart det tilsett vassfri natriumsulfat for å tørke løysinga. Heksanfasen vart overført til eit GC glas og analysert på GC/MS (Morrison and Smith 1964).

Utstyr:

7 ml prøveglas

Kjemikalium:

$\text{BF}_3$  i metanol

Destillert vatn

Heksan

Vassfri natriumsulfat

Prøve med feittsyrer (ekstrakt, olivenolje eller triglyserid)

## ***2.10 Gasskromatografi/ massespektrometri (GC/MS)***

Prinsipp:

Gasskromatografi er ein effektiv metode å separere komplekse blandingar. Den eignar seg difor godt til å analysere ekstrakt frå sediment prøver som inneheld svært mange ulike organiske stoff. Forutsetninga for å kunne analysere forbindingar på GC er at dei har eit tilstrekkeleg damptrykk og er termostabile i det aktuelle temperaturområdet. Desse krava er ofte tilfredstilt for organiske forbindingar. Forbindingane separerast med omsyn på kokepunkt og/eller polaritet, avhengig av kva slags kolonnetype som nyttast. Forbindingane kan bli identifisert ved å samanlikne retensjonstider med standardar eller ved å bruke massespektrometeret (MS). Eit massespektrometer er den mest generelle og mest informative detektoren til GC. GC kobla til eit massespektrometer gjer det mogleg å ta ut spekter av kvar enkelt forbinding i kromatogrammet. GC/MS er difor ein svært nøyaktig metode for identifikasjon av forbindingar i komplekse blandingar (Kemp 1991).

Stoffa blei identifisert ved hjelp av ein database som samanlikna MS-spektera med referansespekter frå NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>).

Blankprøver:

GC/MS er eit svært følsamt instrument og svært små konsentrasjonar blir registret og analysert. Det kan difor lett skje at ekstrakta blir forureina i tilstrekkelig grad av løysemiddel og andre ting den er i kontakt med til at det gir utslag på kromatogram og spekter. Det var viktig at det vart kjørt blankprøver på alle løysemiddel for å avsløre mulige forureiningar. Det var og kjørt blankprøve på DCM:MeOH (93:/7) blanda med bomull. Prosedyrane med derivatisering var og gjennomgått ein gang og analysert på GC/MS utan at prøve var tilsett.

Utstyr til GC/MS:

|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| Gasskromatograf: | Hewlett-Packard Auto 5890            |
| Kolonne:         | WCOT fused Silica (CP-Sil_8_CB), 25m |
| Detektor:        | Flammeionisasjonsdetektor            |

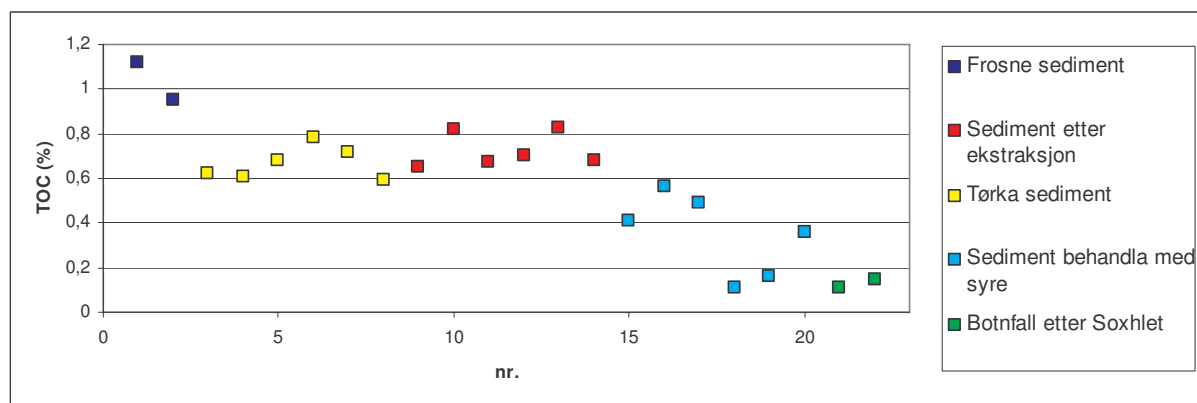
Instrumentelle vilkår:

|                            |                                                                   |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Injektor temperatur:       | 310°C                                                             |
| Detektor temperatur (FID): | 350°C                                                             |
| Detektor temperatur (MS):  | 280°C                                                             |
| Bæregass:                  | Helium                                                            |
| Temperaturprogram:         | 50°C, 1 min, 6°C/min → 300°C,<br>10 °C/min → 320°C, 320°C i 3 min |
| Injisert mengde:           | 1 µl                                                              |

### 3 RESULTAT

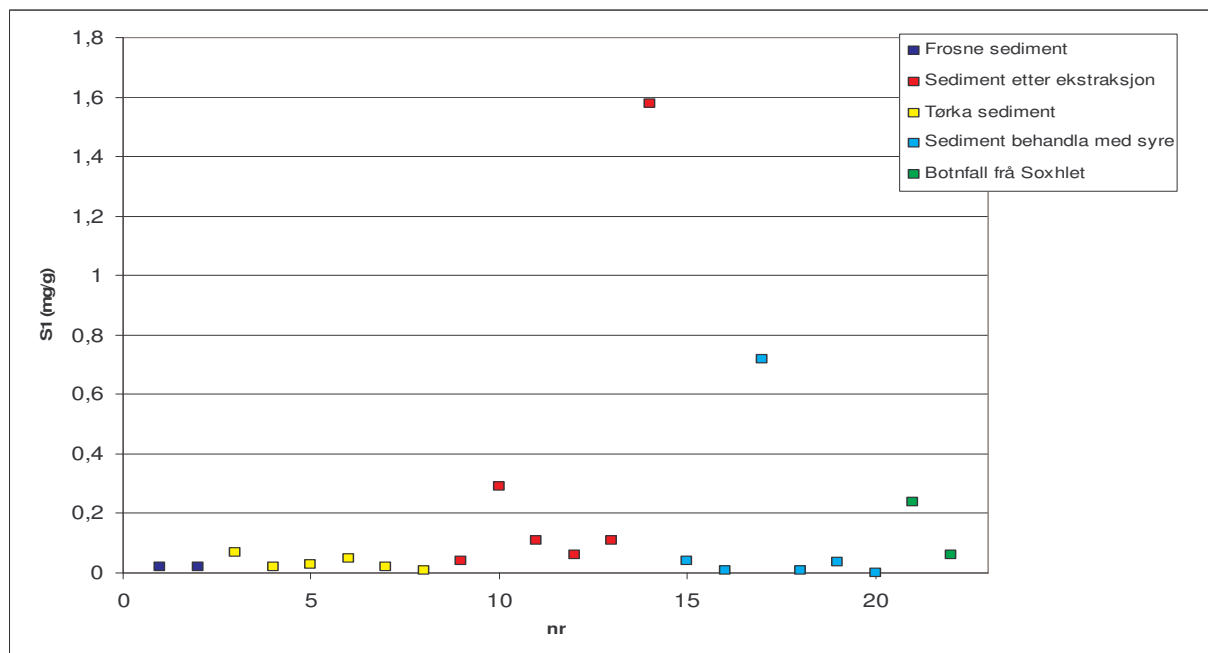
#### 3.1 Rock Eval

TOC resultatata frå Rock Eval analysane er illustrert ved Figur 19. TOC er totalt organisk karbon i sedimenta. Det er variasjonar innanfor dei ulike fargekoda kategoriane. Til dømes kva ekstraksjon som var utført (raud), og kva syre sedimenta vart behandla med (lyse blå). Nærmare informasjon om enkeltverdiar finn ein i appendiks B.



Figur 19: TOC resultat frå Rock Eval analyse.

S<sub>1</sub> resultatata frå Rock Eval analysane er illustrert ved Figur 20. S<sub>1</sub> er frie hydrokarbon i sedimenta i mg pr. gram.



Figur 20: S<sub>1</sub> resultat frå Rock Eval analyse.

Rock Eval analyse målar også fleire andre parametarar. Desse er tatt med i appendiks B.

### 3.2 Vektprosent vatn i frosne sediment

Tabell 2 syner utrekninga av vekt% vatn og vekt% sediment i frosne prøver. Det er tatt fem parallellar som er tørka i varmeskåp.

**Tabell 2: Utrekning av vekt% vatn og vekt% sediment i dei frosne sediment prøvene.**

| Forsøk serie           | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       |
|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Vekt av vått sediment  | 4,221 g | 2,958 g | 4,316 g | 8,096 g | 4,876 g |
| Vekt av tørka sediment | 0,288 g | 0,774 g | 0,385 g | 1,751 g | 0,918 g |
| Vekt% sediment         | 6,8 %   | 26,2 %  | 8,9 %   | 21,6 %  | 18,8 %  |
| Vekt% vatn             | 93,2 %  | 73,8 %  | 91,1 %  | 78,4 %  | 81,2 %  |

### 3.3 Soxhlet ekstraksjon

Tabell 3 viser ein oversikt over alle dei ulike ekstraksjonane som vart utført med sedimenta, korleis dei vart ekstrahert, kva sediment som var brukt og ei kort beskriving over kva resultat ekstraksjonen ga. Meir nøyaktig prosedyre om ekstraksjonsmetodar finn ein i kap. 2.5.

”Prøvenamn” er namnet som kvar enkelt prøve har fått, denne nemninga blir brukt i resten av oppgåva for å beskrive prøva. Prøvenamna er gitt nemninga frå 1t-8t og 1f-7f, der ”t” står for tørka sediment og ”f” står for frosne sediment. Nemninga ”tørka 1” og ”tørka 2” under kolonna ved namn sedimentprøve, vil seie at det var to ulike klumpar med sediment som var henta opp frå ulike stadar på havbotnen.

**Tabell 3: Oversikt over dei ulike ekstraksjonane som var utført.**

| Prøvenamn | Dato utført | Løsemiddel      | Forarbeid           | Type ekstraksjon | Tid   | Sedimentprøve | Innvegd sediment (g) |
|-----------|-------------|-----------------|---------------------|------------------|-------|---------------|----------------------|
| 1t        | 08.02.2007  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 24 t  | Tørka 1       | 9,428                |
| 2t        | 13.02.2007  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 24 t  | Tørka 1       | 11,561               |
| 3t        | 31.08.2007  | MeOH+KOH(s)     |                     | Reflux           | 1,5 t | Tørka 1       | 14,607               |
| 4t        | 06.09.2007  | MeOH+KOH(s)     |                     | Reflux           | 1,5 t | Tørka 1       | 13,939               |
| 5t        | 02.10.2007  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 48 t  | Tørka 1       | 43,232               |
| 6t        | 11.10.2007  | MeOH+KOH(s)     | Ekstr. med DCM:MeOH | Reflux           | 1,5 t | Tørka 1       | 43,232               |
| 1f        | 02.12.2007  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 9 d   | Frose 1       | 64,549               |
| 2f        | 12.12.2007  | DCM:MeOH (93:7) | Syrebehandla        | Soxhlet          | 7 d   | Frose 1       | 149,324              |
| 3f        | 08.01.2008  | DCM:MeOH (93:7) | Behandla med HCl    | Soxhlet          | 2 d   | Frose 1       | 85,675               |
| 4f        | 10.01.2008  | MeOH            | Ekstr. med DCM:MeOH | Soxhlet          | 2 d   | Frose 1       | -                    |
| 5f        | 15.02.2008  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 7 d   | Frose 1       | 152,477              |
| 7t        | 15.02.2008  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 2 d   | Tørka 2       | 25,298               |
| 6f        | 05.04.2008  | DCM:MeOH (93:7) | Frysetørka          | Soxhlet          | 24 t  | Frose 2       | 17,459               |
| 7f        | 06.04.2008  | DCM:MeOH (93:7) | Frysetørka          | Soxhlet          | 24 t  | Frose 2       | 15,055               |
| 8t        | 06.04.2008  | DCM:MeOH (93:7) |                     | Soxhlet          | 24 t  | Tørka 2       | 17,406               |

**Tabell 3(fort.): Oversikt over dei ulike ekstraksjonane som var utført.**

| Prøvenamn | Hydrokarbonar i ekstrakt (mg) | Resultat frå GC kromatogram                              | Kommentar                                  |
|-----------|-------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1t        |                               | Mange toppa                                              |                                            |
| 2t        |                               | Mange toppa                                              |                                            |
| 3t        |                               | Nesten ingen toppar                                      |                                            |
| 4t        | 0,2241                        | Nesten ingen toppar                                      |                                            |
| 5t        | 6,9978                        | Nokre toppa                                              | Prøva vart og derivatisert med diazometan  |
| 6t        |                               | Nesten ingen toppar                                      |                                            |
| 1f        |                               | Nesten ingen toppar                                      | Kokte inn under ekstraksjon                |
| 2f        |                               | Nesten ingen toppar                                      | Kokte inn under ekstraksjon                |
| 3f        | 6,0947                        | Mange toppa, den ekstr. med størst utslag                |                                            |
| 4f        |                               | Lite toppar                                              | Truleg ein del vatn i den opparbeida prøva |
| 5f        |                               | Ein del toppar                                           |                                            |
| 7t        |                               | Gode konsentrasjonar på dei lettaste stoffa              |                                            |
| 6f        | 3,2506                        | Ein del toppar, derivatisert inneholdt mange metyl ester | Prøva vart og derivatisert med MeOH        |
| 7f        | 2,6907                        | Ein del toppar, derivatisert inneholdt mange metyl ester | Prøva vart og derivatisert med MeOH        |
| 8t        | 3,4045                        | Gode konsentrasjonar på dei lettaste stoffa              | Prøva vart og derivatisert med MeOH        |



Det har blitt utført soxhlet ekstraksjonar på sediment som har fått fire ulike forbehandlingar.

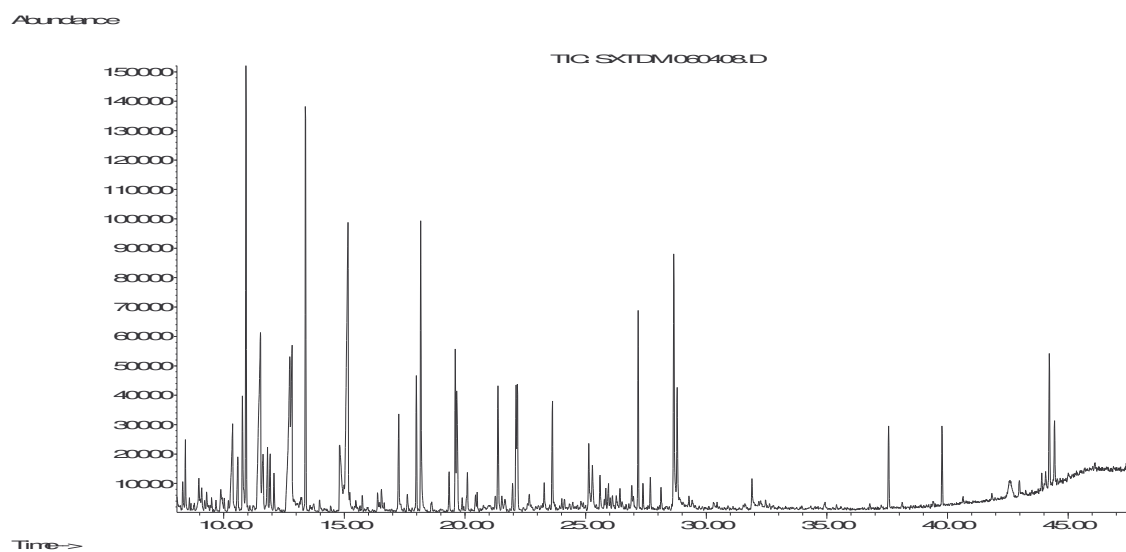
Soxhlet ekstraksjon av:

- Sediment som er lufttørka og oppbevart ved romtemperatur.
- Sediment som er fryst til  $-80^{\circ}\text{C}$  med ein gang dei er tatt opp av havbotn. Deretter tint og ekstrahert medan det er vått.
- Frose sediment som er delvis løyst i 2,4 M saltsyre deretter filtrert før ekstraksjon.
- Frose sediment som har blitt frysetørka før ekstraksjon.

Under er det tatt med eit gasskromatogram (Figur 21- Figur 24) for kvar av desse ekstraksjonane.

I tillegg er det tatt med ei oversikt over alle stoff som er identifisert ved hjelp av retensjonstider og spekter frå massespektrometri (Tabell 4- Tabell 6). Stoffa med utheva skrift er identifisert i fleire ekstrakt og har MS-spekter som er gode nok til å bestemme forbindinga med ganske stor sikkerheit. Intensiteten til stoffa er kor høgt utslag det gir i GC-kromatogrammet og det gir ein indikasjon på konsentrasjonen av stoffet i ekstraktet. I kolonna med toppar i MS spekteret, er dei viktigaste toppane i MS spekteret tatt med. Den største toppen er utheva. Det er brukt engelske namn i tabellane fordi det er dei som er oppgitt i databasen, og det gjer det lettare å finne referansespektera.

### 3.3.1 Soxhlet ekstraksjon av tørka sediment



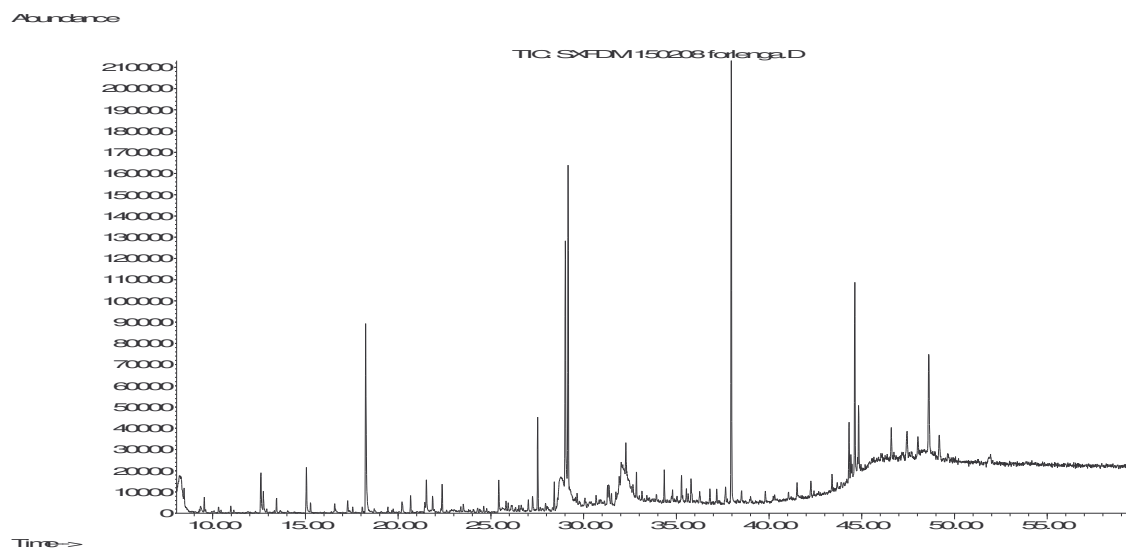
Figur 21: GC-kromatogram frå prøve 7f.

Tabell 4: Oversikt over identifiserte stoff i prøve 7f.

| Rt    | Stoff                              | Intensitet | Mm      | Formel                                         | Største topper i MS spekter             | Kommentar                             |
|-------|------------------------------------|------------|---------|------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| 8,41  | <b>Decane</b>                      | 22000      | 142,282 | C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>                | 142, 113, 98, 85, 71, <b>57</b>         |                                       |
| 10,37 | <b>Heptanoic acid</b>              | 29000      | 130,185 | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 101, 87, 73, <b>60</b>                  |                                       |
| 10,78 | <b>Phenol, 2-methoxy-</b>          | 38000      | 124,137 | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | 124, <b>109</b> , 81                    |                                       |
| 10,93 | <b>Undecane</b>                    | 147000     | 156,308 | C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>                | 156, 85, 71, <b>57</b>                  |                                       |
| 11,53 | <b>Hexanoic acid, 2-ethyl</b>      | 62000      | 144,211 | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 116, 101, 88, <b>73</b>                 |                                       |
| 11,94 | <b>Pentanoic acid, ethyl ester</b> | 19000      | 130,185 | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 103, 101, 85, 73, 60, <b>55</b>         |                                       |
| 12,74 | <b>Benzenecarboxylic acid</b>      | 50000      | 122,121 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | 122, <b>105</b> , 77                    |                                       |
| 12,83 | <b>Octanoic acid</b>               | 55100      | 144,211 | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 127, 115, 101, 73, <b>60</b>            |                                       |
| 13,39 | <b>Dodecane</b>                    | 137000     | 170,335 | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>                | 170, 85, 71, <b>57</b>                  |                                       |
| 14,81 | <b>Caprolactam</b>                 | 22000      | 113,158 | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO              | 113, 85, 84, 54, <b>55</b>              |                                       |
| 15,15 | <b>Nonanoic acid</b>               | 92000      | 158,238 | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | 158, 129, 115, 73, <b>60</b>            |                                       |
| 17,26 | <b>n-Decanoic acid</b>             | 32000      | 172,265 | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 172, 143, 129, 73, <b>60</b>            |                                       |
| 17,99 | <b>Tetradecane</b>                 | 44000      | 198,388 | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>                | 198, 85, 71, <b>57</b>                  |                                       |
| 18,17 | <b>Vanillin</b>                    | 93000      | 152,147 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | 152, <b>151</b> , 123, 109, 81          |                                       |
| 19,66 | ?                                  | 40000      | -       | -                                              | 236, 221, 180, 165, 137, <b>57</b>      |                                       |
| 21,37 | ?                                  | 40000      | -       | -                                              | 237, 196, 181, <b>153</b> , 73, 57      |                                       |
| 22,12 | <b>Nonadecane</b>                  | 41000      | -       | -                                              | 268, 85, 71, <b>57</b>                  |                                       |
| 23,29 | <b>Tridecanoic acid</b>            | 9300       | 214,344 | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> | 214, 171, 129, <b>73</b> , 60           |                                       |
| 23,63 | ?                                  | 34000      | -       | -                                              | 254, 239, 198, 183, 165, 153, <b>57</b> |                                       |
| 25,14 | <b>Tetradecanoic acid</b>          | 21000      | 228,371 | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> | 228, 185, 129, <b>73</b> , <b>60</b>    |                                       |
| 28,66 | <b>n-Hexadecanoic acid</b>         | 83000      | 256,424 | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | 256, 213, 129, <b>73</b> , 60, 55       |                                       |
| 39,78 | Squalene?                          | 26000      | -       | -                                              | 410, 395, 281, <b>57</b>                | Liknar, men spekteret er ufullstendig |
| 44,23 | ?                                  | 44000      | -       | -                                              | 394, 281, 253, 143, 135, ...            |                                       |
| 44,44 | Stigmastan-3,5-diene               | 21000      | -       | -                                              | 396, 381, 281, 255, 147..., 81,...      | Ikkje same stoff, men noko liknande.  |

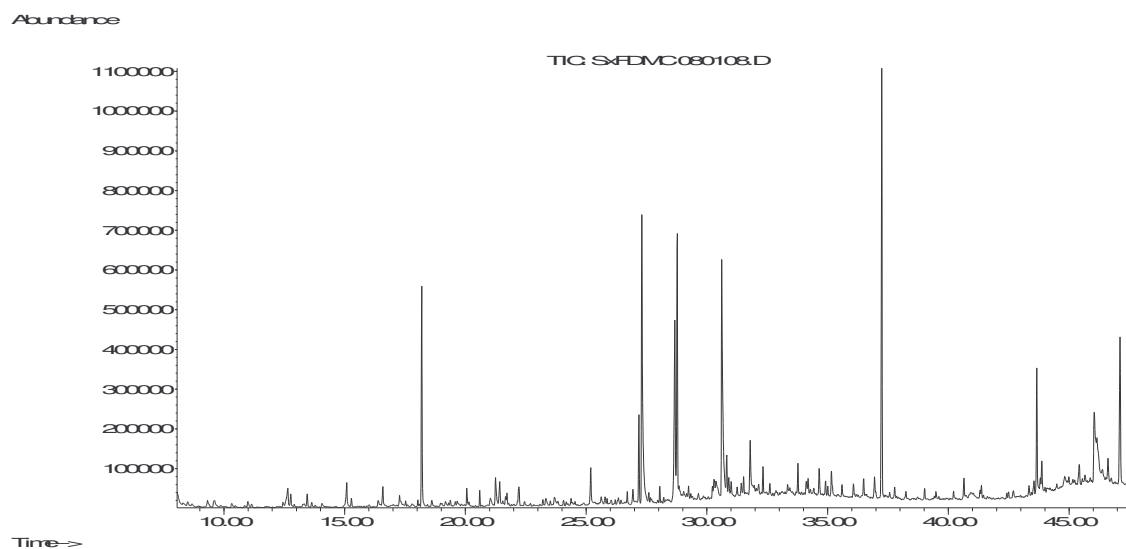
### 3.3.2 Soxhlet ekstraksjon av frose sediment

I GC-kromatogrammet i Figur 22 vart det brukt eit lengre program for å sjå om det var stoff som ikkje var kome ut av kolonna då programmet var slutt.



Figur 22: GC-kromatogram av prøve 5f. GC programmet er forlenga.

### 3.3.3 Soxhlet ekstraksjon av sediment behandla med saltsyre



Figur 23: GC-kromatogram av prøve 3f.

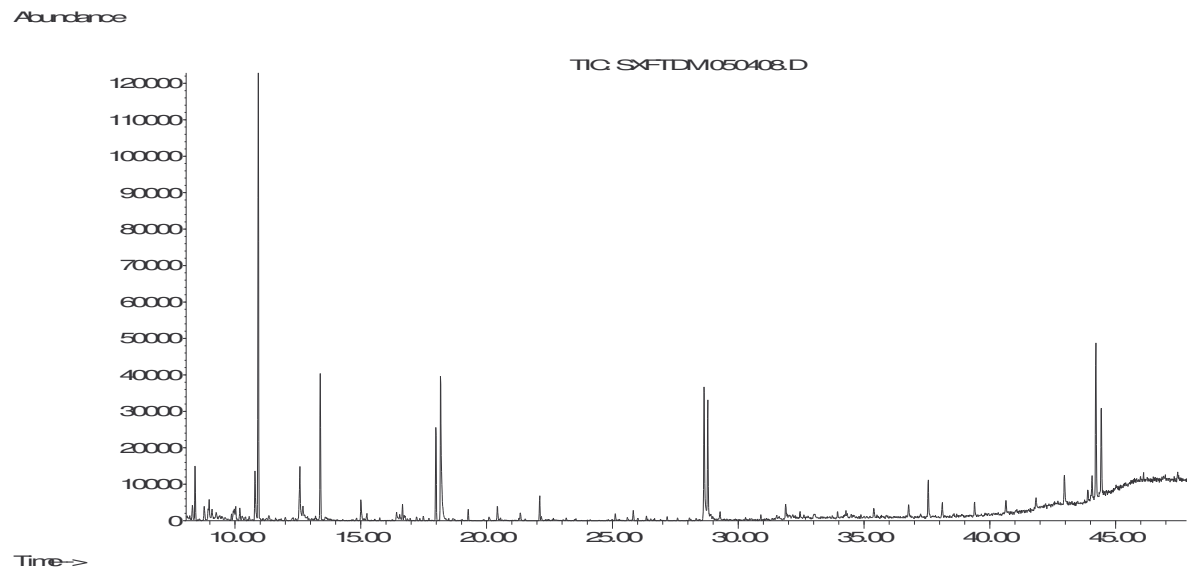
GC-kromatogrammet i Figur 23 var det kromatogrammet som gav høgst intensitet av dei fleste stoffa som er funne. Mange av stoffa som har for låge konsentrasjonar til at ein får ut gode MS-spekter i dei andre ekstrakta, er difor identifisert ved å samanlikne retensjonstidene frå dette spekteret.

Tabell 5: Oversikt over identifiserte stoff i prøve 3f.

| Rt    | Stoff                                  | Intensitet | Mm      | Formel                                           | Største topper i MS spekter                | Kommentar                                     |
|-------|----------------------------------------|------------|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 8,51  | <b>Decane</b>                          | 9400       | 142,282 | C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>                  | 142, 98, 85, 71, 57                        |                                               |
| 10,33 | <b>Heptanoic acid</b>                  | 9600       | 130,185 | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>    | 120, 112, 105, 87, 73, 60                  |                                               |
| 10,99 | <b>Undecane</b>                        | 15000      | 156,308 | C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>                  | 156, 127, 113, 98, 85, 71, 57              |                                               |
| 12,64 | <b>Benzenecarboxylic acid</b>          | 48000      | 122,121 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>     | 122, 105, 77, 51                           |                                               |
| 12,77 | <b>Octanoic acid</b>                   | 33000      | 144,211 | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>    | 122, 115, 101, 85, 73, 60                  |                                               |
| 13,45 | <b>Dodecane</b>                        | 12500      | 170,335 | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>                  | 170, 141, 127, 112, 98, 85, 71, 57         |                                               |
| 15,09 | <b>Nonanoic acid</b>                   | 62000      | 158,238 | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>    | 158, 129, 115, 73, 60                      |                                               |
| 16,39 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid           | 16000      | 166,131 | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>     | 148, <b>104, 76</b> , 50                   | Mange like spekter                            |
| 17,27 | <b>n-Decanoic acid</b>                 | 28000      | 172,265 | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>   | 172, 143, 129, 115, 87, 83, 73, 60         |                                               |
| 18,03 | <b>Tetradecane</b>                     | 21000      | 198,388 | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>                  | 198, 141, 126, 113, 99, 85, 71, 57         |                                               |
| 18,19 | <b>Vanillin</b>                        | 533000     | 152,147 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>     | 152, 151, 123, 109, 81                     |                                               |
| 20,06 | <b>Acetophenone</b>                    | 45000      | 166,174 | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>    | 166, <b>151</b> , 123                      |                                               |
| 20,6  | ?                                      | 42000      | -       | -                                                | 211, 155, <b>99</b>                        | Likna veldig på Tributyl phosphate            |
| 21,25 | 4-nitroguaiacol                        | 65000      | 169,135 | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>    | 169, 139, 123, 108, <b>75</b>              | Ikkje same stoff, toppen på 75 mangla         |
| 21,42 | <b>Dodecanoic acid</b>                 | 55000      | 200,318 | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>   | 200, 157, 129, 73, 60, 43                  |                                               |
| 23,21 | Tributyl phosphate                     | 16500      | 266,314 | C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P | 211, 155, <b>99</b>                        |                                               |
| 23,33 | <b>Tridecanoic acid</b>                | 19500      | 214,344 | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>   | 214, 185, 170, 129, 115, 97, 83, 73, 60    |                                               |
| 25,19 | <b>Tetradecanoic acid</b>              | 88000      | 228,371 | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>   | 228, 185, 129, 73, 60                      |                                               |
| 26,93 | <b>Pentadecanoic acid</b>              | 38000      | 242,398 | C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>   | 242, 199, 143, 129, 97, 83, <b>73</b> , 60 |                                               |
| 27,31 | <b>1-Hexadecanol</b>                   | 693000     | 242,441 | C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O                | (251), 224, 111, 97, 83, 69, 55            |                                               |
| 28,05 | <b>Hexadecanoic acid, methyl ester</b> | 60000      | 270,451 | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>   | 270, 227, 143, 97, 87, 74                  |                                               |
| 28,68 | <b>n-Hexadecanoic acid</b>             | 431000     | 256,424 | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>   | 256, 129, 73, 60                           |                                               |
| 30,62 | <b>5-octadecene, ( E)</b>              | 581000     | 252,478 | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>                  | 252, 125, 111, 97, 83, 69, <b>55</b>       |                                               |
| 30,82 | Heneicosane                            | 91000      | 296,574 | C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>                  | 296, 235, 123, 95, 85, 71, <b>57</b>       | Ikkje heilt likt, truleg to stoff i same topp |
| 31,80 | <b>Octadecanoic acid</b>               | 128000     | 284,477 | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>   | 284, 129, 97, 83, <b>73</b> , 60           |                                               |
| 32,32 | <b>Docosane</b>                        | 63500      | 310,601 | C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>                  | 310, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57         |                                               |
| 33,77 | <b>Tricosane</b>                       | 72000      | 324,627 | C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>                  | 324, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57         |                                               |
| 35,16 | Tetracosane?                           | 61400      | 338,654 | C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>                  | 137, 127, 123, 97, 82, 69, 57              | Ufullstendig spekter                          |
| 36,50 | Pentacosane?                           | 48000      | 352,68  | C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>                  | 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57              | Ufullstendig spekter                          |
| 36,94 | ?                                      | 52700      | -       | -                                                | 320, 152, 137, 123, 111, 96, 82, 69, 57    |                                               |
| 37,78 | Hydrokarbon                            | 26000      | -       | -                                                | 221, 97, 85, 71, <b>57</b>                 | Ufullstendig spekter                          |

|       |                            |        |         |                 |                                                |                                     |
|-------|----------------------------|--------|---------|-----------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 39,02 | Hydrokarbon                | 28000  | -       | -               | 221, 97, 85, 71, <b>57</b>                     | Ufullstendig spekter                |
| 40,65 | Squalene ?                 | 43000  | 410,718 | $C_{30}H_{50}$  | 410, 341, 193, 281, 95, 81, <b>69</b>          | Ufullstendig spekter                |
| 43,66 | Sterol                     | 300000 | -       | -               | 394, 143, 135, 119, 105, 95, 81, 69, 57        |                                     |
| 43,87 | Stigmastan-3,5-diene?      | 74000  | -       | -               | 396, 381, 147, 105, 81, 55                     | Ikkje same stoff, men noko liknande |
| 46,04 | .beta.-Sitosterol ?        | 180000 | 414     | $C_{29}H_{50}O$ | 414, 396, 145, 133, 107, 95, 81, 69, <b>55</b> | Ikkje same stoff, men noko liknande |
| 47,11 | Stigmasta-3,5-dien-7-one ? | 359800 | 410     | x               | 410, 395, 187, 161, 91, <b>55</b>              | Ikkje same stoff, men noko liknande |

### 3.3.4 Soxhlet ekstraksjon av frysetørka sediment



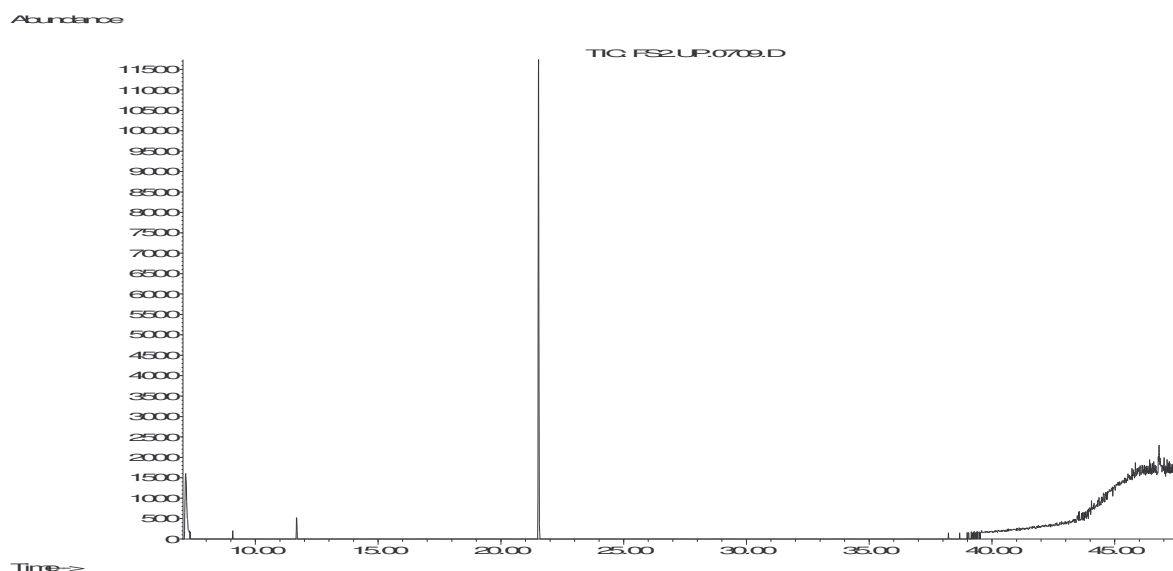
Figur 24: GC-kromatogram av prøve 6f.

Tabell 6: Oversikt over identifiserte stoff i prøve 6f.

| Rt    | Stoff                         | Intensitet | Mm      | Formel                                         | Største topper i MS spekter            | Kommentar                                  |
|-------|-------------------------------|------------|---------|------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------|
| 8,42  | <b>Decane</b>                 | 15000      | 142,282 | C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>                | 142, 98, 85, 71, 57                    |                                            |
| 10,8  | <b>Phenol, 2-methoxy-</b>     | 13000      | 124,137 | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | 124, 109, 81                           |                                            |
| 10,93 | <b>Undecane</b>               | 115000     | 156,308 | C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>                | 156, 127, 113, 98, 85, 71, 57          |                                            |
| 12,58 | <b>Benzenecarboxylic acid</b> | 14000      | 122,121 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | 122, 105, 77, 51                       |                                            |
| 12,7  | <b>Octanoic acid</b>          | 2800       | 144,211 | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 122, 115, 101. 85. 73, 60              |                                            |
| 13,39 | <b>Dodecane</b>               | 37000      | 170,335 | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>                | 170, 141, 127, 112, 98, 85, 71, 57     |                                            |
| 15,01 | <b>Nonanoic acid</b>          | 5500       | 158,238 | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | 158, 129, 115, 73, 60                  |                                            |
| 17,99 | <b>Tetradecane</b>            | 25000      | 198,388 | C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>                | 198, 141, 126, 113, 99, 85, 71, 57     |                                            |
| 18,18 | <b>Vanillin</b>               | 39000      | 152,147 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | 152, 151, 123, 109, 81                 |                                            |
| 20,43 | Barbital                      | 3700       | -       | -                                              | 191, <b>156, 141</b>                   | Noko liknande, men 191 toppen er i tillegg |
| 22,11 | <b>Nonadecane</b>             | 6500       | 226,441 | C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>                | 268, 155, 141 127, 113, 99, 85, 71, 57 |                                            |
| 28,65 | <b>n-Hexadecanoic acid</b>    | 36000      | 256,424 | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 256, 129, 73, 60                       |                                            |
| 31,89 | <b>Octadecanoic acid</b>      | 3500       | 284,477 | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 284, 129, 97, 83, 73, 60               |                                            |
| 36,78 | Hydrokarbon                   | 3500       |         | -                                              | 97, 85, 71, 57                         |                                            |
| 42,97 | ?                             | 14000      |         | -                                              | 281, 275, 191, ..., 145, ...           |                                            |
| 43,89 | Ergosta-5,7-dien-3-ol, (3β)-? | 10000      | -       | -                                              | 281, 215, 191, 133...                  | Ikkje same stoff, men noko liknande        |
| 44,06 | ?                             | 12000      |         | -                                              | 396, 281, 253, 191, ...                |                                            |
| 44,22 | ?                             | 50000      |         |                                                | 394, 281, 275, 253, ..., 143, 135, ... |                                            |
| 44,43 | Stigmastan-3,5-diene?         | 31000      | -       | -                                              | 396, 381, 288, 281, 275, 255, ...      | Ikkje same stoff, men noko liknande        |

### 3.4 Forsøping

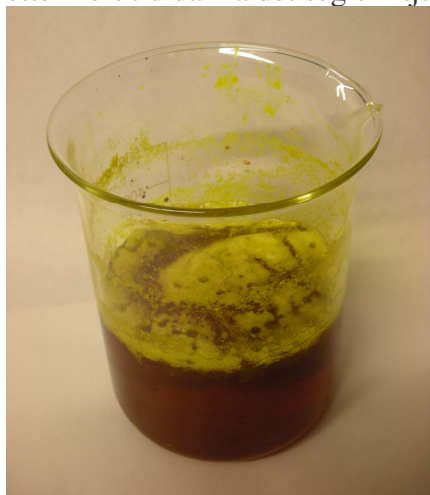
Figur 25 viser GC-kromatogram frå ekstrakt der tørka sediment har blitt refluxa i ei blanding av metanol og lut. Kromatogrammet har få utslag og nesten ingenting organisk materialet er identifisert.



Figur 25: GC-kromatogram av prøve 4t.

### 3.5 Frose sediment behandla med saltsyre og lut

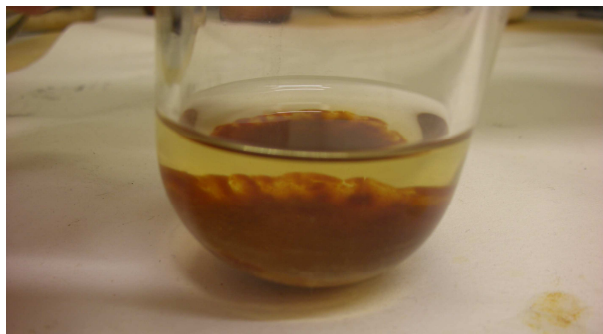
Etter at det frose sedimentet vart tilført 37% saltsyre, blei store delar av sedimentet løyst. Men etter kort tid danna det seg ein tjukk gele. Geleen var umogleg å filtrere.



Figur 26: Gel som vart danna då frose sediment blei løyst i 37% saltsyre.

Det viste seg midlertidig at geleen løyste seg i lut. Etter å ha tilsett 1 M NaOH løyste nesten all geleen seg (Figur 27). Og utgangspunktet med over 100 gram sediment var redusert til under 1 gram.





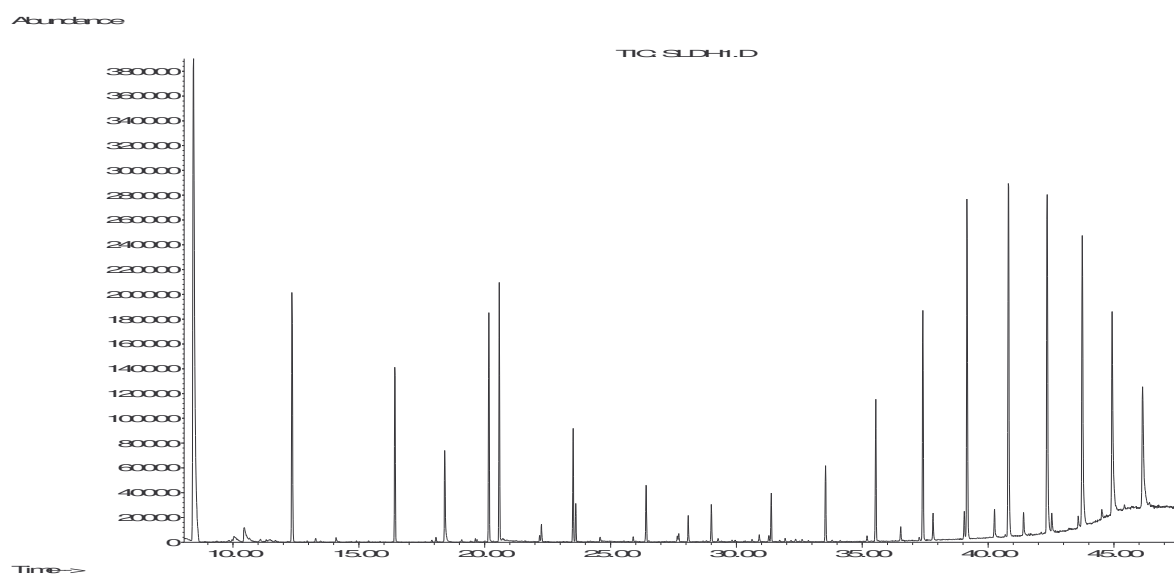
Figur 27: Botnfall etter at frosne sediment er behandla med 37% saltsyre og 1M NaOH.

I Tabell 7 er det utrekna kor mange vektprosent av det frosne sedimentet som vart løyst når det vart behandla med saltsyre og lut. Det vart utført to parallellar

Tabell 7: Utrekning av vektprosent sediment som løyste seg

| Parallell | Innvegd Sediment (g) | Uløyst sediment (g) | Vekt% sediment løyst |
|-----------|----------------------|---------------------|----------------------|
| 1         | 125,242              | 0,0848              | 99,93 %              |
| 2         | 70,461               | 0,0107              | 99,98 %              |

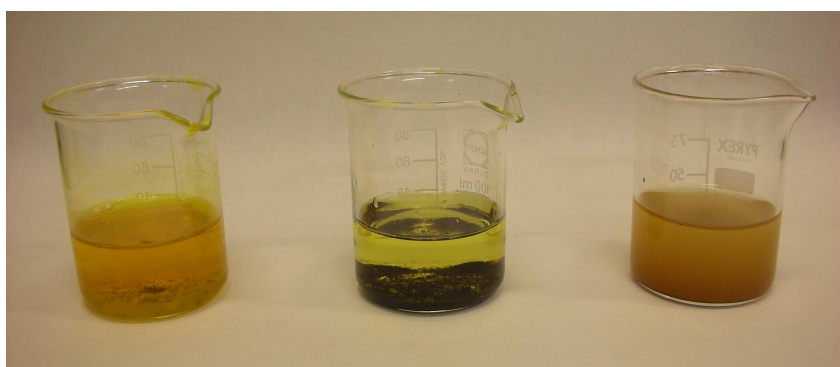
Figur 28 viser GC-kromatogram av ekstrakt frå frosne sediment som først er løyst i 37% saltsyre og deretter 1 M NaOH. Løysmiddel er dietyler. Ekstraktet er derivatisert med diazometan. Dei fleste toppane stammar frå kolonna og ekstraktet innehaldt nesten ingenting organisk materiale.



Figur 28: GC-kromatogram av ekstrakt frå frosne sediment behandla med saltsyre og lut.

### 3.6 Løysingsevne i ulike syrer

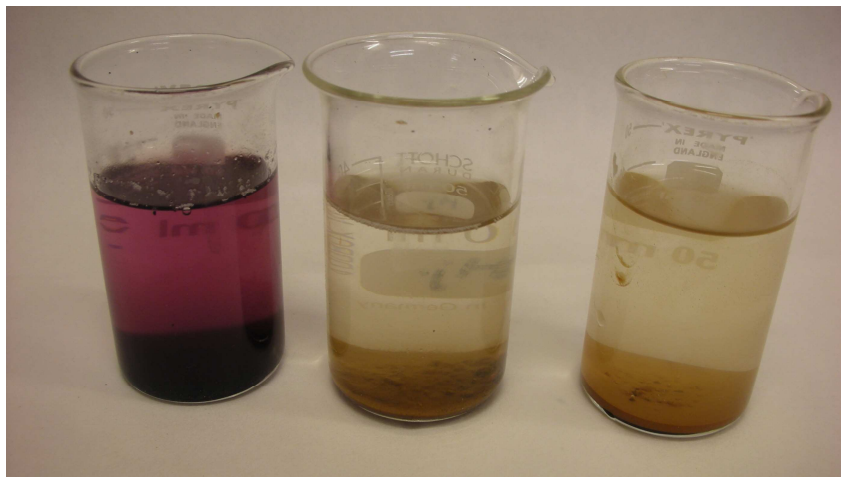
Figur 29- Figur 31 viser 1 gram sediment blanda med 40 ml syre. Syrene som er brukt er saltsyre, oksalsyre og fosforsyre på ulike konsentrasjonar (sjå Tabell 8). Bilde er tatt 1 døgn etter at syra var tilført. Fargen som oppstår er mest sannsynleg fordi metalla i sedimenta og syra dannar eit kompleks. Dei begerglasa som er farga er dei som har løyst seg best. Av bilde kjem det ikkje fram, men saltsyre var den einaste syra som danna gele. Dette problemet var størst på høgare konsentrasjonar. Den høgste konsentrasjonen oksalsyre vart testa på var 1,13 M, dette fordi det blir begrensa av løysingsevna til oksalsyre i vatn (14.3 g /100 mL ved 25 °C).



Figur 29: 1 gram tørka sediment løyst i 40 ml (frå venstre) 5 M, 0,5 M og 0,05 M saltsyre (HCl).

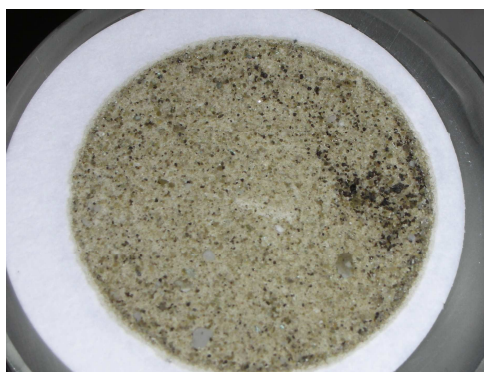


Figur 30: 1 gram tørka sediment løyst i 40 ml (frå venstre) 1,13 M, 0,5 M og 0,05 M oksalsyre ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ).



Figur 31: 1 gram tørka sediment løyst i 40 ml (frå venstre) 5 M, 0,5 M og 0,05 M fosforsyre ( $H_3PO_4$ ).

Figur 32 viser bilde av botnfal som var igjen etter at 1 gram tørka sediment var blanda med 0,5 M oksalsyre. Botnfallet vart filtrert ved hjelp av vakuum.



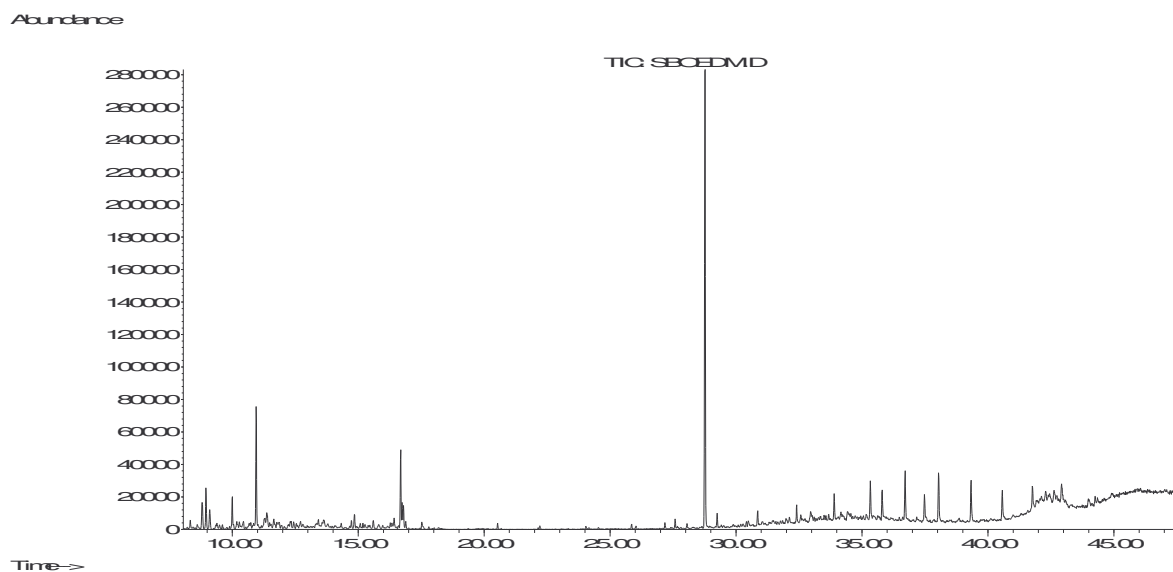
Figur 32: Botnfal som var igjen etter 1 gram tørka sediment blei løyst i 0,5 M oksalsyre.

Tabell 8 viser oversikt over resultat frå testen av løysingsevna til tørka sediment i ulike syrer på ulike konsentrasjonar. Konsentrasjonen på dei ulike syrene er oppgitt, samt pH før sedimentet var tilsett. Observasjon av reaksjonen vart notert umiddelbart, etter 30 min og etter 1 døgn. Til slutt vart botnfallet vegd om løysinga var mogleg å filtrere og vektprosent sediment som hadde løyst seg i syra vart rekna ut.

Tabell 8: Oversikt over resultat frå test av løysingsevne til tørka sediment i ulike syrer.

| Syre       | Kons.<br>(M) | pH    | Reaksjon etter:                 |                                   |                                                                        | Vekt av<br>botnfall (g) | Vekt%<br>sediment løyst |
|------------|--------------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|            |              |       | 0 min                           | 30 min                            | 1 døgn                                                                 |                         |                         |
| Saltsyre   | 12,08        |       | bobla og løysinga<br>blei svart | svart                             | gul oransje tjukk løysing, litt kvitt og enda mindre<br>svart botnfall | 0,8358                  | 16%                     |
| Saltsyre   | 5,07         | -0,71 | bobla og løysinga<br>blei svart | svart                             | gul oransje løysing, litt kvitt og enda mindre svart<br>botnfall       | 0,3796                  | 62%                     |
| Saltsyre   | 0,51         | 0,29  | ingen endring                   | lite endring                      | lys gulgrøn løysing, svart botnfall                                    | 0,2271                  | 77%                     |
| Saltsyre   | 0,05         | 1,29  | ingen endring                   | lite endring                      | blank løysing, uendra sediment på botn                                 |                         |                         |
| Oksalsyre  | 1,13         | 0,62  | bobla litt,<br>same farge       | grøn løysing,<br>nesten alt løyst | grøn løysing, litt kvitt og enda mindre svart<br>botnfall              | 0,0703                  | 93%                     |
| Oksalsyre  | 0,50         | 0,82  | ingen endring                   | brungrøn løysing                  | grøn løysing, litt kvitt og enda mindre svart<br>botnfall              | 0,0816                  | 92%                     |
| Oksalsyre  | 0,05         | 1,48  | ingen endring                   | lite endring                      | lys grøn løysing, uendra sediment på botn                              |                         |                         |
| Fosforsyre | 5,78         | 0,72  | bobla litt,<br>same farge       | lite endring                      | fiolett løysing, svart botnfall                                        | 0,4228                  | 58%                     |
| Fosforsyre | 0,58         | 1,24  | ingen endring                   | lite endring                      | blank løysing, uendra sediment på botn                                 |                         |                         |
| Fosforsyre | 0,06         | 1,80  | ingen endring                   | lite endring                      | blank løysing, uendra sediment på botn                                 |                         |                         |

### 3.7 Syrebehandling av frose sediment med oksalsyre



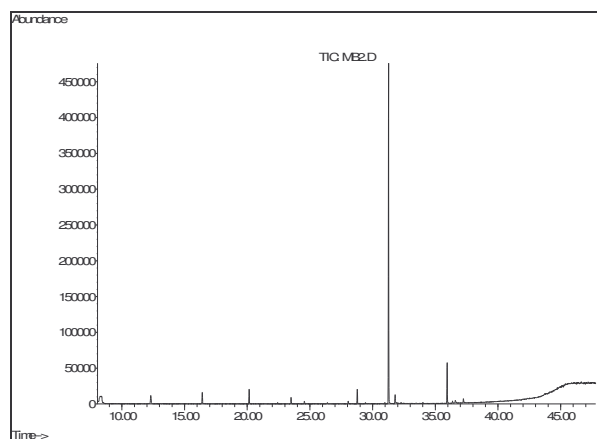
Figur 33: GC-kromatogram av frose sediment som er behandla med oksalsyre og deretter løyst i diklorometan og metanol (93:7).

Figur 33 viser GC-kromatogram av frose sediment som først blei nesten heilt oppløyst i 0,5 M oksalsyre. Deretter vart det organiske materiale i det uoppløyste sedimentet løyst i diklorometan og metanol (93:7). GC-kromatogrammet viser nesten ingenting organiske materiale, dei største toppane i kromatogrammet er forureining.

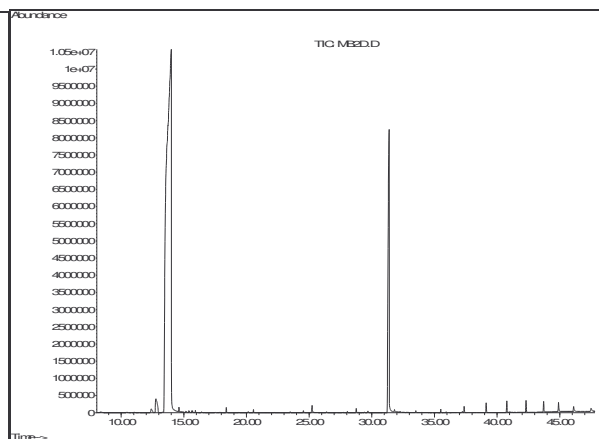
### 3.8 Derivatisering med Diazometan

Løysinga med diazometan som vart laga, blei først testa på ein triglyserid (glyceryl tristearate) og eit fosforlipid (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). GC-kromatogram av triglyserid før og etter den er derivatisert er vist i Figur 34a og Figur 34b. GC-kromatogram av fosforlipid før og etter den er derivatisert er lagt ved i appendiks D Figur 43a og Figur 43b. Etter derivatisering vart det og tilsett dodekan som intern standard. Løysmiddel er DCM:MeOH (93:7) for triglyserid som ikkje er derivatisert, og dietyleter for triglyserid som er derivatisert. Konsentrasjonane i løysingane var altfor høge, men trenden er likevel synleg. Blankprøve for derivatiseringa er lagt ved i appendiks D Figur 42.

Under kromatogramma i Tabell 9 visast stoff som er identifisert i GC-kromatogramma ved hjelp av retensjonstider og massespekter.



Figur 34a: GC-kromatogram av triglyserid løyst i DCM:MeOH (93:7)



Figur 34b: GC-kromatogram av triglyserid som er derivatisert med diazometan.

Tabell 9: Identifiserte stoff i GC-kromatogramma i Figur 34a og Figur 34b.

| Glyceryl tristearate løyst i DCM:MeOH            |                                 |            |     |                             |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|------------|-----|-----------------------------|
| Rt                                               | Stoff                           | Intensitet | Mm  | Største toppen i MS spekter |
| 31,27                                            | Octadecanoic acid, methyl ester | 460805     | 298 | 74, 87, 143, 298            |
| Glyceryl tristearate derivatisert med diazometan |                                 |            |     |                             |
| Rt                                               | Stoff                           | Intensitet | Mm  | Største toppen i MS spekter |
| 14                                               | Dodecane                        | 10883318   | 170 | 170, 85, 71, 57, 43         |
| 31,38                                            | Octadecanoic acid, methyl ester | 8153937    | 298 | 298, 255, 199, 143, 87, 74  |

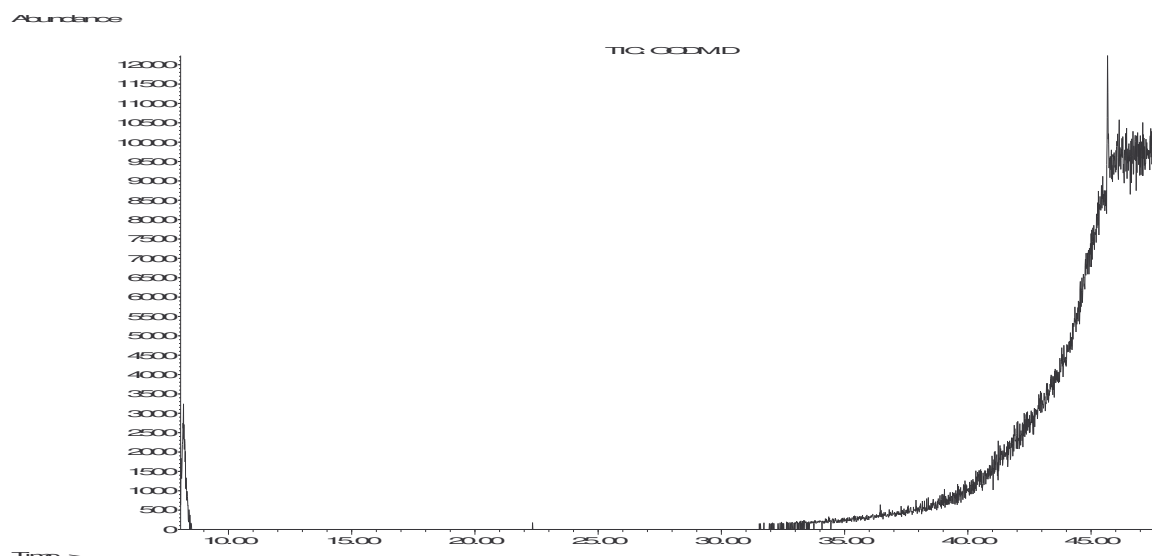
### 3.9 Derivatisering med MeOH (BF<sub>3</sub>)

#### 3.9.1 Derivatisering med MeOH (BF<sub>3</sub>) av modellforbindingar

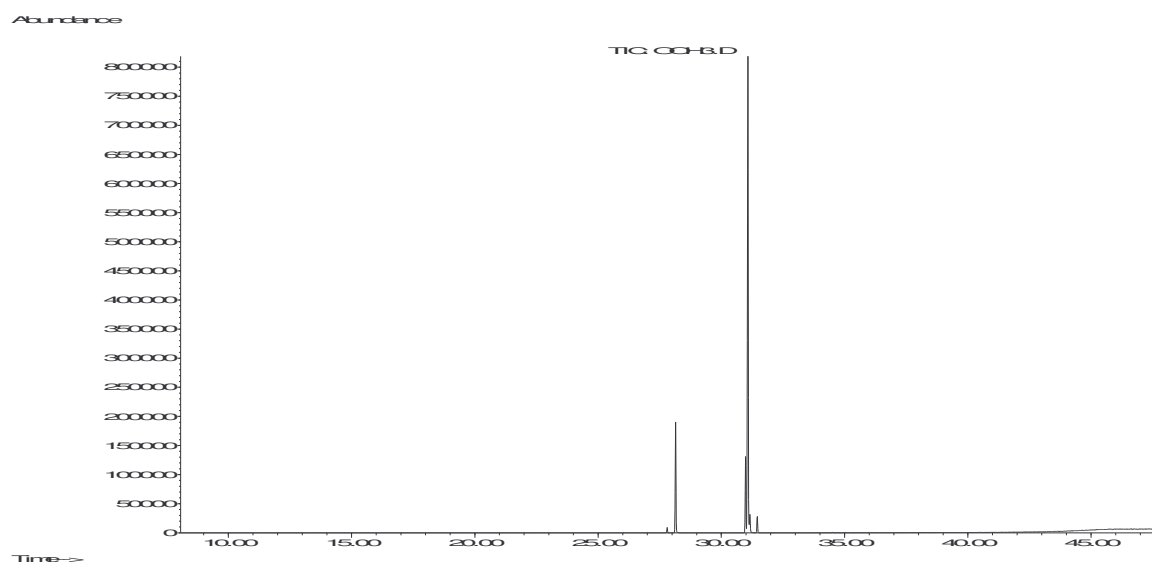
Det vart utført derivatisering av to modellforbindingar, olivenolje og glyceryl tristearate. GC-kromatogram av olivenolje løyst i DCM:MeOH (93:7) er vist i Figur 35. GC-kromatogram av olivenolje som er hydrolysert og deretter derivatisert med metanol er vist i Figur 36.

Løysmiddel er heksan.

Tabell 10 viser ei oversikt over stoff som er identifisert i GC-kromatogrammet i Figur 36 ved hjelp av retensjonstider og massespekter.



Figur 35: GC-kromatogram av olivenolje løyst i diklorometan og metanol (93:7)



Figur 36: GC-kromatogram av olivenolje som er hydrolysert og derivatisert med metanol (BF<sub>3</sub>)

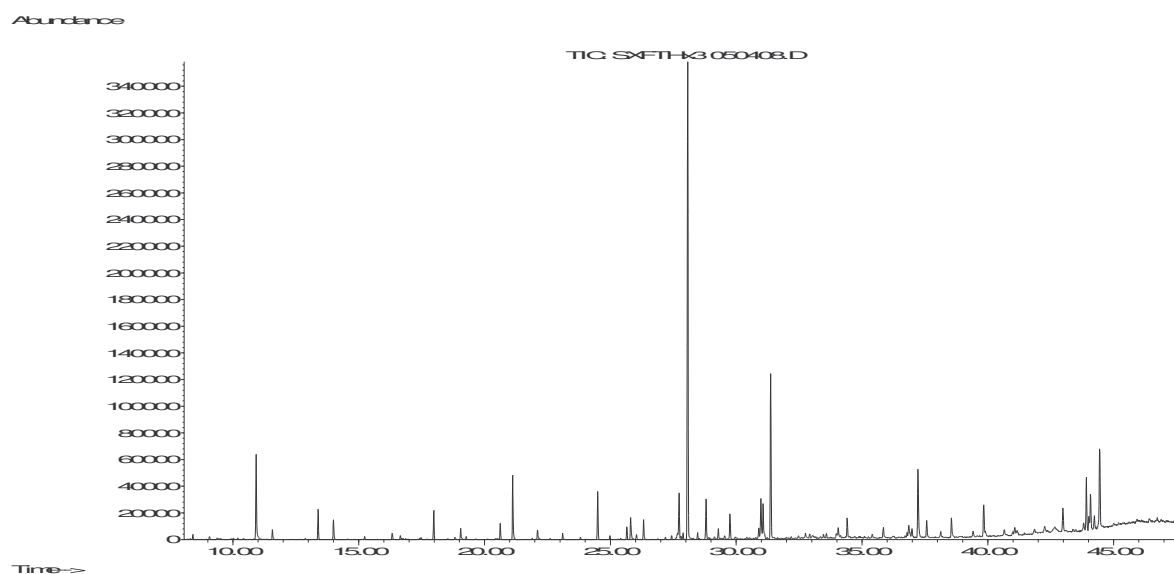
Tabell 10: Identifisert stoff i olivenolje hydrolysert og derivatisert med metanol (BF<sub>3</sub>)

| Rt    | Stoff                                   | Intensitet | Mm (g/mol) | Største topper i MS spekter         |
|-------|-----------------------------------------|------------|------------|-------------------------------------|
| 27,81 | ?                                       | 9000       |            |                                     |
| 28,15 | Hexadecanoic acid, methyl ester         | 185000     | 270        | 270, 227, 143, 87, <b>74</b>        |
| 30,99 | 9,12-octadecadienoic acid, methyl ester | 130000     | 294        | 294, 263, 109, 95, 81, <b>67</b>    |
| 31,08 | 9-Octadecenoic acid (Z), methyl ester   | 777000     | 296        | 296, 264, 97, 83, 74, 69, <b>55</b> |
| 31,16 | ?                                       | 31000      |            |                                     |
| 31,46 | Octadecanoic acid, methyl ester         | 27000      | 298        | 298, 255, 143, 129, 87, 74          |

### 3.9.2 Derivatisering med MeOH (BF<sub>3</sub>) av ekstrakt frå frysetørka sediment

Etter at ekstraktet frå frysetørka sediment blei derivatisert, vart mange nye organiske forbindingar identifisert. Figur 37 viser GC-kromatogram av prøve 6f etter det vart

derivatisert med metanol ( $\text{BF}_3$ ). Ekstraktet er frå same ekstraksjon som det som var brukt til GC-kromatogrammet i Figur 24.



**Figur 37:** GC-kromatogram av prøve 6f etter det er derivatisert med MeOH ( $\text{BF}_3$ ).

Tabell 11 viser oversikt over alle dei stoffa som er identifisert i GC-kromatogrammet i prøve 6f og 7f etter derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ). Dei fleste stoffa hadde gode massespekter og var lette og identifisere. I kommentarfeltet er det skreve ok på dei som er identifisert med ganske stor nøyaktigheit, og ok- på dei som er litt meir usikre. Nokon av stoffa er berre identifisert som metylester. I denne tabellen er det berre tatt med metylestera, sidan dei andre stoffa likevel er identifisert i Tabell 6. Intensiteten til stoffa er kor høgt utslag det gir i GC-kromatogrammet og det gir ein indikasjon på konsentrasjonen av stoffet i ekstraktet. I kolonna med toppar i MS spekteret, er dei viktigaste toppane i MS spekteret tatt med. Den største toppen er utheva.



Tabell 11: Identifiserte stoff i prøve 6f og 7f etter derivatisering med metanol (BF<sub>3</sub>).

|       |                                             | 6f         | 7f         |                                                  |                                                |          |           |
|-------|---------------------------------------------|------------|------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|-----------|
| Rt    | Stoff                                       | Intensitet | Intensitet | Største toppar i MS spekter                      | Formel                                         | Mm       | Kommentar |
| 9,07  | Heptanoic acid, methyl ester                | 2500       | 5000       | 115, 101, 87, <b>74</b>                          | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 144,2114 | ok-       |
| 9,52  | Hexanoic acid, 2-ethyl-, methyl ester       | 0          | 6000       | <b>102</b> , 87, 57                              | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | 158,238  | ok-       |
| 11,57 | Octanoic acid, methyl ester                 | 7000       | 6500       | 127, 115, 101, 87, <b>74</b>                     | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | 158,238  | ok        |
| 14,00 | Nonanoic acid, methyl ester                 | 14000      | 20000      | 143, 129, 101, 87, <b>74</b>                     | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 172,2646 | ok        |
| 16,34 | Decanoic acid, methyl ester                 | 5000       | 4500       | 155, 143, 87, <b>74</b>                          | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> | 186,2912 | ok        |
| 19,05 | Octanedioic acid, dimethyl ester            | 8000       | 2200       | 171, 138, 129, 97, 87, 74, <b>55</b>             | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> | 202,2475 | ok        |
| 20,63 | Dodecanoic acid, methyl ester               | 12000      | 5500       | 183, 143, 101, 87, <b>74</b>                     | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> | 214,3443 | ok        |
| 21,12 | Nonanedioic acid, dimethyl ester            | 46000      | 14000      | 185, 152, 143, 124, 111, 97, 87, 74, <b>55</b>   | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub> | 216,2741 | ok        |
| 24,50 | Tetradecanoic acid, methyl ester            | 35000      | 16000      | 242, 211, 199, 157, 143, 129, 101, 87, <b>74</b> | C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> | 242,3975 | ok        |
| 25,66 | Methyl ester                                | 9000       | 4000       | 143, 87, <b>74</b>                               | -                                              | -        |           |
| 25,81 | Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester | 15000      | 6000       | 199, 143, 97, 87, <b>74</b>                      | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 284,4772 | ok-       |
| 26,32 | Pentadecanoic acid, methyl ester            | 14000      | 6000       | 143, 101, 87, <b>74</b>                          | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 256,4241 | ok        |
| 27,73 | 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-     | 35000      | 18000      | 236, 194, 152, 123, 110, 96, 87, 74, <b>55</b>   | C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 268,4348 | ok        |
| 28,08 | Hexadecanoic acid, methyl ester             | 340000     | 140000     | 270, 227, 143, 87, <b>74</b>                     | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | 270,4507 | ok        |
| 29,29 | Methyl ester                                | 7000       | 2500       | -                                                | -                                              | -        |           |
| 29,76 | Heptadecanoic acid, methyl ester            | 18000      | 6000       | 284, 241, 143, 87, <b>74</b>                     | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 284,4772 | ok        |
| 30,99 | 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester      | 30000      | 16000      | 264, 222, 180, 97, 87, 74, 69, <b>55</b>         | C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 296,4879 | ok-       |
| 31,07 | 10-octadecenoic acid, methyl ester          | 25000      | 12000      | 264, 222, 180, 96, 87, 83, 74, 69, <b>55</b>     | C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 296,4879 | ok-       |
| 31,38 | Octadecanoic acid, methyl ester             | 120000     | 43000      | 298, 255, 199, 143, 87, <b>74</b>                | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> | 298,5038 | ok        |
| 34,41 | Eicosanoic acid, methyl ester               | 14000      | 4500       | 326, 283, 143, 87, <b>74</b>                     | C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> | 326,557  | ok        |
| 35,85 | Heneicosanoic acid, methyl ester            | 8000       | 3500       | 340, 297, 143, 87, <b>74</b>                     | C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> | 340,5836 | ok        |
| 37,23 | Docosanoic acid, methyl ester               | 50000      | 15000      | 354, 311, 255, 143, 87, <b>74</b>                | C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub> | 354,6101 | ok        |
| 38,56 | Methyl ester                                | 15000      | 0          | -                                                | C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> | 368,6367 | ok        |
| 39,84 | Tetracosanoic acid, methyl ester            | 24000      | 65000      | 382, 339, 199, 143, 87, <b>74</b>                | C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> | 382,6633 | ok        |

## 4 DISKUSJON

### 4.1 Rock Eval

#### TOC

Av TOC resultatene som er vist i Figur 19 ser ein at det er lite organisk materiale i sedimentprøvene. TOC er totalt organisk karbon i prosent i sedimentet. Det vil seie alt organisk materiale som er i sedimentet blir målt under denne parameteren, det betyr difor ikkje at alt dette er mogleg å ekstrahere ut. TOC kan fortelje noko om kvantiteten, men ikkje kvaliteten i sedimentprøva. Nesten alle verdiane som er målt er under 1%. Når TOC verdiane ligg mellom 0,5- 1,0% er kvantiteten av det organiske materiale grei, sjå Tabell 12.

**Tabell 12: Potensiale (kvantitet) til umoden kjeldebergart (Magoon and Dow 1994).**

| Potensiale (kvantitet) | TOC (wt.%) | S1 (mg/g) | S2 (mg/g) | Bitumen (ppm) | Hydrokarbon (ppm) |
|------------------------|------------|-----------|-----------|---------------|-------------------|
| Dårleg                 | <0,5       | <0,5      | <2,5      | <500          | <300              |
| Grei                   | 0,5-1      | 0,5-1     | 2,5-5     | 500-1000      | 300-600           |
| God                    | 1-2        | 1-2       | 5-10      | 1000-2000     | 600-1200          |
| Veldig god             | 2-4        | 2-4       | 10-20     | 2000-4000     | 1200-2400         |
| Utmerket               | >4         | >4        | >20       | >4000         | >2400             |

Dei høgste TOC verdiane er målt i dei sedimenta som var fryst fram til dei var analysert på Rock Eval. Dei sedimenta som var lufttørka med ein gong dei var tatt opp frå havbotnen har ein tydeleg lågare TOC verdi for alle parallellane. TOC verdiane i sedimenta etter ekstraksjon ligg omtrent på same linje som for dei tørka sedimenta. Dei sedimenta som var behandla med syre har litt varierende TOC verdiar, men har ein tydeleg lågare trend enn når sedimentet ikkje er behandla med syre. Dei grøne verdiane som er botnfallet som låg igjen i rundkolben etter Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment, desse vart målt på mest berre for å sjekke kva dette materialet var. Desse viste seg å ha dei lågaste TOC verdiane og var difor av liten interesse.

Av desse resultatene kan det virke som om det er dei frosne sedimenta som eignar seg best for opparbeiding av organisk materiale. Det organiske materialet i det tørka sedimentet kan ha blitt forringa ved tørking og lagring ved romtemperatur med rikelig tilgang på luft. Det er også klart at det ikkje har lukkast å oppkonsentrere det organiske materiale i sedimenta ved å

behandle det med syre. Botnfallet etter Soxhlet ekstraksjon inneholdt nesten ingenting organisk materiale.

#### S<sub>1</sub>:

S<sub>1</sub> verdiane er frie hydrokarbon i sedimenta i mg pr. gram. Desse gir ein betre indikasjon på kor mykje av det organiske materiale som er mogleg å ekstrahere ut. Av Figur 20 ser ein at S<sub>1</sub> verdiane varierar svært lite mellom tørka og frosne sediment og alle verdiane ligg godt under 0,5 mg/g som vil seie at potensiale er dårlig (Tabell 12). S<sub>1</sub> verdiane etter ekstraksjon er uventa høgare enn før ekstraksjon. Det kan være at sedimenta har blitt forureina av løysemiddel og det gir utslag fordi S<sub>1</sub> verdiane i sedimentet er så låge frå før. Den høgste verdien som er på 1,58 mg/g, er den einaste av dei som er ekstrahert to gongar. Den er først Soxhlet ekstrahert med DCM:MeOH (93:7) som løysemiddel, deretter med metanol som løysemiddel. Dette kan tyde på at metanol har forureina sedimentet i større grad. Av dei syrebehandla sedimenta ser vi ingen trend til at S<sub>1</sub> verdiane aukar, sjølv om ein av verdiane er veldig høg ser heller denne ut til å være ein uteliggjar.

Av Rock Eval resultata kan ein konkludere med at det er lite organisk materiale i sedimenta. Det meste av det organiske materiale er ikkje mogleg å ekstrahere ut. Ut frå Rock Eval kan det sjå ut som om det er vanskeleg å opparbeide gode ekstrakt med organisk materiale til analyse. Det kan virke som om dei frosne sedimenta er mest egna til å arbeide med.

## **4.2 Vektprosent vatn i frosne sediment**

Tabell 2 viser at vekt% vatn i frosne prøver varierar mykje frå kor prøvene er tatt frå. Alle prøvene er tatt frå ulike stadar på same klump, så verdiane varierar innan små områder. Dei fem parallellane varierar frå 73,8- 93,2 vekt% vatn. Det kan difor sjå ut som samansetjinga i sedimenta kan variere mykje. Det vil gi unøyaktige resultat, om ein prøver å rekne ut kor mykje tørt sediment ein har i dei våte prøvene ut frå desse tala.

### 4.3 Soxhlet ekstraksjon

Tabell 3 viser ei oversikt over alle ekstraksjonane som var utført. Det første materiale som var jobba med var tørka sediment. Desse ga ein del resultat som var mogleg å tolke etter at ekstraktet var kjørt på GC/MS. Men ekstrakta måtte oppkonsentrerast til det minste volumet som kan nyttast for at konsentrasjonane skulle blir store nok til at det vart registrert noko på GC/MS. Mange av toppane var og dårleg separert. Det ville difor vert gunstig å fraksjonere prøva i ulike komponentar før dei vart analysert på GC/MS. Men fordi konsentrasjonen av det organiske materiale var så lite, var dette vanskelig. Veldig mange av stoffa hadde og for låg konsentrasjon til at MS spektera blei gode nok til at ein kunne identifisere stoffa.

Det blei seinare prøvd å ekstrahere med større mengder sediment (prøve 5t), utan at dette gav betre resultat. Men årsaka til dette kan være instrumentet. Kolonna i gasskromatografen vart kapp i november 2007 og instrumentet var etter dette mykje meir følsamt. Retensjonstidene etter dette endra seg. Så prøvene som vart kjørt før november 2007 har ulik retensjonstid enn dei som var kjørt etter januar 2007.

Sidan resultatata frå Rock Eval viste at sedimenta innehaldt mest bunden hydrokarbon som ikkje lar seg ekstrahere, så vart det prøvd ein metode med forsåping som kanskje ville frigi ein del av desse hydrokarbonane og. Men GC kromatogrammet hadde nesten ingen utslag og ingen stoff blei identifisert ved denne metoden.

Seinare vart det tilgang på frosne sedimentprøver. Desse vart først ekstrahert direkte medan dei framleis var våte. Dette var svært tidkrevjande, då sedimenta innehaldt mykje vatn (73,8-93,2%). På grunn av dette vart det også vanskeleg å få nok sediment til ekstraksjon. Sidan sedimenta ekstraherte så lenge, så måtte det etterfyllast av løysemiddel med jamne mellomrom. To av ekstraksjonane kokte inn til tørrleik og det organiske materiale prøva vart truleg øydelagd. Den prøva som ikkje kokte inn gav ein del stoff som kunne identifiserast, men konsentrasjonane var mykje lågare enn for dei tørka prøvene.

Ekstraksjonen av det frosne materiale som var behandla med 2,5 M saltsyre gav dei største utslaga på GC-kromatogramma. Mikrovekta gav og gode konsentrasjonar.

Dei frosne sedimentprøvene som var frysetørka var mykje enklare å ekstrahere enn når dei var våte og gav betre resultat. Derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ) gav og mange metylester som var enkle og identifisere.

Metoden som egna seg best å jobbe vidare med var dei frysetørka prøvene. Sjølv om dei syrebehandla sedimenta gav høgare konsentrasjon, er frysetørkinga ein meir skånsam metode. Ved å bruke større mengder sediment til ekstraksjon kan ein kanskje få store nok konsentrasjonar i ekstraktet til at fraksjonering er hensiktsmessig. Om metoden med syrebehandling skal brukast, bør det undersøkjast meir i kor stor grad det har innverknad på det organiske materialet. Ekstraktet frå det syrebehandla sedimentet vart heller ikkje forsøkt derivatisert, så det vart ikkje undersøkt noko om kva innverknad syra hadde på feittsyrene.

#### 4.3.1 Soxhlet ekstraksjon av tørka sediment

Gasskromatogrammet som visast i Figur 21 er det gasskromatogrammet som var minst forureina og som hadde høgst konsentrasjonar av dei fleste forbindingane av ekstrakt av tørka sediment. I Tabell 4 som viser oversikt over stoffa som er identifisert ser vi at vi finn ein del feittsyrer og hydrokarbon, samt nokre mindre molekyll med benzenringar og større molekyll som truleg er ulike sterol. Kaprolaktam (Caprolactam) er det mest unike stoffet som vart funne i alle dei tørka sedimenta, men aldri i dei frosne sedimenta.

I appendiks C i Figur 41 og Tabell 14 er det vist resultat frå prøve 1t. Det var ein del forskjellar mellom dei to ekstraksjonane. Det kan være fordi ekstraksjonen blei utført på to ulike klumpar av sediment.

#### 4.3.2 Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment

Soxhlet ekstraksjon av frosne sediment viste seg å være svært tidkrevjande. Ekstraksjonen kunne stå over ei veke før alt vatnet var skilt ut. I tillegg måtte ein være påpasseleg med å etterfylle jamleg med løysemiddel så ekstraktet ikkje kokte inn.

Gasskromatogrammet som visast i Figur 22 er det einaste av dei tre ekstraksjonane med vått sediment der ekstraktet ikkje kokte inn til tørrleik under Soxhlet ekstraksjon. Ein del forbindingar var mogleg å identifisere, men veldig mange av toppane var usymmetriske og

overlappa kvarandre. Det vart ikkje laga ein tabell med identifiserte forbindingar fordi mange av MS-spektera var ufullstendige og fordi det vart utført ein ekstraksjon seinare med same sediment som var frysetørka der stoffa var lettare å identifisere.

Både fordi denne metoden var svært tidkrevjande og fordi analyseresultata ikkje var spesielt gode, kan ein konkludere med at denne metoden egna seg lite for å opparbeide organisk materiale.

Metoden som vart brukt i GC/MS analysen er i dette tilfelle forlenga for å sjå om det var nokon forbindingar som ikkje hadde kome ut av kolonna når metoden vart avslutta. Det viste kromatogrammet ingen teikn til, så i resten av GC/MS analysane vart det brukt den opphavlege metoden.

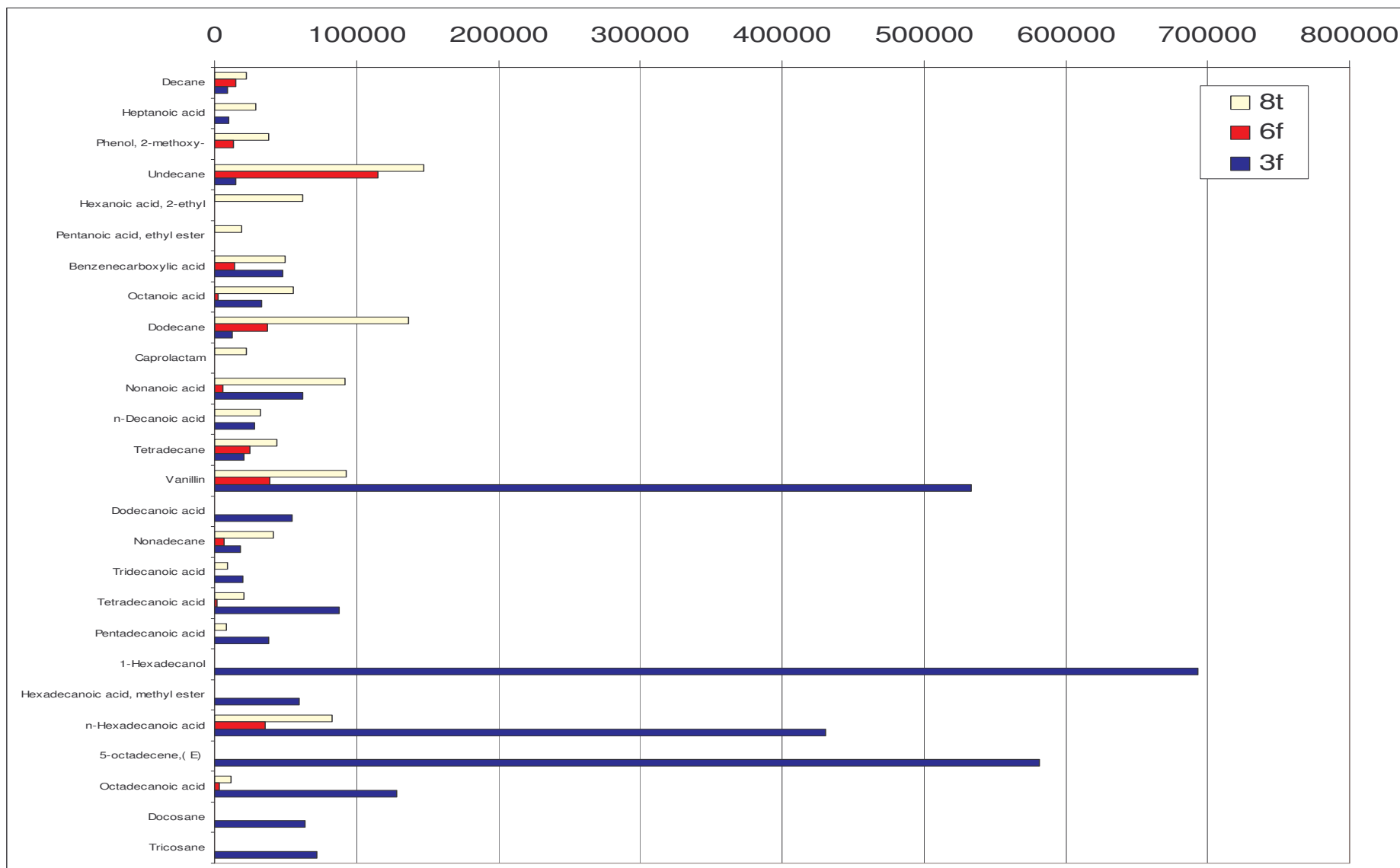
#### **4.3.3 Soxhlet ekstraksjon av sediment behandla med saltsyre**

Gasskromatogrammet som visast i Figur 23 er den einaste vellukka ekstraksjonen med frosne sediment som vart behandla med svak syre før ekstraksjon (prøve 3f). Det var i dette kromatogrammet det vart identifisert flest forbindingar. I Tabell 5 er det identifisert omtrent alle stoffa som også er identifisert i dei tørka prøvene, med unntak av nokon få. I tillegg er det identifisert mange fleire av dei tyngste stoffa, spesielt lange hydrokarbon og feittsyrer.

#### **4.3.4 Soxhlet ekstraksjon av frysetørka sediment**

Gasskromatogrammet som visast i Tabell 6 er eit av to parallellar som vart utført av frysetørka sediment (6f). Parallellane var nesten identiske. Det var ikkje så mange stoff som vart identifisert i desse ekstrakta som i 3f. Dei stoffa som var funne er og funne i 3f. Men konsentrasjonane var låge, så om ein hadde klart å opparbeide ekstrakt med høgare konsentrasjon hadde ein mest sannsynleg funne fleire stoff.

Toppene i GC-kromatogrammet var ofte godt separert, var symmetriske, hadde gode MS-spekter og var lette å identifisere. Dei derivatiserte prøvene frå desse ekstrakta viste at det var mange feittsyrer i dei frosne sedimenta.



Figur 38: Intensitet til dei ulike stoffa som er funne i prøve 8t, 3t og 6f. Berre dei stoffa som er identifisert med størst sikkerheit er tatt med.

### Samanlikning av 8t, 6f og 3t

Figur 38 visar eit diagram der ein samanliknar stoff som er funne i 8t, 6f og 3t. Ut frå diagrammet kan det sjå ut som om det er meir av dei lettaste komponentane i dei tørka sedimenta. I dei syrebehandla sedimenta har det blitt identifisert mange fleire og mykje større konsentrasjonar av dei tyngste komponentane.

Vanillin er eit stoff som blei identifisert i samtlege prøver i forholdsvis store konsentrasjonar. Vanillin er eit stoff som kan stammar frå lignin i karplanter og kan difor stammast tilbake til terrestrial avsetning.

Sterol molekyla vart ikkje tatt med i denne tabellen fordi retensjonstidene deira varierte mykje sjølv om MS-spektera såg ut til å være ganske like. Så det var vanskeleg å avgjere kva som var same stoff i dei ulike ekstraksjonane. Grunnen til dette kan være at sterolane ikkje er så stabile og gjennomgår små endringar over tid. Så molekyla kan være nesten identiske, det er kanskje berre ei metylgruppe som skiljer dei. Desse molekyla er i tillegg til feittsyreprofilar truleg dei mest interessante biomarkørane. Så om ein får opparbeid betre MS-spekter og får identifisert molekyla nøyaktig, skal det være mogleg å spore kvar dei stammar frå.

I appendiks E finn ein strukturen til alle molekyla i Figur 38 i tillegg til sterol som ein mulig finn i sedimenta.

## **4.4 Forsåping**

Av Figur 25 ser ein at metoden med forsåping gav lite utbytte av organisk materiale. Berre eit stoff er identifisert, og det er ikkje identifisert i nokon andre ekstrakt. Metanol vart brukt som løysemiddel, og det kan ut frå dette sjå ut som om metanol ikkje er effektivt løysemiddel for å løyse dei organiske stoffa i sedimenta. Ein kan med dette konkludere med at metoden eignar seg lite til å opparbeide organisk materiale til analyse.

## **4.5 Frose sediment behandla med saltsyre og lut**

Å løyse den uorganiske delen av sedimentet i syre for så å sete igjen med den organiske delen viste seg å by på fleire problem. Den første syra som var brukt var 2,5 M saltsyre. Då løyste



delar av sedimentet seg, det som ikkje løyste seg vart Soxhlet ekstrahert. Seinare vart det oppdaga at nesten alt sedimentet løyste seg når ein brukte konsentrert saltsyre. Men etter kort tid vart det danna ein stiv oransje gele som var umogleg å filtrere (Figur 26). Denne oppstod truleg på grunn av at silisium i sedimentet reagerar med syre og dannar kiselsyre, som er eit geleaktig kolloid som er seigt nok til at det held seg i glaset sjølv om ein snur det opp ned (Faure and Faure 1998).

Om dette stemte ville geleen bli løyst om ein gjorde løysinga basisk. Figur 27 syner gelen etter den er tilsett 1 M NaOH. Nesten alt sedimentet løyste seg. Tabell 7 syner kor stor del av sedimentet som løyste seg. Men ein må ta med i betraktning at sedimenta blei vegd inn våte.

I gasskromatogrammet i Figur 28 har det blitt identifisert mange ulike stoff, men nesten ingen stammar frå ekstraktet, sjå kap. 4.8 for forklaring. Det einaste som vart identifisert var Palmitinsyre (Hexadecanoic acid) og nokon langkjeda hydrokarbon i små konsentrasjonar.

#### **4.6 Løysingsevne i ulike syrer**

Av Figur 29 ser ein at sedimentet løyser seg i 0,5 og 5,0 M saltsyre. Ved 5 M saltsyre vart det danna ein heilt stiv gele. Ved 0,5 M saltsyre brukte sedimentet lang tid på å løyse seg, men det blei ikkje danna nokon gele og meir av sedimentet løyste seg enn ved 5 M saltsyre.

Av Figur 30 ser ein at sedimentet løyste seg nesten fullstendig i 1,13 M og 0,5 M oksalsyre. Løysinga blei grønt, truleg fordi det blei danna eit metall kompleks mellom anionet frå syra og metall i sedimentet. Av Tabell 8 ser ein at over 90% av sedimentet løyste seg ved desse to konsentrasjonane.

Av Figur 31 ser ein at sedimentet løyste seg i 5 M fosforsyre, men ikkje på dei lågare konsentrasjonane. Løysinga blei lilla ved 5 M fosforsyre, truleg fordi det blei danna eit metall kompleks. 56% av sedimentet vart løyst i 5 M fosforsyre.

Valde å bruke oksalsyre med konsentrasjon på 0,5 M til å behandle sedimenta med. Dette fordi den ikkje danna nokon gele og fordi den løyste sedimenta bra. 5 M oksalsyre var like

effektiv, men valte lågast konsentrasjon, fordi den truleg er meir skånsam mot det organisk materiale og for å spare på kjemikalium.

#### **4.7 Syrebehandling av frose sediment med oksalsyre**

Av Figur 33 ser ein at det er registrert ein del stoff i ekstraktet. Men dei største toppane er forureining og dei mindre toppane er vanskeleg å identifisere. Denne metoden gav lite data å jobbe med og egna seg lite til analyse av organisk materiale.

#### **4.8 Derivatisering med diazometan**

I GC-kromatogrammet i Figur 34a blei det identifisert store konsentrasjonar metylester sjølv om løysinga ikkje var derivatisert. Grunnen til dette kan være at konsentrasjonen av triglyserid (glyceryl tristearate) var svært høg og difor reagerte den med metanol sjølv utan at katalysator var til stade. I GC-kromatogrammet i Figur 34b ser ein likevel at konsentrasjonen av metylester har auka betrakteleg. Ein kan difor seie at derivatiseringa var vellukka. Om konsentrasjonen av triglyserid hadde vore mykje lågare så hadde ein først identifisert metylester etter derivatisering.

Metoden vart brukt på ekstrakt frå frose sediment behandla med saltsyre og lut (Figur 28). GC-kromatogrammet gav mange utslag og det kunne verke som om prøva innehaldt mange hydrokarbonar. Men etter analyse av MS-spekter og gjennomgang av ei blankprøve (appendiks D), viste det seg at nesten alle toppane truleg kjem frå GC-kolonna. Ein finn og desse toppane når ein derivatiserte triglyserid, men sidan konsentrasjonen av metylester her var så stor, så vart dette oversett. På grunn av dette var derivatisering med diazometan lite egna og det vart prøv ut ein ny metode.

Metoden vart og utprøvd på eit fosforlipid (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). GC-kromatogrammet er visst i (appendiks D) og gav same resultat.

## 4.9 Derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ )

### 4.9.1 Derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ) av modellforbindingar

Av GC-kromatogrammet i Figur 35 ser ein at feittsyrene i olivenoljen har blitt fullstendig dekomponert gjennom kolonna og ingenting har blitt registrert i kromatogrammet. Det same skjedde med glyceryl tristearate (Figur 44 i appendiks D). Etter at olivenoljen blei hydrolysert og derivatisert gav det utslag i fleire toppar på GC-kromatogrammet (Figur 36) og fire ulike metylester identifisert (Tabell 10).

Det vart også utført kun hydrolyse og kun derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ) på olivenolje for å sjå kva effekt dei hadde kvar for seg. Konsentrasjonane på i prøvene etter dei ulike behandlingane er gitt i Tabell 16 appendiks D. Ser av GC-kromatogrammet i Figur 46 i appendiks D at hydrolyse gav nokon metylester, men mykje mindre utslag. Derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ) utan hydrolyse gav større utslag på GC-kromatogrammet enn hydrolyse aleine, men mindre enn både hydrolyse og derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ).

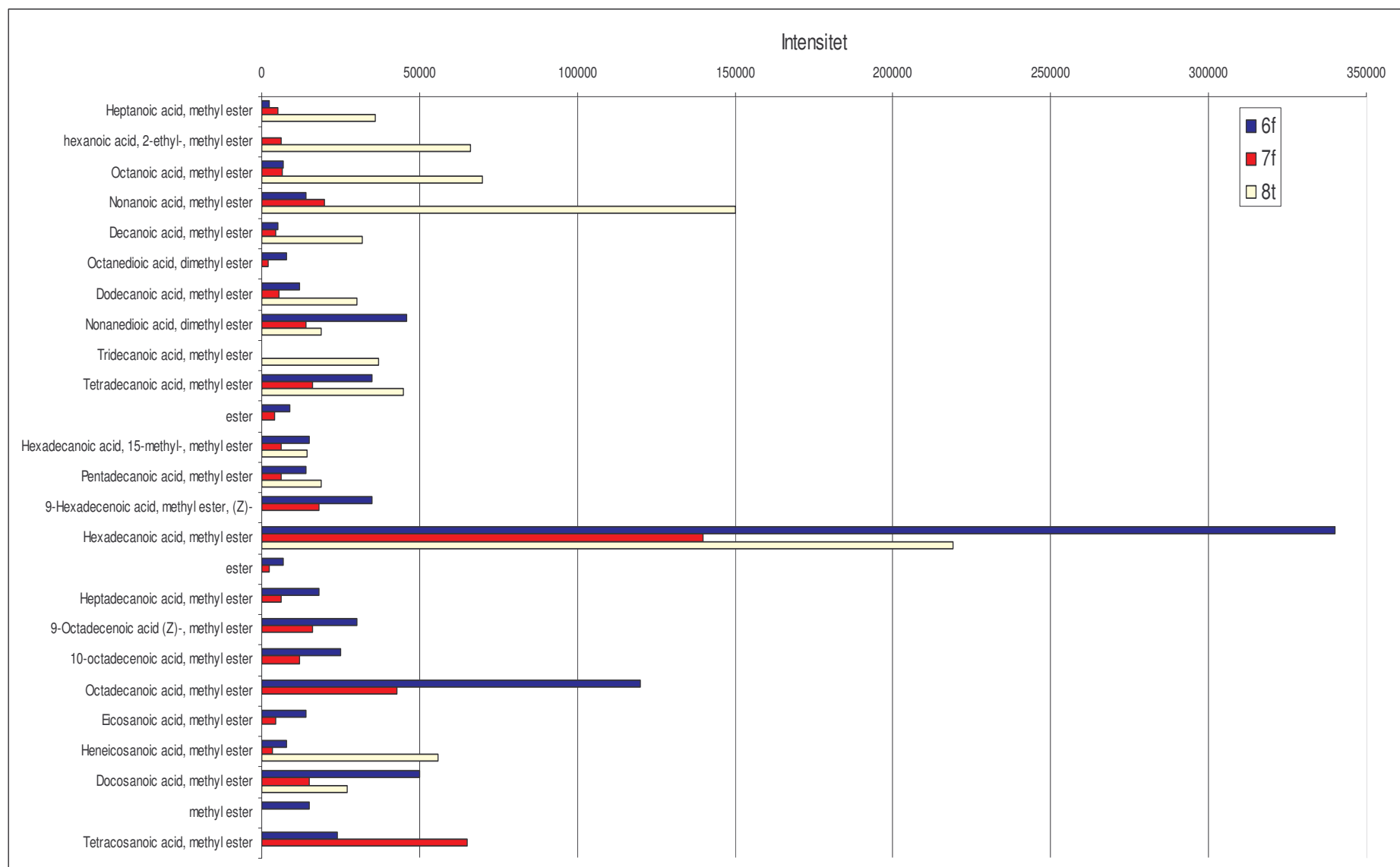
Den metoden som omformar størst del av feittsyrene til metylester er difor prosedyren med både hydrolyse og derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ). Men fordi det ikkje var så store skilnadar om ein kutta ut hydrolyse, og fordi prosedyra då blei mykje enklare. Vart det berre utført derivatisering av metanol ( $\text{BF}_3$ ) på ekstrakta frå sedimenta. Konsentrasjonen og mengda på desse prøvene var så små at det var viktig at derivatisering prosedyra var mest mogleg kvantitativ.

#### 4.9.2 Derivatisering med metanol (BF<sub>3</sub>) av ekstrakt frå frysetørka sediment

I gasskromatogrammet i Figur 37 blir det identifisert mange fleire stoff enn i Figur 24. Alle desse stoffa er metylester som har blitt omdanna frå feittsyrene som nesten ikkje blei registrert i gasskromatogrammet i Figur 24. Dei to parallellane som vart utført med frysetørka sediment var veldig like. Nesten alle metylestera var funne i begge parallellane, og intensiteten varierte forholdsvis likt (Figur 39). I ekstraktet frå den tørka sedimentprøva vart det identifisert ganske mange av dei same metylestera, men det mangla ein del av dei tyngste. Dei lettaste metylestera hadde mykje høgare konsentrasjonen i den tørka prøva enn dei frysetørka. Grunnen til dette kan være at ein del av dei store feittsyrene blir brote ned til lettare feittsyrer ved den behandlinga som dei tørka sedimenta har fått.

Ut frå dette kan ein konkludere med at det er dei frysetørka prøvene som eignar seg best til å identifisere feittsyrene. For å verifisere data hadde det vert ønskelig å utført fleire parallellar, og gjerne ekstrahere større mengder sediment for å få større konsentrasjon på ekstrakt.

I sedimenta vart det funne mest metta feittsyrer, men og nokon einumetta og disyrer. Den syra det var desidert størst konsentrasjon av var Heksadekansyre (Hexadecanoic acid). I appendiks E finn ein strukturen til dei metylestera som er funne i dei derivatiserte ekstrakta frå sedimenta.



Figur 39: Derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ) av ekstrakt frå frysetørka sediment.

#### ***4.10 Potensialet for å finne biomarkørar i hydrotermale sediment***

Sjølv om konsentrasjonen av det organiske materialet var lite i hydrotermale sediment, så ser det ut til at det kan eksistere gode biomarkørar og tilstrekkelege mengder feittsyrer til å lage ein god feittsyreprofil. Nokon av metodane som er brukt ser ut til å gi resultat som kan tolkast vidare på for å finne ut kva organismar som lev rundt dei hydrotermale felta. Men for å lettare tolke og verifisere data bør det utførast fleire parallellar og helst få ekstrakt med større konsentrasjonar som lar seg fraksjonere.

## 5 KONKLUSJON

---

- Resultat frå Rock Eval analyse visar at sedimentprøvene frå dei hydrotermale felta inneheld lite organisk materiale.
- Sedimenta løyste seg nesten heilt opp når syre blei tilsatt. Oksalsyre var den syre som løyste sedimenta best.
- Dei to beste metodane for å ekstrahere ut det organiske materiale av sedimenta var enten å først behandle sedimenta med 2,5 M saltsyre eller å frysetørke sedimenta før Soxhlet ekstraksjon. Desse metodane ser ut til å gi resultat som kan tolkast vidare på for å finne ut kva organismar som lev rundt dei hydrotermale felta.
- Derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ ) var ein metode som fungerte godt for å omgjere feittsyrene til metylester.
- I ekstrakta frå sedimenta vart det identifisert for det meste hydrokarbonar, feittsyrer og sterol i tillegg er det identifisert nokon få andre stoff.

## 6 VIARE ARBEID

---

- Bruke større mengder frysetørka sediment til Soxhlet ekstraksjon, så ein får større konsentrasjon på ekstraktet.
- Fraksjonere ekstraktet etter Soxhlet ekstraksjon dersom ein får opparbeid gode nok konsentrasjonar i ekstraktet.
- Tilsette intern standard før analyse med GC/MS så ein kan finne ut konsentrasjonar av dei ulike stoffa.
- Analysere på biomarkørar og feittsyreprofil på eit større utvald av sedimenta.
- Tolke biomarkørar og feittsyreprofilar for å finne ut kva slags organismar dei stammar frå.



## 7 REFERANSELISTE

---

Benmlih, F., J. C. Marty, et al. (1992). "Fatty-Acid Composition in Deep Hydrothermal Vent Symbiotic Bivalves." Journal of Lipid Research **33**(12): 1797-1806.

Brocks, J. J. and R. E. Summons (2003). "Sedimentary Hydrocarbons, Biomarkers for Early Life."

Colaco, A., D. Desbruyeres, et al. (2007). "Polar lipid fatty acids as indicators of trophic associations in a deep-sea vent system community." Marine Ecology-an Evolutionary Perspective **28**(1): 15-24.

Faure, G. and G. Faure (1998). Principles and applications of geochemistry: a comprehensive textbook for geology students. Upper Saddle River, N.J., Prentice Hall.

Fullarton, J. G., A. P. Wood, et al. (1995). "Fatty-Acid Composition of Lipids from Sulfur-Oxidizing and Methylotrophic Bacteria from Thyasirid and Lucinid Bivalves." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **75**(2): 445-454.

<http://billy.geo.uib.no/biodeep/>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemosynthesis>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic\\_tree](http://en.wikipedia.org/wiki/Phylogenetic_tree)

<http://goldbook.iupac.org>

<http://webbook.nist.gov/chemistry/>

<http://www.cyberlipid.org/>

<http://www.igilt.com>

Jannasch, H. W. (1983). "Microbial processes at deep-sea hydrothermal vents."

Kemp, W. (1991). Organic Spectroscopy 3rd edition, MacMillian Press, LTD.

Kruber, C. (2007). "Hydrothermal deposits and weathered basaltic glasses at the Mohns Ridge." 5.

Lechevalier, H. A. and A. I. Laskin (1977). CRC handbook of microbiology. Cleveland, CRC Press.

Magoon, L. B. and W. G. Dow (1994). The Petroleum system: from source to trap. Tulsa, Okla., American Association of Petroleum Geologists.

Mannvik, H. P., I. H. Wasbotten, et al. (2005). "Miljøundersøkelse i Region IV, 2005."

Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964). "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters + Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride-Methanol." Journal of Lipid Research **5**(4): 600-&.

Peters, K. E. and J. M. Moldowan (1993). The biomarker guide: interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall.

Peters, K. E., J. M. Moldowan, et al. (2005). Biomarkers and isotopes in the environment and human history.

Quezada, M., G. Buitron, et al. (2007). "The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultatively aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems." Fems Microbiology Letters **266**(1): 75-82.

Sargent, J. R. (1976). "The structure, function, and metabolism of lipids in marine organism." Biochemical and Biophysical perspectives in Marine Biology **3**(Academic Press, New York): 149-212.

Sepp, D. T., K. V. Scherer, et al. (1974 ). "Diazomethane from reaction of hydrazine with dichlorocarbene - crown ether PTC catalysis." Tetrahedron Letters(34 ): 2983-2984

Skoog, D. A., D. M. West, et al. (1996). Fundamentals of analytical chemistry. Fort Worth, Saunders College Publ.

Torsvik, V., L. Ovreas, et al. (2002). "Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors." Science **296**.

Van Dover, C. L. (2000). The ecology of deep-sea hydrothermal vents. Princeton, NJ, Princeton University Press.

Vanvleet, E. S. and J. G. Quinn (1979). "Early Diagenesis of Fatty-Acids and Isoprenoid Alcohols in Estuarine and Coastal Sediments." Geochimica Et Cosmochimica Acta **43**(3): 289-303.

Weast, R. C. (1975-1976). Handbook of chemistry and physics, CRC Press.

Weiss, H. M., A. Wilhelms, et al. (2000). NIGOGA - The Norwegian Industry Guide to Organic Geochemical Analyses, Norsk Hydro

White, D. (1999). The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes, Oxford University Press.

Woese, C. R. and R. S. Wolfe (1985). Archaeobacteria.

Yamanaka, T. and S. Sakata (2004). "Abundance and distribution of fatty acids in hydrothermal vent sediments of the western Pacific Ocean." Organic Geochemistry **35**(5): 573-582.

## APPENDIKS

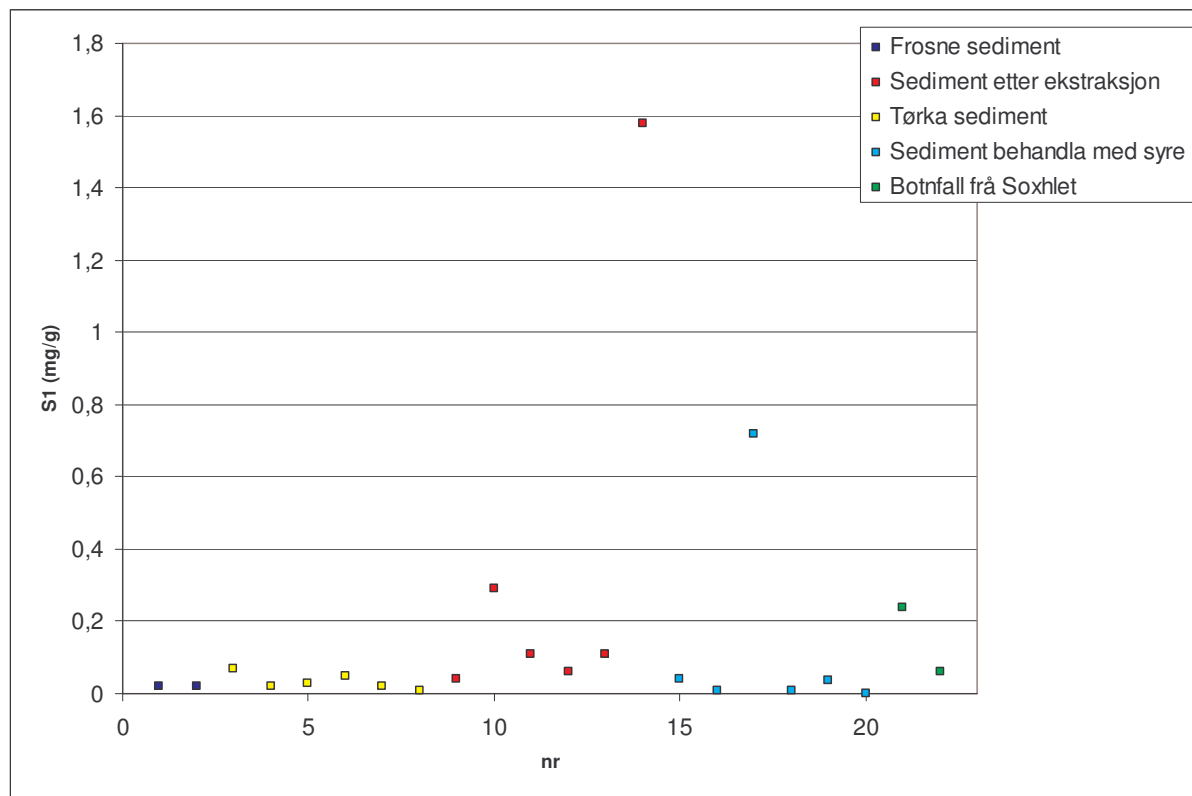
### Appendiks A

#### Kjemikalieliste

| Stoff                                       | Formel                                                       | Reinleik | Merke          |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------|----------------|
| BF <sub>3</sub> i metanol                   | BF <sub>3</sub> + CH <sub>3</sub> O                          | 10 %     | Supelco        |
| Bifenyl-d10                                 | C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> -C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> | 99 %     | Isotec         |
| Dietyleter                                  | (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O            | >99,5%   | Riedel-de Haen |
| Diklorometan                                | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>                              | >99,9%   | Fluka          |
| Dodekan                                     | C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>                              | >99%     | Kebo lab       |
| Fosforsyre                                  | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                               | 85 %     | Merck          |
| Glyceryl tristearate                        | C <sub>57</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>              | 99 %     | Sigma          |
| Heksan                                      | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>                               |          | Rathburn       |
| Hydrasinhydrat                              | NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O           |          |                |
| Kaliumhydroksid                             | KOH                                                          | 86 %     | EKA Nobel      |
| Kloroform                                   | CHCl <sub>3</sub>                                            | >99 %    | Sigma          |
| Metanol                                     | CH <sub>3</sub> O                                            | 99,90 %  | Sigma Aldrich  |
| Natriumhydroksid                            | NaOH                                                         | 99 %     | Riedel-de Haen |
| Oksalsyre                                   | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                 | 99,90 %  | J.T. Baker     |
| Saltsyre                                    | HCl                                                          | 37 %     | Riedel-de Haen |
| Vassfri natriumsulfat                       | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                              | 99 %     | Merck          |
| 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | C <sub>36</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>8</sub> P            | 99 %     | Sigma          |
| 18-krom-6-eter                              |                                                              | 98 %     | Borregaard     |

## Appendiks B

### Rock Eval Pyrolyse



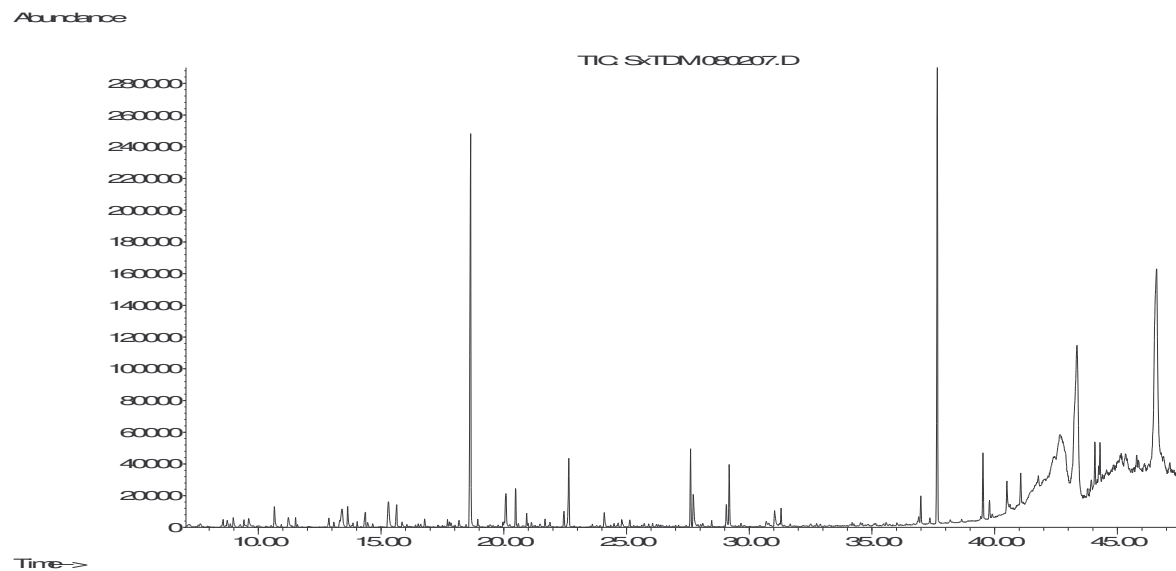
Figur 40: S2 resultat frå Rock Eval analyse.

Tabell 13: Rådata frå Rock Eval pyrolyse.

| Prøve                                                            | S1    | S2   | T <sub>max</sub> | S3    | TOC  | HI  | nr |
|------------------------------------------------------------------|-------|------|------------------|-------|------|-----|----|
| Standard                                                         | 1     | 5,33 | 437              | 0,36  | 2,27 | 235 |    |
| Standard                                                         | 0,99  | 5,29 | 436              | 0,48  | 2,26 | 234 |    |
| Frose sediment                                                   | 0,02  | 0,67 | 445              | 32,74 | 1,12 | 60  | 1  |
| Frose sediment                                                   | 0,02  | 0,17 | 438              | 32,23 | 0,95 | 18  | 2  |
| Tørka sediment                                                   | 0,07  | 0,17 | 609              | 21,35 | 0,62 | 27  | 3  |
| Tørka sediment                                                   | 0,02  | 0,18 | 609              | 20,81 | 0,61 | 30  | 4  |
| Tørka sediment                                                   | 0,03  | 0,16 | 611              | 23,9  | 0,68 | 24  | 5  |
| Tørka sediment                                                   | 0,05  | 0,21 | 492              | 27,38 | 0,78 | 27  | 6  |
| Tørka sediment                                                   | 0,02  | 0,18 | 605              | 25,65 | 0,72 | 25  | 7  |
| Tørka sediment                                                   | 0,01  | 0,2  | 481              | 20,61 | 0,59 | 34  | 8  |
| Tørka sediment etter Soxhlet                                     | 0,04  | 0,21 | 610              | 22,2  | 0,65 | 32  | 9  |
| Tørka sediment etter Soxhlet og Forsåping                        | 0,29  | 0,07 | 387              | 27,53 | 0,82 | 9   | 10 |
| Tørka sediment etter Soxhlet                                     | 0,11  | 0,21 | 611              | 22,88 | 0,67 | 31  | 11 |
| Frose sediment etter Soxhlet                                     | 0,06  | 0,17 | 516              | 24,64 | 0,7  | 24  | 12 |
| Frose sediment etter Soxhlet                                     | 0,11  | 0,44 | 606              | 27,98 | 0,83 | 53  | 13 |
| Frose syrebehandla sediment etter Soxhlet m/ 1: DCM:MeOH 2: MeOH | 1,58  | 0,4  | 609              | 15,53 | 0,68 | 59  | 14 |
| Frose sediment behandla med 2,5 M saltsyre                       | 0,04  | 3,26 | 607              | 4,01  | 0,41 | 795 | 15 |
| Frose sediment behandla med 2,5 M saltsyre                       | 0,01  | 0,69 | 606              | 16,78 | 0,56 | 123 | 16 |
| Tørka sediment behandla med 5 M saltsyre                         | 0,72  | 1,08 | 336              | 6,58  | 0,49 | 220 | 17 |
| Tørka sediment behandla med 5 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>   | 0,01  | 0,1  | 542              | 3,64  | 0,11 | 91  | 18 |
| Tørka sediment behandla med 37% HCl                              | 0,035 | 0,47 | 490              | 2,09  | 0,16 | 294 | 19 |
| Tørka sediment behandla med 0,5 M saltsyre                       | 0     | 0,43 | 516              | 11,43 | 0,36 | 119 | 20 |
| Botnfall etter Soxhlet med frose sediment                        | 0,24  | 0,62 | 294              | 0,42  | 0,11 | 564 | 21 |
| Botnfall etter Soxhlet med frose sediment                        | 0,06  | 0,77 | 389              | 1,14  | 0,15 | 513 | 22 |
| Standard                                                         | 1,02  | 6,31 | 434              | 0,48  | 2,39 | 264 |    |
| Standard                                                         | 1,01  | 5,54 | 438              | 0,44  | 2,34 | 237 |    |

## Appendiks C

### Soxhlet ekstraksjonar



Figur 41: GC-kromatogram av ekstrakt av tørka sediment soxhlet ekstrahert med diklorometan og metanol (93:7)

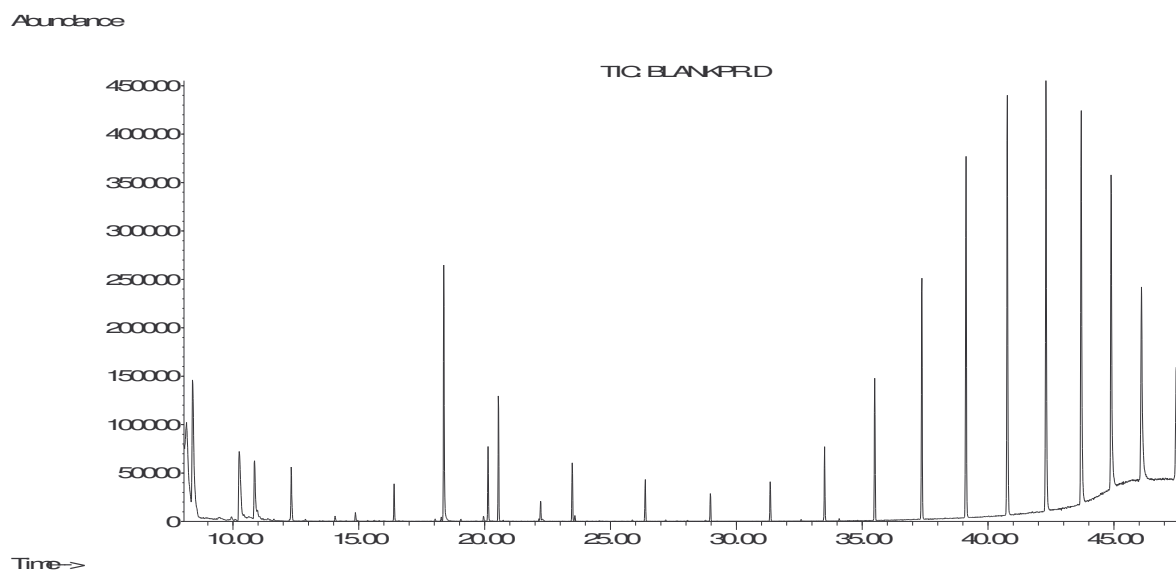
Tabell 14: Oversikt over identifiserte stoff i prøve 1t.

| Soxhlet ekstraksjon med DCM:MeOH av tørka sediment 08.02.07 |                                               |            |         |                                                |                                                 |                               |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------|---------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|
| Rt                                                          | Forbindingar                                  | Intensitet | Mm      | Formel                                         | Største topper i MS spekter                     | Kommentar                     |
| 8,56                                                        | Hexanoic acid                                 | 5000       | 116,158 | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>  | 87, 73, <b>60</b>                               | Litt ufullstendig spekter     |
| 8,98                                                        | Ethanol, 2-2(ethoxyethoxy)-                   | 6000       | 134,174 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>  | 104, 72, 59                                     |                               |
| 9,62                                                        | 1-Hexanol, 2-ethyl                            | 5000       | 130,228 | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O               | 98, 83, 70, <b>57</b>                           |                               |
| 10,66                                                       | 1-Octanol                                     | 13000      | 130,228 | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O               | 105, 97, 84, 70, <b>56</b>                      |                               |
| 11,23                                                       | Phenol, 2-methoxy-                            | 6000       | 124,137 | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>   | 124, <b>109</b> , 81                            |                               |
| 13,41                                                       | Benzenecarboxylic acid                        | 12000      | 122,121 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | 122, <b>105</b> , 77, 51                        |                               |
| 13,64                                                       | Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-                  | 13000      | 162,227 | C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>  | 101, 87, 75, <b>57</b>                          |                               |
| 14,36                                                       | 2-Octenoic acid                               | 9000       | 142,196 | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>  | 124, 99, 86, <b>73</b> , <b>55</b>              |                               |
| 15,31                                                       | Caprolactam                                   | 16000      | 113,158 | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO              | 112, 85, <b>55</b>                              |                               |
| 15,64                                                       | Nonanoic acid                                 | 14000      | 158,238 | C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>  | 129, 115, 73, <b>60</b>                         |                               |
| 18,65                                                       | Vanillin                                      | 233000     | 152,147 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | <b>151</b> , 137, 123, 109, 81                  |                               |
| 20,09                                                       | ?                                             | 21000      | -       | -                                              | 221, 180, <b>165</b> , 151, 137, 97, 83, 69, 57 |                               |
| 20,49                                                       | Ethanone, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-      | 24000      | 166,174 | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>  | <b>166</b> , <b>151</b> , 123, 108              | Mange like spekter og molekyl |
| 20,94                                                       | Benzaldehyd, 3,4-dimethoxy-, methylmonoacetal | 8000       | 198     | -                                              | 198, <b>167</b> , 152                           | Usikker                       |
| 22,65                                                       | ?                                             | 42000      | -       | -                                              | 243, <b>71</b>                                  |                               |
| 27,73                                                       | 1-Hexadecanol                                 | 20000      | 242,441 | C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O              | 125, 111, 97, 83, 69, <b>55</b>                 |                               |
| 28,47                                                       | Hexadecanoic acid, methyl ester               | 3800       | 270,451 | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | 143, 97, 87, <b>74</b>                          |                               |
| 29,07                                                       | n-hexadecanoic acid                           | 14000      | 256,424 | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 256, 213, 129, 73, 60, 55                       |                               |
| 31,04                                                       | 5-Octadecene, (E)-                            | 9800       | 252,478 | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>                | 125, 111, 97, 83, 69, 55                        |                               |
| 31,30                                                       | 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester        | 11000      | 296,488 | C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 264, 97, 83, 69, 55                             |                               |
| 36,99                                                       | ?                                             | 18000      | -       | -                                              | 255, 112, 83, 71, 57                            |                               |
| 39,52                                                       | Octadecanoic acid                             | 40000      | 284,477 | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 284, 267, 112, 97, 83, 71, <b>57</b>            |                               |
| 39,79                                                       | ?                                             | 11000      | -       | -                                              | 410, 395, 190, 162, <b>57</b>                   |                               |
| 40,50                                                       | 13-docosenamide,(Z)                           | 21000      | 294,242 | C <sub>22</sub> NO                             | 337, 320, 97, 83, 72, <b>59</b>                 |                               |
| 41,06                                                       | Squalene?                                     | 24000      | 410,718 | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>                | 203, 95, 81, <b>69</b>                          |                               |
| 43,36                                                       | Hydrokarbon                                   | 96000      | -       | -                                              | 379, ..., 97, 85, 71, <b>57</b>                 |                               |
| 44,09                                                       | ? (sterol)                                    | 32000      | -       | -                                              | 394, 346, 143, 135, 95, 81, 69, <b>55</b>       |                               |
| 44,29                                                       | stigmastan-3,5-diene?                         | 30000      | -       | -                                              | 396, 381, 133, 105, 95, 81, 69, <b>57</b>       |                               |
| 46,59                                                       | ?                                             | 123000     | -       | -                                              | 396, ... 97, 85, 71, 57                         |                               |
| 47,65                                                       | Hydrokarbon                                   | 30000      | -       | -                                              | 410, 395, 111, 97, 85, 71, <b>57</b>            |                               |

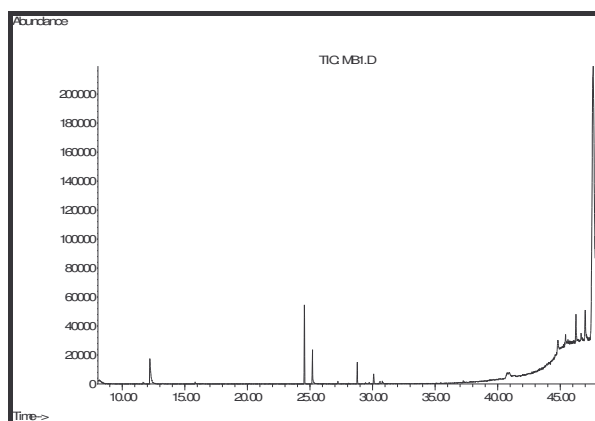


## Appendiks D

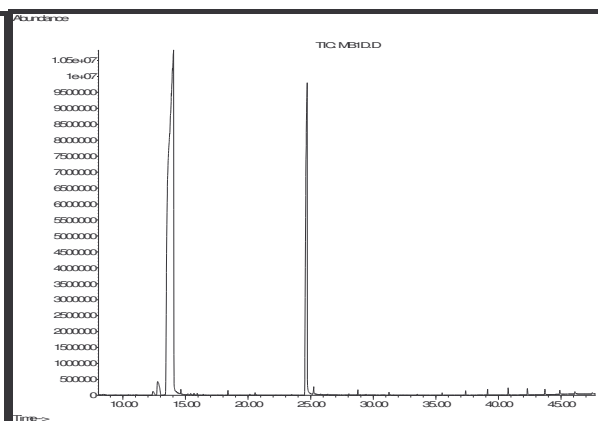
### Derivatiserte prøver



Figur 42: Blankprøve av derivatisering med diazometan.



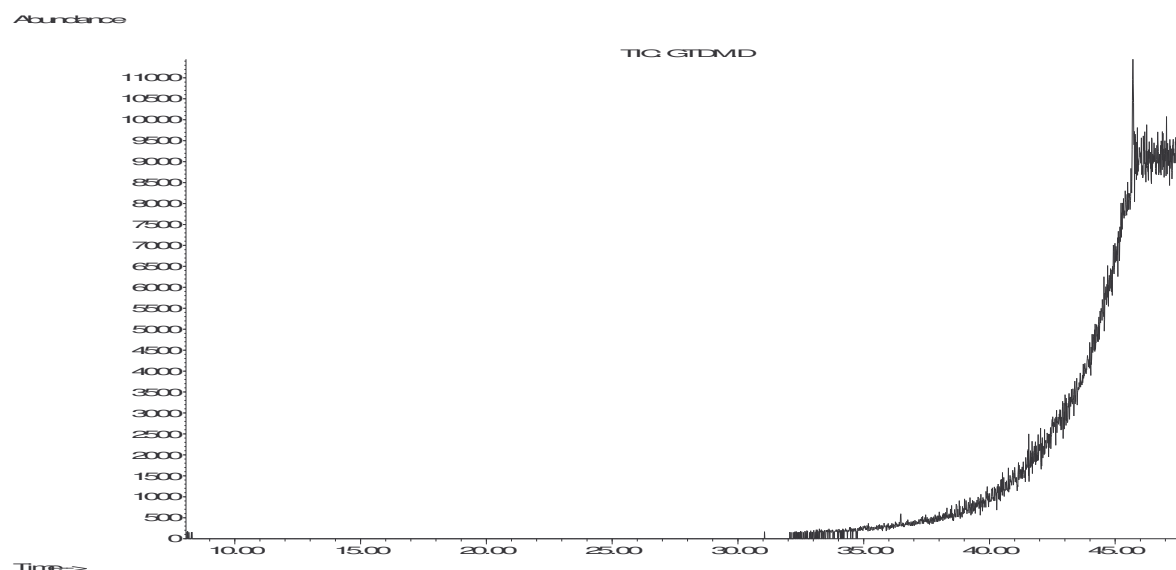
Figur 43a: GC-kromatogram av fosforlipid løst i DCM:MeOH (93:7)



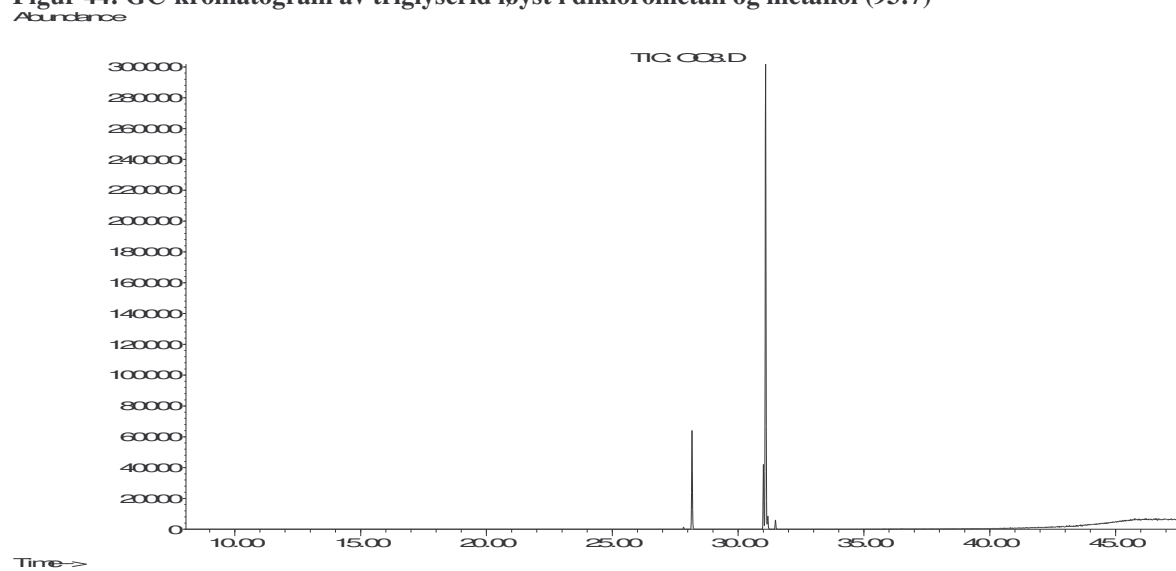
Figur 43b: GC-kromatogram av fosforlipid som er derivatisert med diazometan.

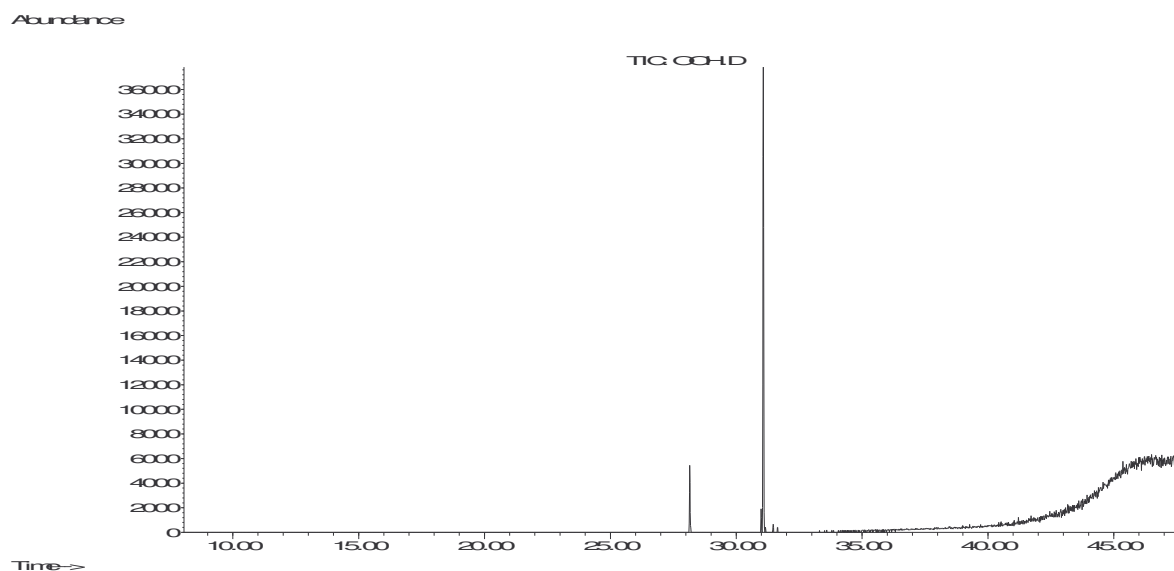
Tabell 15: Identifiserte stoff i GC-kromatogramma i Figur 43a og Figur 43b.

| Glyceryl tristearate løyst i DCM:MeOH            |                                          |            |     |                             |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------|------------|-----|-----------------------------|
| Rt                                               | Stoff                                    | Intensitet | Mm  | Største topper i MS spekter |
| 24,554                                           | Methyl tetradecanoate                    | 52801      | 242 |                             |
| 25,2                                             | Tetradecanoic acid                       | 21622      | 228 |                             |
| Glyceryl tristearate derivatisert med diazometan |                                          |            |     |                             |
| Rt                                               | Stoff                                    | Intensitet | Mm  | Største topper i MS spekter |
| 14                                               | Dodecane                                 | 10883318   | 170 |                             |
| 24,72                                            | Methyl tetradecanoate (methyl myristate) | 9904661    | 242 | 74, 87, 143, 199, 211, 242  |
| 25,24                                            | Tetradecanoic acid                       | 246943     | 228 |                             |



Figur 44: GC-kromatogram av triglyserid løyst i diklorometan og metanol (93:7)

Figur 45: GC-kromatogram av olivenolje som er derivatisert med metanol (BF<sub>3</sub>)



Figur 46: GC-kromatogram av olivenolje som er hydrolysert.

Tabell 16: Konsentrasjon av dei ulike prøvene brukt i test av derivatisering med metanol ( $\text{BF}_3$ )

| Stoff                | Behandling                                               | Konsentrasjon (mg/ml) |
|----------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------|
| Olivenolje           | Løyst i DCM:MeOH                                         | 1,11                  |
| Glyceryl tristearate | Løyst i DCM:MeOH                                         | 0,50                  |
| Olivenolje           | Hydrolysert                                              | 0,50                  |
| Glyceryl tristearate | Hydrolysert                                              | 0,24                  |
| Olivenolje           | Hydrolysert + Derivatisert med metanol ( $\text{BF}_3$ ) | 0,94                  |
| Glyceryl Tristearate | Hydrolysert + Derivatisert med metanol ( $\text{BF}_3$ ) | 1,21                  |
| Olivenolje           | Derivatisert med metanol ( $\text{BF}_3$ )               | 0,94                  |

## Appendiks E

### Identifiserte stoff

| Rt                                       | Stoff                                                                  | Største topper i MS spekter                                                                                                                |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8,41-8,52<br>10,33<br>10,78-10,8         | Decane<br>Heptanoic acid<br>Phenol, 2-methoxy-                         | 142, 98, 85, 71, <b>57</b><br>120, 112, 105, 87, 73, 60<br>124, 109, 81                                                                    |
| 10,93-10,99<br>11,53<br>11,94            | Undecane<br>Hexanoic acid, 2-ethyl<br>Pentanoic acid, ethyl ester      | 156, 127, 113, 98, 85, 71, <b>57</b><br>116, 101, 88, <b>73</b><br>103, 101, 85, 73, 60, <b>55</b>                                         |
| 12,58-12,74<br>12,7-12,83<br>13,39-13,45 | Benzenecarboxylic acid<br>Octanoic acid<br>Dodecane                    | 122, <b>105</b> , 77, 51<br>122, 115, 101, 85, 73, 60<br>170, 141, 127, 112, 98, 85, 71, <b>57</b>                                         |
| 14,81<br>15,01-15,15<br>17,26-17,27      | Caprolactam<br>Nonanoic acid<br>n-Decanoic acid                        | 113, 85, <b>55</b><br>158, 129, 115, 73, 60<br>172, 143, 129, 115, 87, 83, 73, <b>60</b>                                                   |
| 17,99-18,03<br>18,17-18,191<br>21,42     | Tetradecane<br>Vanillin<br>Dodecanoic acid                             | 198, 141, 126, 113, 99, 85, 71, <b>57</b><br>152, <b>151</b> , 123, 109, 81<br>200, 157, 129, 73, 60, 43                                   |
| 22,11<br>23,29-23,33<br>25,14-25,191     | Nonadecane<br>Tridecanoic acid<br>Tetradecanoic acid                   | 268, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, <b>57</b><br>214, 185, 170, 129, 115, 97, 83, <b>73</b> , 60<br>228, 185, 129, <b>73</b> , 60         |
| 26,93<br>27,31<br>28,05                  | Pentadecanoic acid<br>1-Hexadecanol<br>Hexadecanoic acid, methyl ester | 242, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 97, 83, <b>73</b> , 60<br>224, 196, 125, 111, 97, 83, 69, <b>55</b><br>270, 227, 143, 97, 87, <b>74</b> |
| 28,65-28,68<br>30,62<br>31,80-31,89      | n-Hexadecanoic acid<br>5-octadecene, ( E )<br>Octadecanoic acid        | 256, 129, 73, 60<br>252, 125, 111, 97, 83, 69, 55<br>284, 129, 97, 83, 73, 60                                                              |
| 32,32<br>33,77                           | Docosane<br>Tricosane                                                  | 310, 141, 127, 113, 99, 85, 71, <b>57</b><br>324, 141, 127, 113, 99, 85, 71, <b>57</b>                                                     |

Figur 47: Retensjonstider til dei stoffa som er identifisert med størst sikkerheit.

#### Molekylstruktur til stoffa i Figur 47

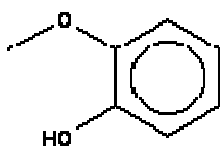
Decane:



Heptanoic acid:



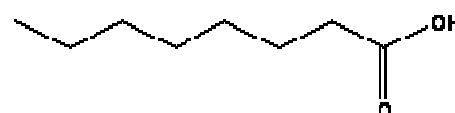
Phenol, 2-methoxy-:



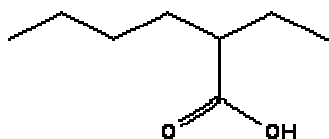
Undecane:



Octanoic acid:



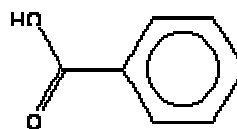
Hexanoic acid, 2-ethyl:



Pentanoic acid, ethyl ester:



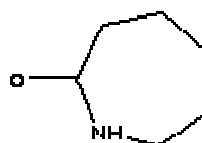
Benzenecarboxylic acid:



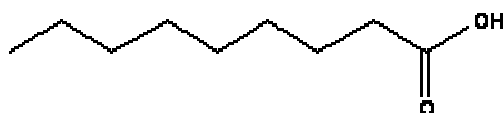
Dodecane:



Caprolactam:



Nonanoic acid:



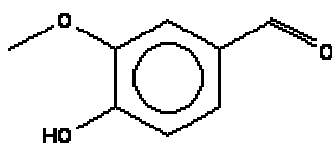
n-Decanoic acid:



Tetradecane:



Vanillin:



Dodecanoic acid:



Nonadecane:



Tridecanoic acid:



Tetradecanoic acid:



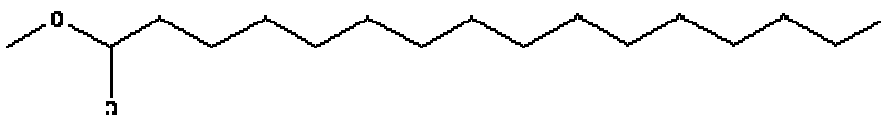
Pentadecanoic acid:



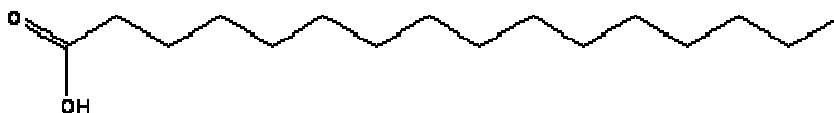
1-Hexadecanol:



Hexadecanoic acid, methyl ester:



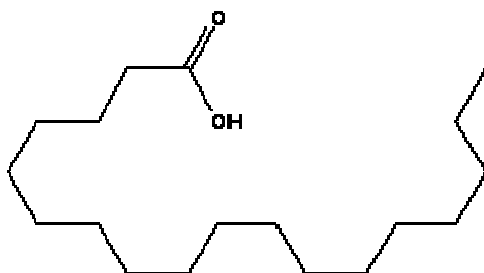
n-Hexadecanoic acid:



5-octadecene, (E):



Octadecanoic acid:



Docosane:

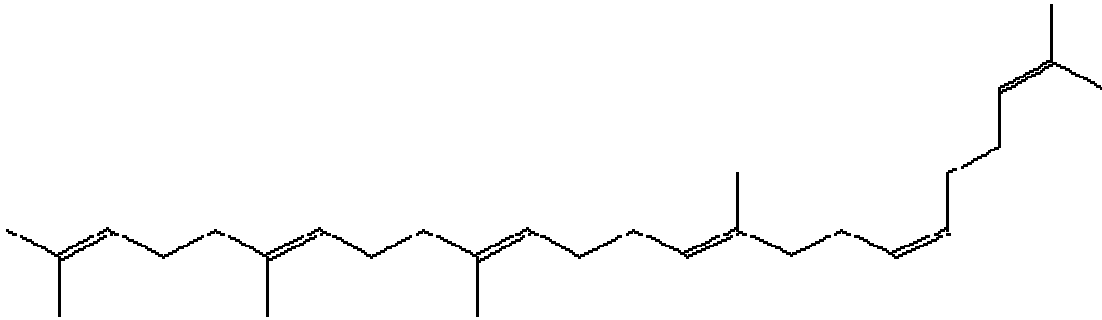


Tricosane:

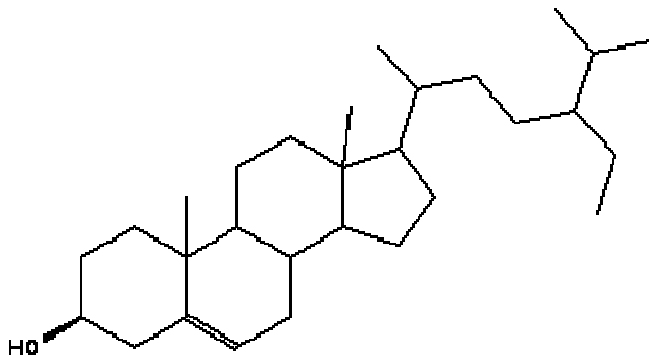


Molekyl til Sterol som ein mulig finn i sedimenta

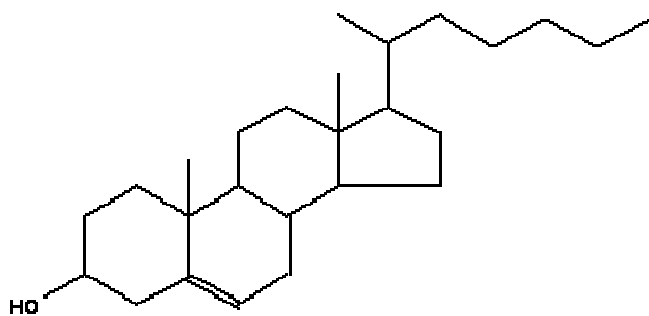
Squalene:



$\beta$ -Sitosterol:

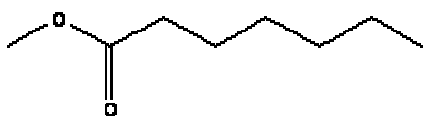


Ergosta-5,7-dien-3-ol, (3 $\beta$ )-:

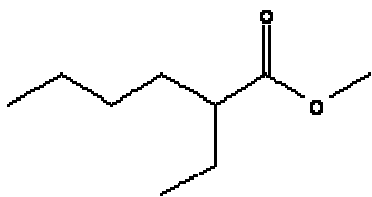


Feittsyrer som vart identifisert i prøve 6f og 7f

Heptanoic acid, methyl ester:



Hexanoic acid, 2-ethyl-, methyl ester:



Octanoic acid, methyl ester:



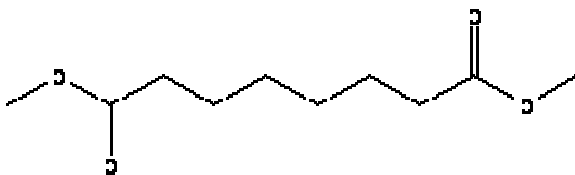
Nonanoic acid, methyl ester:



Decanoic acid, methyl ester:



Octanedioic acid, dimethyl ester:



Dodecanoic acid, methyl ester:



Nonanedioic acid, dimethyl ester:



Tridecanoic acid, methyl ester:



Tetradecanoic acid, methyl ester:



Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester:

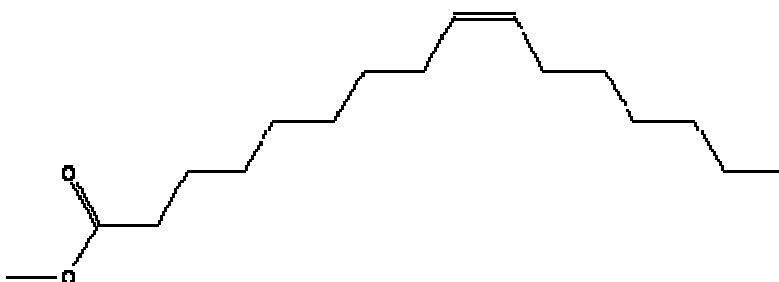




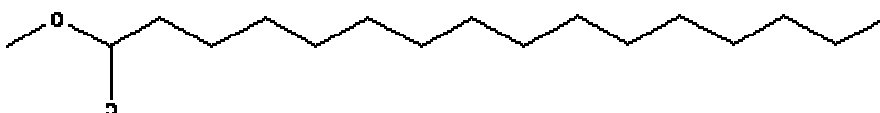
Pentadecanoic acid, methyl ester:



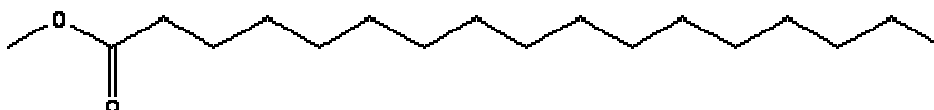
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-:



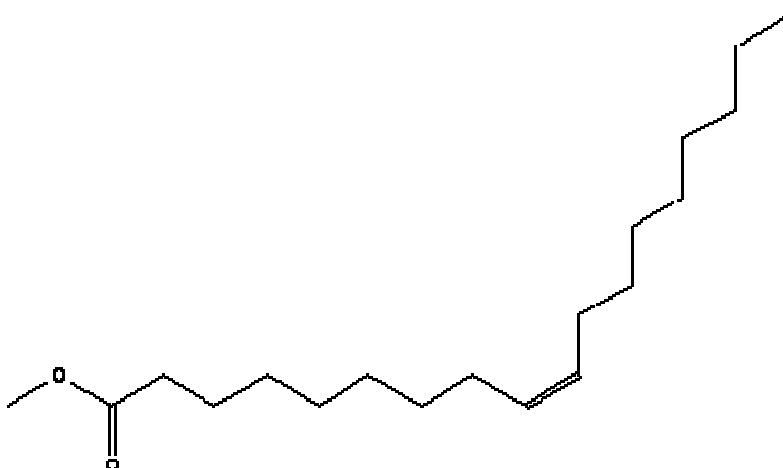
Hexadecanoic acid, methyl ester:



Heptadecanoic acid, methyl ester:



9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester:



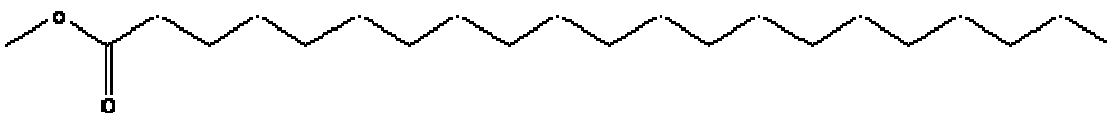
Octadecanoic acid, methyl ester:



Eicosanoic acid, methyl ester:



Heneicosanoic acid, methyl ester:



Docosanoic acid, methyl ester:



Tetracosanoic acid, methyl ester:

