

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT
ANALÜÜTILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Pilleriin Peets

**Metoodika arendus tekstiilivärvide uurimiseks looduslike punaste
värvainete näitel**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Teadur Signe Vahur, PhD

Prof Ivo Leito, PhD

Tartu 2016

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID JA MÕISTED	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. LOODUSLIKUD VÄRVAINED	6
1.2. VÄRVIMISTEHNİKAD JA PÕHIMÕTTED	9
1.3. PROBLEEMID VÄRVAINETE TUVASTAMISEL TEKSTIILIDEST	10
1.4. KIUDUDEST VÄRVAINETE EKSTRAHEERIMINE	10
1.5. ERINEVAD MEETODID LOODUSLIKE VÄRVAINETE TUVASTAMISEKS	11
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1. ANALÜÜSITAVAD STANDARDMATERJALID JA REAALSED PROOVID .	17
2.2. KASUTATAVAD REAGENDID JA LAHUSED	17
2.3. KASUTATAVAD SEADMED JA NENDE PARAMEETRID	19
2.4. LOODUSLIKEST ALLIKATEST VÄRVAINETE EKSTRAHEERIMINE JA KIUDUDE VÄRVIMINE	20
2.5. VÄRVAINETE EKSTRAHEERIMINE KIUDUDEST	21
3. TULEMUSED JA ARUTELU	22
3.1. PUNASTE VÄRVAINETE ANALÜÜS ERINEVATE MEETODITEGA	23
3.2. KASUTATUD MEETODITE VÕRDlus JA JÄRELDUSED	31
3.3. SEM-EDS ANALÜÜS KIUDUDES PEITSIDE TUVASTAMISEKS	33
3.4. REAALSETE PROOVIDE ANALÜÜS KOOSTATUD MEETODI ABIL	33
4. KOKKUVÕTE	35
5. SUMMARY	36
6. KASUTATUD KIRJANDUS	37
LISAD	41

KASUTATUD LÜHENDID JA MÕISTED

ACN - atsetonitril

ATR - nõrgendatud täielik sisepeegeldus

CHCA - α -tsüano-4-hüdroksükaneelhape

DHB - 2,5 –dihüdroksübensoehape

DMF - dimetüülformamiid

DMSO - dimetüülsulfoksiid

EDS - nergiadiispersiivne spektroskoopia

EDTA - etüleen-diamiin-tetraädikhape

ERM - Eesti Rahva Muuseum

ESI - elektropihustus-ionisatsioon

ESI- - elektropihustus-ionisatsioon negatiiv

FORS - fiiber optiline peegeldus spektroskoopia

FT - Fourier' teisendus

HCl - vesinikloriidhape

HPLC - kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

HRMS - kõrglahutusega massispektromeetria

ICR - ioonsüklotronresonants

IR - infrapunane

m/z - massi-laengu suhe

MALDESI - abimaatriksiga laser-desorptsioon elektropihustus ionisatsioon

MALDI - abimaatriksiga laserdesorptsioon-ionisatsioon

MS - massispektromeetria

ppm (*part per million*) - miljondik osa

Q - kvadрупool

QQQ - kolmekordse kvadрупooliga massianalüsaator

SEM - skaneeriv elektronmikroskoop

SERS - pinna poolt tugevdatud Raman hajumine

TOF-SIMS - lennuaja-sekundaarsete ionide massispektromeetria

TFA - trifluoroädikhape

UV - ultraviolet

VIS - nähtav

$\Delta m/z$ - massiviga

SISSEJUHATUS

Läbi ajaloo on kasutatud erinevaid looduslike värvaineid riideesemete ja muude tekstiilide (vaibad, kardinad, linad) värvimiseks. Värvained sisaldavad orgaanilisi ühendeid, mis annavad juba väga väikestes kogustes tooni. Enamus värvaine molekulid sisaldavad aromaatsust ning värvained jagatakse suurematesse gruppidesse nagu antrakinoonid, flavonoidid, tanniinid jne.

Ajalooliste objektide korral on kasutatud looduslike värvainete kindlakstegemine oluline, et saada selgemat ülevaadet värvainete kasutusest, kaubandusest ning värvimistehnoloogiatest erinevates maailmakohtades. Lisaks saab teavet inimeste eluviiside, harjumuste ja sotsiaalse staatuse kohta. Ajalooliste tekstiilide värvainete koostise teadmine on vajalik teave konservatoritele, võimaldades neil vajadusel teostada konserveerimist õigete materjalide ja meetoditega.

Tekstiilide värvimiseks kasutatud looduslike värvainete tuvastamisel on aga mitmeid probleeme, mis raskendavad sihile jõudmist. Ajalooliselt oluliste objektide juures on analüüsitud proovikogused enamasti väga väikesed, värvainete kontsentratsioonid proovides on madalad, värvide koostised keerulised (võivad koosneda samaaegselt tervest reast erinevatest ühenditest) ja värvaine võib olla ulatuslikult lagunenu. Kuigi erinevate looduslike värvainete valik on väga suur, on nende kättesaadavus küllaltki piiratud. Eriti raske on puhaste ainetena kätte saada värvainete komponente (flavokermeshape, santaliin A jne) ning seetõttu on proovide analüüsimiseks vaja väga tundlikke, vähe destruktiivseid ning võimalikult palju informatsiooni andvaid meetodeid. Lisaks on erinevaid värvainete allikaid (taimede koostis võib varieeruda kasvu kohast ja tingimustest) ning värvimisretsepte (millist peitsi ja lahustit kasutati, kaua ning milliseid kiude värviti) väga palju.

Käesoleva magistr töö üldesmärgiks on uurida instrumentaalmeetodite (HPLC-QQQ-MS, ESI-ja MALDI-FT-ICR-MS) abil erinevaid looduslike punaseid värvaineid ja nende looduslike allikaid (taimed, putukad), eesmärgiga saada neist võimalikult kvaliteetsed identifitseerimise võimaldavad massispektrid ja kromatogrammide, mille abil luua metoodika tundmatute punaste värvainete tuvastamiseks tekstiilikiududest. Lisaks tuvastada erinevatest värvainetest võimalikult paljud erinevad värvaine komponendid. Metoodika arenduseks valiti esialgu vaid üks toon (punane), kuna erinevaid värve ning neile vastavaid värvaineid on väga palju.

Lähtuvalt üldesmärgist saab teostatud uurimustöö jaotada järgmisteks etappideks:

- 1) Koguda erinevaid looduslike punaste värvainete standardeid ning teostada nendega värvimiskatsed. Saadud lahuste ja kiudude analüüsi tulemustest luua massispektrite ja kromatogrammide kogum, mida saab kasutada tundmatu värvaine tuvastamiseks.
- 2) Värvitud kiududest ekstraheerida värvained, võrreldes ekstraheerimismeetodeid ja nende efektiivsust.
- 3) Kasutades erinevaid instrumentaalanalüüsimeetodeid, uurida erinevates värvimis- ja ekstraheerimisetappides saadud värvilahuseid. Lisaks võrrelda erinevate analüüsimeetodite võimekust värvainete analüüsil tekstiilikiududest.
- 4) Analüüsi teostamiseks kasutada meetodeid nagu HPLC-(QQQ)-MS (kõrgefektiivne vedelikkromatograaf kolmekordse kvadрупool massispektromeetriga), MALDI-FT-ICR-MS (abimaatriksiga laser desorptsioon-ionisatsioon Fourier' teisendusega ioonsüklotronresonants massispektromeeter), ESI-FT-ICR-MS (elektropihustus ionisatsiooniga Fourier' teisendusega ioonsüklotronresonants massispektromeeter).

Kõikide eelnevate etappide teostamisel tahetakse luua ühtne metoodika tundmatutest tekstiiliproovidest punase värvaine tuvastamiseks kasutades erinevaid instrumentaalmeetodeid nagu HPLC-QQQ-MS ja FT-ICR-MS ESI ja MALDI ionisatsiooniallikatega. Metoodikat on võimalik hiljem laiendada kõikide teiste värvide jaoks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Tekstiili värvained on orgaanilised loomse või taimse päritoluga värvilised ühendid, mis annavad värvi juba väga väikestes kogustes. [1]

Loomsed ja taimsed kiud võtavad värvaineid erinevalt vastu ning seetõttu on värvimise juures oluline siduda õige värvaine õige kiuga. Parema pesemis- ja kulumiskindluse ning värviaine tugevamalt kiududega sidumise jaoks, kasutatakse värvimisel tihti peitse (maarjajääd, tinasoola, uriini jne). Peits on värvimisel abiaine, mille abil luuakse keemiline või füüsikaline side värvaine ja kiu vahele. Lisaks on peitsi abil võimalik saada erinevaid värvitoone. [1–4]

1.1. LOODUSLIKUD VÄRVAINED

Kiudude värvimisel on taimne tooraine alati olnud kõige olulisem [1]. Peamised kromofore sisaldavad ühendid looduslikes värvainetes on flavonoidid, antrakinoonid, indigoidid ja gallotanniinid. Lisaks esineb veel karotenoide, bensokinoone ja antotsüanidiine. [5, 6] Kuna käesoleva magistritöö raames uuritakse vaid punaseid looduslikke värvained, siis kirjeldatakse järgnevalt ainult taimseid ja loomseid punaste värvainete allikaid. Lisas 1 on toodud kõik antud töös kasutatavad värvainete allikad ja neis sisalduvad olulisemad värvainete komponendid.

1.1.1. TAIMSE PÄRITOLUGA PUNASED VÄRVAINED

Punavärvik (*Rubia tinctorum L.*) on kõige populaarsem lähteaine värvimiseks, mida on kasutatud juba antiikajast [7]. Punavärviku juured sisaldavad muljetavaldavas koguses erinevaid antrakinooni derivaate. Praeguseks on punavärviku juurtest eraldatud 36 erinevat antrakinooni, millest 15 mängivad rolli värvuse andmisel. Tuntuim neist on alisariin. Lisaks sisaldavad punavärviku juured järgnevat olulisemaid antrakinoone: pseudopurpuriin, rubiadiin, munjistiin ja kristofiin. Punavärvikut kasutades on võimalik saada väga palju erinevaid punaseid toone, sõltuvalt taime vanusest, värvimistehnikast ja kasutatavatest peitsidest. [4]

Värvisafloorist (*Carthamus tinctorius L.*) saadakse roosat, kirsipunast, roosakaspunast ja mooni punast värvi. Tehnika roosa ja punase saamiseks erineb kõikidest teistest värvainete saamise protsessidest ning värvimiseks kasutatakse vaid õisi. Põhiline värviandev ühend värvisaflooris on kartamiin, lisaks on taimest veel eraldatud anhüdrosafloori, isokartamiini

ning isokartamiini ja kartamiini hüdroksüetüülestrit. Erinevalt prekartamiinist ei lahustu kartamiin vees, kuid lahustub aluselises keskkonnas. Lisaks on õites palju vees lahustuvaid kollaseid ühendeid ning tegelikult on õites ainult 0,3-0,6% punaseid värvaineid. Värvained, mis saadakse värvisafloorist, seotakse kiududega otse ilma peitse kasutama. Värvaine lahustatakse esiteks aluselises keskkonnas ning lisatakse kiududele pärast seda, kui vann on happeliseks muudetud. [4, 8]

Siiltsesalpiiniapuu (*Caesalpinia echinata*) on punase taimse värvaine allikas, mida tunti juba enne Lõuna-Ameerika avastamist (15. sajandist). Värvimisel kasutatakse vaid lülipuitu ja suuremaid oksid. Põhiline värvaine siiltsesalpiiniapuu on brasileiin, mis tekib brasiliini autooksüdatsiooni teel. [2, 4, 9]

Sandlipuu (*Pterocarpus santalinus L.*) sisaldab endas erinevaid vees vähelahustuvaid ühendeid. Neid on küll raskem puidust kätte saada, kuid samas on need hiljem riide peal vastupidavamad pesemisele ja valgusele. Värvimiseks kasutatakse lülipuitu. Sandlipuu on 17% ühendeid nagu santaliin A ja B ning teisi flavonoide. Lisaks sisaldab puu endas palju tanniine, mis värvimisel käituvad peitsidena. [4, 10]

Verev vöödik (*Cortinarius sanguineus*) on laialt levinud mürgine seen Euroopas ja Põhja-Ameerikas. Verev vöödik sisaldab endas erinevaid antrakinoonide rühma kuuluvaid värvaineid nagu emodiin, dermotsübiin, dermorubiin jt. [4]

Värvialkanna (*Alkanna tinctoria*) korral kasutatakse värvaine saamiseks juuri, mis sisaldavad suures koguses naftokinoone. Värvialkannaga värvimiseks tuleb kasutada erinevaid metallipeitse ning värvainete kättesaamiseks taimest tuleb kasutada alkoholilahust. Kuna värvaine oli väga kallis ning samas valgustundlik, kadus see värvainete arenguga turult ning selle kasutus jäab pigem 17. ja 18. sajandisse. [4, 11]

1.1.2. LOOMSE PÄRITOLUGA PUNASED VÄRVAINED

Punase värvi saamiseks saab kasutada ka antrakinoone sisaldavaid putukaid. Enamik värvainete saamiseks kasutatavaid putukaid on parasiidid, kes on väga väikesed ning on üllatav, et neid nii ammu tähele pandi ja kasutama hakati. [4]

Kermes (*Kermes vermilio*) sisaldab põhiosas kermeshapet, mis kuulub antrakinoonide hulka. Lisaks on kermeses ka teisi kollaseid toone andvaid antrakinoone. Kermestäist saadakse sarlakpunast, mis on ajaloo üks kalleimaid värve. [4]

Ameerika avastamine (15. sajand) muutis oluliselt värvainete kaubandust ja turgu. Hispaania vallutajad märkasid Mehhikosse ja Peruuusse saabudes kohalike kangaste ergast ja ilusat punast värvi ning üsna pea algas košenilli import Ameerikast Euroopasse. Košenill (*Dactylopius coccus*) on parasiitputukas, keda leidub kindlatel taimedel ning tema kestast saab laias toonide valikus kvaliteetset veekindlat punast värvainet. Üle maailma on olemas erinevaid košenille, mis segatult erinevate peitsidega annavad erinevaid punaseid toone. Košenilli põhiline komponent on karmiinhape, mis erinevalt kermeshapest on kerge lillaka varjundiga. Lisaks karmiinhappele on sellest putukast leitud veel kermeshapet ja flavokermeshapet. [1, 4, 9]

1.1.3. EESTIS KASUTATUD PUNASED VÄRVAINED

Eesti rahvarõivastel kasutatud punane värv võib olla saadud värvmadara (*Galium boreale*) või lepakoorega (*Alnus incana*) värvimisest. Värvmadara juur sisaldab alisariini, mis annab kangale telliskivipunase värvi. Värvmadar võib anda toone roosast oranžini, olenevalt peitsist ja värvimistehnikast. Värvimiseks on kasutatud ka pehmet madarat (*Galium mollugu*) ja hobumadarat (*Galium verum*). Lepakoorega värvimisel tuleb punase värvi saamiseks koortekeedisele lisada maarjajääd. Lillakaspunaseid toone saadi mustsõstra, aroonia ja käokanniga värvides, erinevaid punaseid annavad ka õunapuukoored, kirsipuukoored, näsiniin (*Daphne mezereum*), liht-naistepuna (*Hypericum perforatum*), harilik pune (*Origanum vulgare*), peet ja harilik metsvits. Looduslikest välismaistest punastest värvainetest on Eestis aegade jooksul kasutusel olnud krapp e. punavärvik; siitselpiinipuu e. punapuu, košenill ja kermes. [12, 13]

Juba sajandeid on Eestis osatud kasutada ka erinevaid sünteetilisi ja loodusliku päritoluga peitse. Kemikaalidest tunti maarjajääd ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), vaskvitrioli ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), raudvitrioli ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), kaaliumdikromaati ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), viinhapet ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$), kaltsiumkarbonaati (CaCO_3), oblikhapet ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$), potast (K_2CO_3), tanniini, tinakloriidi (SnCl_2), viinakivi ($\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ja keedusoola (NaCl). Looduslike peitsidena kasutati hapukapsa vedelikku, jõhvikamahla, kurgisoolavett, haput kalja jne. Peitsimine intensiivistab ja muudab värvitoone ning suurendab lõngade valgus- ja pesukindlust. Tänu sellisele töötlusele ongi paljud sajanditevanused värvinäidised siiani säilinud. Kuid on ka leitud, et näiteks raudvitrioli liigne kasutamine kahjustab nii värvainet kui tekstiilikiudu. [12]

1.2. VÄRVIMISTEHNİKAD JA PÕHİMÕTTED

Teadmine, kuidas kiude värvida, erineb teadmisest, kuidas ja millised keemilised protsessid värvimisel toimuvad. Juba mitusada aastat tagasi hakkasid aga paljud keemikud sellest huvituma, kuid esimest korda hakati sellest tõeliselt aru saama sünteetiliste värvide kasutusele tulekuga. Praeguseks on üsna hästi teada, kuidas erinevad sünteetilised värvained kiududega seonduvad, kuid palju keerulisem on siiani aru saada, kuidas seonduvad looduslikud värvained kiududega. Seda kahel põhjusel: 1) looduslikes värvainetes on mitmeid erinevaid komponente ning paljude nende koostist ei teata siiani; 2) paljude värvainete keemiline afiinsus kiududega on väga nõrk ning tekstiilide värvimiseks tuleb kasutada lisandeid – peitse. Peitsid reageerivad värvainetega ja kiudude viisil, millest siiani täielikult aru ei saada. [4]

Enamus vajalikke värvained, mida kasutatakse tekstiilikiudude värvimisel, saadakse taimedest, samblikest, seentest ja putukatest. Värvide tuleb eraldada nende algupärasest allikast, eemaldades vahad ja vaigud nii, et säiliks värvaine. Seda tehakse läbi keeruliste protsesside, mis hõlmavad endas vesilahustes leotamist, keetmist ja fermentatsiooni ehk anaeroobset glükolüüsi. [1]

Põhilisi värvimistehnikaid on kolm: otsene värvimine, küüpvärvainetega värvimine ja peitsidega värvimine. [4]

Otsene värvimine sisaldab endas kindlate taimede leotamist või keetmist vees, kus kasutatav temperatuur sõltub kiust ja värvainest. Antud meetodit kasutatakse pigem erandlikes olukordades, kus värvaine komponendid taimedes omavad polaarseid funktsionaalrühmi, mis moodustavad sidemeid värvitava kiuga. [4]

Küüpvärvide meetodit kasutatakse indigoga ja molluskitest saadava lillaga värvimiseks. Värvitud olekus on need värvained lahustumatud, seega tuleb värvimise hetkel need lahustuvaks muuta ning kiududega siduda. Meetod põhineb reduktsiooni protsessil leeliselises keskkonnas. Kiud imab endasse värvained, kuid need on lahustuvad redutseeritud vormis, mis on väga nõrga värvusega. Kui kiud värvimisvaadist välja võtta ning need hapnikuga kokku puutuvad, sadestuvad indigo ja lilla kiule ning võtavad vastavalt sinise või lilla värvuse. Täpne sidemete olemus värvainete ja kiudude vahel on siiani vaid oletus. [4, 6]

Suur osa värvainete molekulidest, mida inimkond on õppinud ekstraheerida taimedest ja loomadest, ei seostu tugevalt tekstiilikiududega. Samas saab mitmeid neid värvaineid siduda erinevate metallisooladega, mille abil värvained kiududega paremini seonduvad. Neid aineid hakati 18. sajandil kutsuma peitsideks. Täpne töömehhanism pole siiani selge. Enamasti

leotatakse tekstiile esiteks peitsis ning seejärel värvitakse värvainega. Peitsidena on katsetatud nii mineraalseid aineid, nagu soolad, metallioksiidi, muda, kui ka orgaanilisi materjale nagu uriin, väljaheited, veri, rasvad. [4]

Milliseid meetodeid, milliste looduslike värvainete jaoks kasutati, on oluline teadmine, et valida õigeid meetodeid värvainete lahustamiseks kiududest [6].

1.3. PROBLEEMID VÄRVAINETE TUVASTAMISEL TEKSTIILIDEST

Värvainete tuvastamise juures tekstiilidest esineb neli põhilist probleemi: (1) proovi kogused on enamasti väga väikesed; (2) materjalides on värvainete kontsentratsioonid väga madalad; (3) materjalis on palju muid ühendeid, sh lagunemise produkte ning (4) enamasti puudub informatsioon värvimistehnika (st. retsepti) kohta. Lisaks võib kangas olla värvitud mitme erineva värvaine seguga. Kuna värvainete kogused proovides on väga väikesed, on vaja analüüsimeetodeid, mis suudavad töötada väga väikeste proovi kogustega. Kuna proovid on sageli ajaloolise väärtusega, on eelistatud võimalikult vähedestruktiivsed meetodid. [3, 6, 14, 15]

Lisaks eelnevalt kirjeldatud probleemidele on raskendatud ka värvainete standardite kasutamine, kuna neid on väga palju ning tihti ei ole neid kommertsiaalselt saada. Puhtaid värvaine komponente (nt brasiliin, emodiin) on vähe müügil või on nende hinnad väga kõrged. Samuti ei ole lihtne leida erinevaid värvaine standardeid. Selle probleemi lahendamisel on suur roll just massispektromeetria (MS) meetoditel, mis sageli võimaldavad ühendeid identifitseerida ka ilma standardaineteta, kasutades kirjandusest saadud informatsiooni ühendite kohta, mis peaks olema värvainete allikates. [15]

1.4. KIUDUDEST VÄRVAINETE EKSTRAHEERIMINE

Paljude analüüsimeetodite korral on selektiivsuse ja tundlikkuse seisukohalt väga oluline õige proovi eeltöötlus. Ekstraktsioon, või pigem värvaine kangast välja leotamine, on värvainete uurimisel enamasti esimene samm, kuna enamus värvainete uurimismeetoditest vajavad analüüte lahustunud kujul (nt vedelikkromatograafia, massispektromeetria). Ekstrakti keemiline koostis ajaloolise materjali puhul sõltub loodusliku allika päritolust, värvimistehnikast, objekti vanusest, hoiustamisest, vananemisprotsessidest ja ekstraktsiooni

tingimustest. Ekstraktsioonimeetodi valik sõltub määratavate komponentide omadustest ja maatriksist. [2, 5, 16, 17] Otsese värvimisprotsessiga värvid ekstraheeritakse vee või alkoholide abil [5]. Küüpvärvid on vees lahustumatud ning nende lahustamiseks kasutatakse lahusteid nagu püridiin [2, 5, 16], dimetüülformamiid (DMF) ja dimetüülsulfoksiid (DMSO) [2, 5].

Peitsvärvidega värvitud kiudude korral tuleb kasutada aga agressiivseid kemikaale, enamasti tugevate hapete lahuseid [2, 5, 16, 17]. Erinevaid lahusteid ja meetodikaid värvainete väljaekstraheerimiseks kiududest on väga palju. Kõige tavalisem lahusti peitsvärvide ekstraheerimisel on metanool-vesi-37% vesinikkloriidhape (HCl) lahus. Pärast ekstraheerimist aurustatakse lahus pealt ning järelejäänud värvaine lahustatakse metanool-vesi (1:1, v/v) segus. Samas ei ole see meetodika efektiivne näiteks indigovärvide korral ning sel juhul kasutatakse lahustina DMF. [2, 9, 15, 16, 18, 19] Kuna selle meetodika korral kasutatakse tugevat hapet, võib see lisaks värvainete ekstraheerimisele neid osaliselt ka lagundada ning kahjustada riidekiude. Seetõttu on järjest enam hakatud uurima õrnemaid ekstraheerimismeetodeid. Näiteks kasutatakse HCl asemel metaanhapet või hoopis EDTA (etüleendiamiintetraädikhape) lahust. [2, 17] Lisaks on tehtud katsetusi sidrunhappega, oblikhappega, TFA-ga (trifloroädikhape) ning metaanhappe ja EDTA seguga. [19] Ka vesi-metanool lahuse asendamine DMSO, DMF või nende metanooli segudega võib parandada tulemusi. [20]

1.5. ERINEVAD MEETODID LOODUSLIKE VÄRVAINETE TUVASTAMISEKS

Kuna tekstiilivärvid koosnevad paljudest komponentidest, põhinevad peamised uurimismeetodid nende ühendite eraldamisel maatriksist ja seejärel identifitseerimisel. Erinevaid ühendeid segus on uuritud nii kvalitatiivselt kui kvantitatiivselt. Kvantitatiivne analüüs on olnud kasutusel eeskätt selleks, et võrrelda erinevate komponentide suhtelisi koguseid erinevates taimedes. Eraldusmeetoditena on kasutusel kromatograafia ja elektroforees. [6]

Levinumaks detektoriks on UV-Vis (ultraviolet-nähtav) spektromeetriline detektor, s.h. dioddrivi detektor [7, 16, 17]. Viimasel ajal on aga üha populaarsemaks muutunud massispektrometria [7, 15, 20]. Kasutatud on ka fluorestsents-detektorid, kuid selle puuduseks on see, et kõik värvained ei fluorestseeru [6].

Lisaks on katsetatud ka meetodeid nagu näiteks FORS (fiiber optiline peegeldus spektroskoopia) [6], Raman hajumine [6], SERS (pinna poolt tugevdatud Raman hajumine) [6, 21, 22], IR-MALDI-ESI-FT-ICR-MS (infrapunane abimaatriksiga laser-desorptsioon elektropihustus ionisatsioon massispektromeetria) [23], TOF-SIMS (lennuaja-sekundaarsete ioonide massispektromeetria) [14].

Järgnevalt on pikemalt kirjeldatud neid analüüsimeetodeid, mida antud uurimistöö praktilises osas kasutatakse.

1.6. VEDELIKKROMATOGRAAFIA LOODUSLIKE VÄRV- AINETE ERALDAMISEKS

Looduslikud värvained koosnevad sageli paljude erinevate ühendite segust ning seetõttu on mõistlik analüüdid enne detekteerimist üksteisest eraldada. Vedelikkromatograafia korral toimub ainete eraldamine nende jaotumisel mobiilse ja statsionaarse faasi vahel. [24] Kromatograafilisel eraldusel kasutatakse pöördfaaskromatograafiat, kuna enamik looduslike värvaineid on polaarsed, veeslahustuvad ühendid. Pöördfaaskromatograafia korral on statsionaarne faas vähepolaarne ja mobiilne faas polaarsem. Kõige levinuimaks statsionaarseks faasiks on C18, kuid erinevad katsetused on näidanud positiivseid tulemusi ka C4, C8 ja NH₂ kolonniga. Mobiilseks faasiks kasutatakse enamasti metanooli või atsetonitriili (ACN) segu puhverlahusega gradientelueerimisel. Kõrgema polaarsuse, odavama hinna ja madalama toksilisuse tõttu soovitatakse kasutada metanooli. Kasutatakse gradientelueerimist happelise eluendiga, kuna enamikud värvainete komponendid sisaldavaid happelisi rühmi ja happeline eluent tõrjub nende molekulide dissotsiatsiooni tagasi. Analüütide eraldamine on analüüsil väga tähtis samm, kuna värvaine võib degradatsiooni, pesemise, kanga vale hoiustamise ja värvainete kõrge värvusintensiivsuse tõttu olla väga väikestes kontsentratsioonides. Lisaks sellele on erinevaid värvaineid väga palju ning need on üksteisele sarnased. [3, 6, 7, 16, 17, 20]

1.7. MASSISPEKTROMEETRIA (MS) ÜHENDITE IDENTIFITSEERIMISEKS JA KARAKTERISEERIMISEKS

Et saada usaldusväärset informatsiooni ajaloolise eseme kohta on vaja tuvastada kõiki erinevaid värvaine komponente, mida uuritav materjal endas sisaldab. Et seda saavutada on

vaja kõrge selektiivsusega, spetsiifilist ja tundlikku meetodit. MS on üks võimsamaid meetodeid, et tuvastada, karakteriseerida struktuurselt ning kvantifitseerida laias valikus ühendeid. [6, 20]

Massispektromeetria korral on esimeseks sammuks komponentide viimine gaasifaasilisse ioonisse vormi. Tekivad nii positiivse kui negatiivse laenguga molekulaarioonid, mis võivad edasi omakorda veel fragmenteeruda. Kõiki neid ioone saab detekteerida ning massispektris esinevad need kõik vastavalt nende kvantitatiivsetele sisaldustele. [25]

Pärast ainete ioniseerumist, suunatakse tekkinud ioonid massianalüsaatorisse, kus ioonid eraldatakse vastavalt nende massi ja laengu suhte alusel elektri- ja/või magnetväljas. Lõpuks registreeritakse tekkivate ionide massi-laengu suhted (m/z) ning tulemuseks saadakse massispekter. Detekteerimiseks kasutatakse massispektromeetrias n-ö ionide lugemist. [25]

Käesoleva töö praktilises osas kasutatud ionallikatest, massianalüsaatoritest ja detektoritest on pikemalt kirjutatud järgnevas peatükis 1.7.1 – 1.7.4.

1.7.1. MALDI ANALÜÜTIDE IONISEERIMISEKS

MALDI e. abimaatriksiga laserdesorptsioon-ionisatsioon on makromolekulide uurimisel palju kasutuses, kuid sellel meetodil on mitmeid eeliseid ka väikeste molekulide uurimiseks. Proovi eeltöötlus on lihtne, massispektri registreerimine kiire, meetod tundlik ning lisaks ei sega erinevad lisandid analüüsi. MALDI korral on tegemist pehme ionisatsiooniga ehk esineb vähe fragmenteerumist. [26]

MALDI on ionisatsioonimeetod, kus ioonid tekitatakse vahetult tahkest olekust. MALDI korral segatakse proovilahus maatriksaine lahusega, mis sisaldab väikseid orgaanilisi molekule, mis neelavad laserikiirgust. Segu kuivatatakse lahustist ning alles jäävad kokkristalliseerunud analüüdi ja maatriksi molekulid. Segu kiiritatakse lühiajaliselt laseriga vaakumkeskkonnas ning kiirguse neeldumise tulemusel maatriksis, toimub proovi viimine gaasifaasi. Maatriksaine aurustub koos analüüdiga ning tekivad analüüdi ioonid (põhiliselt annab ühelaengulisi ioone). Ionisatsiooni reaktsioonid võivad toimuda vaakumkeskkonnas erinevatel etappidel. Lisaks keemilisele ja füüsikalisele ionisatsioonile võib toimuda gaasifaasi fotoionisatsioon, ergastatud olekus prootoni ülekanne, ioon-molekul reaktsioon jne. [25] MALDI-s sobiva maatriksaine valimine on võtmetähtsusega, kuna see peab neelama kasutatava laseri lainepikkusel (analüüt ei tohi sellel sagedusel kiirgust neelata), kristalliseerudes peab see siduma analüüdi molekulid ja aitama kaasa analüüdi molekulide

ioniseerumisele ning peab olema vaakumis stabiilne. Levinumad maatriksained on näiteks 2,5-dihüdrosübensoehape (DHB), α -tsüano-4-hüdrosükaneelhape (CHCA) jne. [27]

1.7.2. ESI ANALÜÜTIDE IONISEERIMISEKS

Uuringud on näidanud, et ESI e. elektropihustus-ionisatsioon negatiivses režiimis sobib paremini happelisi rühmi sisaldavate ühendite jaoks nagu antrakinoonidel, flavonoididel ja tanniinidel põhinevad värvained [5, 15, 20].

ESI saadakse tugeva elektrivälja rakendamisel peenest düüsist väljuvale vedelikujoale atmosfäärirõhul. Elektrivälja tagajärjel tekib laengute kogunemine vedeliku pinnale kapillaari otsas ning moodustuvad laetud tilgad (ESI- režiimis on tilgad negatiivse laenguga). Tilgad juhatakse läbi kuuma inertgaasi voolu, et eemaldada solvent. Mida enam tilgad kaotavad solvendi molekule, seda suuremaks muutub elektrivälja tilga pinnal. Kui elektrivälja tilga pinnal saab piisavalt suureks, siis tilk puruneb väiksemateks tilkadeks. Kui tilk muutub piisavalt väikeseks, siis toimub elektrivälja mõjul ionide eraldumine tilga pinnalt. ESI- režiimil ainete detekteerimise eelduseks on anioonide moodustumise võime. Kuna ionide eraldumine toimub tilga pinnalt, on meetodi tundlikkus kõrgem nende ühendite suhtes, mille ionide kontsentratsioon pinnal on suurem e. lipofiilsemaid ioone andvate ühendite suhtes. ESI korral võivad suuremad molekulid rohkemate ioniseerumiskohtade tõttu omada mitut laengut. [25]

1.7.3. KVADRUPOOL (Q) JA KOLMEKORDNE KVADRUPOOL (QQQ) MASSIANALÜSAATORITENA

Kvadrupool-massianalüsaator on seade, mis kasutab ionide liikumistrajektooride stabiilsust ostsilleerivas elektriväljas, et eraldada ioone nende massi-laengu suhte järgi. Kvadrupool-analüsaator koosneb neljast paralleelselt asetsevast vardast, millele rakendatakse samaaegselt alalispotentsiaal ja vahelduvpotentsiaal. Vastavalt nende kahe potentsiaali kombinatsioonile, pääsevad läbi varraste kindla massi-laengu suhtegaioonid. [25, 28]

Tandemkvadrupool-massianalüsaatori korral on mitu kvadrupooli üksteise järel reas. Kolmekordse kvadrupooli korral kasutatakse esimest ja kolmandat kvadrupooli massianalüsaatoritena ning keskmist kvadrupooli ionide fragmenteerimiseks. Esimeses kvadrupoolis valitakse välja eellasioonid, mis lastakse teise kvadrupooli. Teises kvadrupoolis

toimub nende fragmenteerimine ning kolmandas kvadрупoolis eraldatakse üksteisest saadud fragmendid ning suunatakse detektorisse. [25]

1.7.4. FOURIER' TEISENDUSEGA-IOONTSÜKLOTRONRESONANTS- MASSISPEKTROMEETER (FT-ICR-MS) MASSIANALÜSAATORINA

FT-ICR-MS võimaldab analüüsida aineid kõrgeima võimaliku massilahutuse (kõrge lahutusvõime $R > 100\ 000$) ja massi mõõtmise täpsusega (< 1 ppm) ning on kasutatav erinevate ionisatsioonimeetoditega. See võimaldab detekteerida ja identifitseerida laia valikut analüüte väga erinevates maatriksites. [27, 28]

FT-ICR-MS korral viiakse tekitatud ioonid nn ICR raku, mis asub kõrges vaakumis (rõhk $n \cdot 10^{-10}$ mbar) ja ülitugevas magnetväljas. Ioonid liiguvad ringikujulisel trajektooriga ümber magnetvälja telje. Tsüklotroonimise sagedus on võrdelises sõltuvuses magnetvälja tugevusega ja pöörvõrdelises sõltuvuses iooni massi-laengu suhtega. [29]

Mõjutades tsüklotroonivaid ioone pulseeriva elektromagnetväljaga, mille sagedus on võrdne tsüklotrooniva iooni sagedusega, läheb ioon välise väljaga resonantsi ja neelab energiat. Neeldunud energia muundub iooni kineetiliseks energiaks, mis põhjustab trajektoori raadiuse suurenemise. Sellist mõjutust nimetatakse ergastamiseks. Ergastusimpulsi lõpetamisel muutub iooni raadius taas konstantseks, aga on nüüd suurem. Selleks, et ioone detekteerida, peavad nad ringlema väikestes pakettides, st olema faasis, oma kindlal orbiidil. Sama m/z suhtega ioonid, mis on ergastatud sama energiaga, asuvad ühel orbiidil ning ringlevad sama sagedusega. Ioonid tuleb ergastada väga lühikese aja jooksul, et nad ergastuksid ja läheksid faasi – grupeeruksid ühte tihedasse kimpu. [25]

Ergastatud ioone detekteeritakse mõõtes nende poolt tekitatud elektromagnetvälja võnkumist ICR raku küljplaatide vahel. Saadava signaali kuju ühe ja sama massi-laengu suhte korral on lihtne sinusoid, mille sagedus on sama, mis tsüklotroonimise sagedus ja amplituud on võrdelises sõltuvuses ioonide arvuga. Fourier' teisendusega massispektromeetri korral kogutakse kõikide massi-laengu suhetega ioonide sagedusi sisaldav pingimpulss. Rakendades kogutud impulsile Fourier' teisendust, saadakse sagedusspekter, millest teisenduste abil soovitakse massispekter. [25]

1.8. SEM-EDS

Skaneeriva elektronmikroskoobi (SEM) abil saab registreerida pildi proovi pinnast, kasutades fokuseeritud elektronkiirt. Võimalik on saada kuni 10^5 -kordseid suurendusi. [30]

Energiadispersiivne spektroskoopia (EDS) on röntgenkiirgusel põhinev elementanalüüs. Proovi kiiritamisel röntgenkiirgusega tekitatakse ergastatud ioonid ning sisekihist lüüakse elektrone välja. Kõrgemate kihtide elektronid täidavad väljalöödud elektronide poolt tekitatud elektrontühimikud, mille käigus tekib aatomile karakteristiklik sekundaarne röntgenkiirgus. EDS meetodiga on võimalik detekteerida süsinikku ja sellest raskemaid elemente. [31]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. ANALÜÜSITAVAD STANDARDMATERJALID JA REAALSED PROOVID

Antud uurimistöös kasutati kiudude värvimiseks ja värvainete koostise uurimiseks Kremer Pigmente GmbH & Co. KG-st ja Eesti Rahva muuseumist (ERM) saadud taimi, putukaid ja ekstrakte. Kremer Pigmente'st pärinevad punavärvik, värvisafloor, värvialkanna, siiltsesalpiiniapuu ekstrakt, sandlipuu, košenill ja kermes. ERM-ist on saadud punavärviku juur ning vereva vöödiku seen. Kõik antud töös kasutatavad värvained ja neile iseloomulikud värvaine komponendid on toodud Lisas 1.

Värvitavaks kiuks kasutati puhast töötlemata ja värvimata lambavilla lõnga (erakollektsioonist, Hiiumaalt).

Standardainetena kasutati ka alisariini (*Reakhim*), purpuriini (*Sigma-Aldrich*) ja karmiinhapet (*Reakhim*).

Reaalsete proovidena kasutati ERM-st saadud kiutükke ning erakogust saadud rahvariide seelikute kiude. ERM proovid olid peamiselt erinevad vanaaegsed vaibad ja konservaatori enda poolt vereva vöödikuga värvitud lambavilla kiud.

Kõik saadud reaalsed proovid kaaluti, mõõdeti nende ATR-FT-IR (nõrgendatud täieliku sisepeegeldusega Fourier' teisendusega infrapunase) spektrid, et kinnitada kiu tüüp ning vaadeldi neid optilise mikroskoobi abil. Kiu proovide kaalud olid vahemikus 0,001-0,0406 g. Kõik kiud olid villakiud.

2.2. KASUTATAVAD REAGENDID JA LAHUSED

1) Värviaidvate ainete väljaleostamiseks taimedest ja putukatest kasutati MilliQ vett (puhastatud *Millipore Advantage A10 MILLIPORE GmbH Molsheim, Prantsusmaa*) ja etanooli (*Keemiakaubandus AS*). Värvisafloori korral pH muutmiseks Na_2CO_3 (*Reakhim*) ja äädikhapet (*Sigma-Aldrich*).

2) Värvainete ekstraheerimisel kiududest kasutati metanooli (*Chromasolv, Sigma-Aldrich*), DMSO (*Sigma-Aldrich*), MilliQ vett, H_2EDTA lahust (*Sigma-Aldrich*) ja HCl (*Sigma-Aldrich*) lahust.

3) MALDI-FT-ICR-MS analüüsil maatriksainena DHB lahus - 150 mg DHB-le (*Sigma-Aldrich*) lisati 0.5 ml ACN (*J.T. Baker*) ja 0.5 ml 0.1% TFA (*Sigma-Aldrich*) MilliQ vees. Lahust hoiustati sügavkülmas.

4) Väliseks kalibreerimiseks CALMIX – ProteoMass kalibrandid (*Sigma-Aldrich*) lahustati 20% ACN (*J.T. Baker*) vesilahuses (*MilliQ*). Kalibrantide segule lisati DHB lahust. Välimine kalibreerimine on vajalik massitelje umbkaudseks kalibreerimiseks.

5) ESI-FT-ICR-MS korral kasutati pH reguleerimiseks ammoniaagilahust (*Keemiakaubandus AS*) ja lahendamiseks metanooli (*Chromasolv, Sigma-Aldrich*) ja MilliQ vett.

6) Sisekalibrante kasutati massitelje täpseks kalibreerimiseks ESI ja MALDI-FT-ICR-MS korral. ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS korral kasutati negatiivses režiimis superhappeid (CH- ja NH-happed) (Tabel 1) ja MALDI-FT-ICR-MS korral positiivses režiimis fosfaseene, DHB piike [32] ja amiini (Tabel 1).

Tabel 1. Töös kasutatavate sisekalibrantide ioonvalemid ja täpsed m/z väärtused

Ioonvalem (negatiivsed kalibrandid)	Iooni täpne m/z	Ioonvalem (positiivsed kalibrandid)	Iooni täpne m/z
$C_4F_9NO_2S^-$	296.95115	$C_7H_5O_3^{+*}$	137.02332
$C_4F_9O_6S_3^-$	410.87188	$C_{16}H_{36}N^{+**}$	242.28423
$C_{12}F_{10}NO_4S_2^-$	475.91145	$C_{13}H_9O_5^{+*}$	245.04445
$C_8F_{17}NSO_2H^-$	497.94620	$C_{12}H_{26}N_4P^+$	257.18896
$C_8F_{18}NO_4S_2H^-$	579.89868	$C_{12}H_{27}N_5P^+$	272.19986
$C_{12}F_{26}NO_4S_2^-$	779.88591	$C_{14}H_9O_6^{+*}$	273.03936
		$C_{19}H_{29}N_4PF_3^+$	401.20765
		$C_{21}H_{13}O_9^{+*}$	409.05541
		$C_{21}H_{14}O_{10}Na^{+*}$	449.04792
		$C_{26}H_{45}N_7P_2Cl^+$	552.28947
		$C_{28}H_{18}O_{13}Na^{+*}$	585.06396
		$C_{35}H_{22}O_{16}Na^{+*}$	721.08001
		$C_{44}H_{82}N_{13}P_4^+$	916.57611

* DHB

**amiin

7) HPLC-ESI-QQQ-MS analüüsil eluendiks ACN (*Chromasolv, Sigma-Aldrich*), metanool (*Chromasolv, Sigma-Aldrich*) ja puhverlahus pH=5.75 (*ammooniumatsetaat - Fluka; sipelghape - Fluka*) MilliQ vees.

8) Palmitiinhappe (*Sigma-Aldrich*) ja steariinhappe (*Sigma-Aldrich*) HPLC-QQQ-MS analüüsil. Neid kasutati, et kinnitada nende piikide retensiooniaegu, kuna need esinesid paljudes looduslike lahuste kromatogrammides.

2.3. KASUTATAVAD SEADMED JA NENDE PARAMEETRID

- 1) Analüütiline kaal värvainete ja kiudude kaalumiseks (*Sartorius LA230S, Saksamaa*).
- 2) Termostateeritud kokkuauruti värvainete ekstraheerimiseks kiududest (*PIERCE, USA*).
- 3) ATR-FT-IR spektromeeter kiudude analüüsiks (*Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR* spektromeeter ATR mikroanalüsaatori, CSI kiirelõhesti ja DLaTGS detektoriga). ATR-FT-IR spektrite analüüsiks kasutati meetodit minu bakalaureusetööst „Tekstiilikiudude analüüs ja klassifitseerimine ATR-FT-IR spektroskoopia meetodil“ [33], mille osa tulemusi on avaldatud ajakirjas *Anal Bioanal Chem* [34] ning kõikide tulemuste põhjal kirjutatud artikkel on esitatud avaldamiseks ajakirja *Spectrochimica Acta Part A* [35].
- 4) SEM-EDS - Analüüsid teostati *Zeiss EVO MA15* skanneeriva elektronmikroskoobiga (SEM), mis on ühendatud *Oxford X-MAX* energiadispersiivse spektrometriga (EDS). Proove analüüsiti madalvaakumis, mistõttu puudus vajadus neid eelnevalt juhtiva materjaliga katta. Mõõtmiseks pandi kõik uuritavad värvitud tekstiiliproovid kahepoolsele teibile. Mõõtmispinge oli 20 keV ning spektreid töödeldi programmiga *Aztec*.
- 5) HPLC-ESI-QQQ-MS – Kasutati kromatograafi *Agilent Infinity 1290*, kolonniga *Zorbax RRHD SB-C18*, mille mõõtmed olid 2.1 x 50 mm ning osakeste suurus 1.8 µm. Kolonni temperatuur oli 25 °C. Kasutati gradienti vahemikega: 0-7 min 95% puhver - 5% puhver, 7-8 min 5% puhver, 8-9 min 5% puhver – 95% puhver. Voolukiiruseks oli 0,3 ml/min ning süstitavaks koguseks 1 µl. Detekteerimiseks kasutati massispektrometrit *Agilent Technologies 6495 Triple Quad LC/MS* (pihustusgaas: 20 psi; kuivatusgaas: 14 L/min 250 °C; kardingagaas: 11 L/min, 350 °C; kapillaaripinge 3500V; MS/MS analüüsil kogumisaeg 200 millisekundit ja pörkeenergia 20V).
- 6) MALDI-FT-ICR-MS - *Varian 930 FT-ICR-MS*, 7 Tesla ülijuhtmagnetiga, laser *New Wave Orion 50083 Nd:YAG* (355 nm, 4-mJ energia, sagedus 5 Hz). Enamus mõõtmisi teostati *m/z* vahemikus 100-800. Kasutati ka *m/z* piirkonda 100-1200. Laiemat uurimispiirkonda kasutati värvisafloor lahuste analüüsiks. MALDI ionisatsiooni korral uuriti värvaineid põhiliselt positiivses režiimis. Esialgsed katsetused tehti ka negatiivses režiimis.
- 7) ESI-FT-ICR-MS hübriidinstrument *Varian J320* kombineeritud *910 ICR-MS* instrumendiga. Infuseerimiskiirus 10 µL/min. Nõelapinge -4000V. *Shield* -600V. Pihustusgaasi rõhk 40 psi. Kuivatusgaasi rõhk 10 psi ja temperatuur 300 °C. Enamasti *m/z* vahemik 100-800. Kasutati kapillaari vaikepinget uuritud massivahemiku jaoks. Detektoriks

Varian 910 FT-ICR-MS, 7 Tesla ülijuhtmagnetiga. ESI ionisatsiooni korral uuriti värvaineid negatiivses režiimis.

2.4. LOODUSLIKEST ALLIKATEST VÄRVAINETE EKSTRAHEERIMINE JA KIUDUDE VÄRVIMINE

Värvainete standardlahuste valmistamiseks ei ole ühtset retsepti ning iga värvaineallikas nõuab erinevat töötlust. Kuna erinevaid retsepte on väga palju, kombineeriti ajakirjas *Renovatum* 1991 Eve Järvoja poolt avaldatud artiklis „Taimedega värvimine“ [12] ja internetist leitud erinevad retseptid [36, 37] ning kohendati neid koguste ja keetmisaegade osas. Lahustina kasutati enamasti MilliQ vett, välja arvatud sandlipuu ja värvialkanna puhul, kus kasutati 40% etanooli lahust ning värvisaflooril muudeti erinevates värvimisetappides lahuse pH, kasutades Na₂CO₃ ja äädikhapet.

Kiudude värvimisetapp on oluline, et uurida, millised värvainelahuses olevad komponendid kiududega üldse seonduvad. Lisaks kasutati isevärvitud kiude ka nn testproovidena, mille peal katsetati värvide kiududest väljaekstraheerimise meetoodikaid.

Värvainete standardlahuste valmistamine ja üldine värvimisprotseduur oli järgmine:

- 1) 1 g taime või putuka massi kaaluti, lisati sellele 30 ml MilliQ vett (või etanooli lahust) ning jäeti ööseks ligunema (16 h).
- 2) Lisati öö otsa seisnud lahusele veel 20 ml MilliQ vett (või etanooli lahust) ning kuumutati lahust. Kuumutamisaeg oli erinevate värvainete korral erinev, varieerudes 10 minutist 4 tunnini.
- 3) Taime- ja putukatükid filtreeriti lahusest välja, lisati eelnevalt pestud ja vees leotatud lambavillakiud ning kuumutati lahust 2 tundi. Värvisafloori lahusesse lisati ka üks marlitükk (puuvill), kuna selle värvaine abil värvus villakiud ainult kollaseks, puuvill aga erkroosaks (vt Lisa 2).

Värvitud kiud kuivatati filterpaberil õhu käes (pimedas) umbes 2 päeva ning edasi hoiustati suletud kotis ja pimedas.

Värvainete väljalahustuvuse uurimiseks tehti hiljem ka katse, kus taimi/putukaid leotati üle öö (16 h) MilliQ vees (etanoolilahuses sandlipuu ja värvialkanna korral), seejärel kuumutati 30 minutit ja edasi veel 60 minutit.

Erinevatel etappidel võeti kõikidest lahustest proove analüüsiks. Lisas 2 on toodud illustreeriv informatsioon uuritavatest lahustest ja värvitud kiududest.

2.5. VÄRVAINETE EKSTRAHEERIMINE KIUDUDEST

Värviained ekstraheeriti eelnevalt enda värvitud kiududest ning ERM-ist ja erakogust saadud reaalsestest proovidest. Ekstraheerimismetoodika katsetused teostati ERM-ist saadud erinevate peitsidega värvitud vereva vöödiku kiududega.

Katsetati kahte ekstraheerimismetoodikat [17]: HCl ekstraheerimine ja pehmem meetod EDTA-ga. Kuna HCl-ga kiu töötlemine võib osadele värvainetele olla kahjulik, teostati ekstraheerimine kolmes etapis. Kaaluti umbes 3 mg kiudu ning esiteks lisati sellele 200 µL vesi-metanool (1:2, v/v) lahust ning soojendati 10 minutit lahust vahepeal loksutades. Saadud ekstrakt eraldati puhtasse Eppendorfi tuubi ning kiule lisati 200 µL DMSO, kuumutati 10 minutit ning saadud ekstrakt lisati eelnevalt saadud vesi-metanool ekstraktile. Seejärel lisati samale kiule 200 µL HCl-metanool segu (3M HCl vesilahus + metanool, (1:1, v/v)), kuumutati 100 °C juures 10 minutit ning lahus eraldati uude Eppendorfi tuubi. Saadud lahustelt aurustati nõrga lämmastikvooga lahustid. Mõlemale järelejäänud tahkele osale lisati 50 µL vesi-metanool (1:1, v/v) lahust ning pärast loksutamist segati lahused kokku.

EDTA meetodi korral kaaluti 3 mg kiudu, lisati 400 µl 0,001 M H₂EDTA/atsetonitriil/metanool (2:10:88, v/v/v) lahust ning kuumutati 60 minutit. Seejärel aurustati lahusti lämmastikvoo abil ning järelejäänud tahkele osale lisati 100 µL vesi-metanool (1:1, v/v) lahust.

Kuna kõik isevärvitud kiud olid peitsideta, kasutati nendest kiududest värvi ekstraheerimiseks vaid vesi-metanool ja DMSO etappe ning varieeriti lahuste koguseid, kuna lahusti aurutamine oli aeganõudev.

Reaalse proovina kasutatava rahvariideseeliku korral kasutati nii EDTA kui HCl meetodit, kuid reaalsele ERM-i proovidele rakendati vaid HCl meetodit ning proovi kogused olid 1 mg. HCl meetodit rakendati reaalsele proovidele, kuna katsetuste käigus andsid HCl meetodid võrreldes EDTA-ga sama või parema tulemuse. Lisaks on HCl meetod kirjanduse andmetel paremini välja töötatud ning teised pehmemad ekstraheerimismetodid vajavad lisakatseid ja uurimist. Samuti varieeriti proovide korral lahustite koguseid ja kuumutamise aega. ERMi proovide korral, kus kiudu võeti vähem, lisati igas etapis vaid 100 µl lahustit. Värvaine lahustamiseks viimases etapis lisati 50 µl asemele 30 µl vesi-metanool (1:1, v/v) lahust.

Saadud lahuseid hoiustati sügavkülmas.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

Erinevatel ekstraheerimisetappidel saadud taime- ja putukalahuseid ning isevärvitud kiududest ja reaalistest proovidest välja ekstraheeritud lahuseid analüüsiti HPLC-QQQ-MS, ESI-FT-ICR-MS ja MALDI-FT-ICR-MS meetoditega, et uurida nende värvainelist koostist ning koostada värvainete standardite massispektrite ja kromatogrammide kogum, mille abil oleks võimalik hiljem tuvastada kiududest tundmatuid värvaineid ja nende komponente.

Isevärvitud kiududest ja reaalistest proovidest ekstraheeritud värvide kontsentratsioonid olid küll palju madalamad võrreldes taimedest ja putukatest saadud värvidega, aga kasutatud meetodid on piisavalt tundlikud ning nendega oli võimalik edukalt analüüsida ka väga madalate sisaldustega proove. Edasises arutelus vaadeldakse taimedest ja putukatest saadud värvilahuste ning isevärvitud kiududest välja ekstraheeritud värvilahuste uuringutulemusi koos, kuna need olid üksteist täiendavad.

Värvainete standarditena kasutati taimedest punavärvikut, verevat vöödikut, sandlipuud, siiltsesalpiiniapuu ekstrakti, värvisafloori, värvialkannat ning putukatest košenilli ja kermest. Standardainetest analüüsiti alisariini, purpuriini ja karminhapet. Teadaoleva peitsiga ERMi kiude ning erinevaid tundmatuid reaalseid kiuproove analüüsiti SEM-EDS meetodil, et teada saada kasutatud peitside keemilist koostist.

HPLC-QQQ-MS analüüsi korral jälgiti kromatogrammides ainult kirjandusest leitud võimalike ühendite ionide m/z väärtustele vastavaid signaale (Lisa 1). Kõikidest kromatogrammidest eraldati m/z [M-H]⁻ järgi levinuimate värvainete komponentide piigid ning võrreldi omavahel piikide retentsiooniaegu ja intensiivsusi, et omistada õige piik õigele värvaine komponendile. Igale värvainele saadi selekteeritud ionide kromatogramm, kus olid vaid nende nominaalmassi ja laengu suhte järgi leitud piigid, mis vastavad erinevatele uuritavatele värvaine komponentidele (Lisas 1 on toodud ühendite molekulmassid ja ionidele vastavad m/z väärtused). Lisaks uuriti mitmete ühendite MS/MS üleminekuid, mida kasutati lisainformatsioonina, et kõrgema usaldusväärsusega kinnitada, et antud retentsiooniajaga piik vastab just uuritavale ühendile. Näiteks antrakinoonide korral on leitud iseloomulik MS/MS üleminek, mille tulemusena tekib fragment [M-H-CO]⁻, karboksüülhappele on aga iseloomulik [M-H-CO₂]⁻ iooni teke [38].

ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS korral registreeriti ülikõrge lahutusega massispektrid erinevatest lahustest. Kõikide värvainete massispektritest otsiti Lisas 1 toodud ühendite m/z suhetele vastavaid piike. Negatiivses režiimis (ESI-ga ja MALDI-ga) otsiti [M-H]⁻ ioone ning

positiivses (MALDI-ga) $[M+H]^+$ ja $[M+Na]^+$ ioone. MALDI korral otsiti lisaks kvaasimolekulaarioonidele ka Na-adiuktiioone, kuna on leitud, et need on lämmastikku mitte sisaldavate ainete ioniseerumisel MALDI allikas väga levinud. Lisaks uuriti täpsemalt iga värvaine allika lahuse parimaid massispektreid, et leida iseloomulikke piike, mis võiksid kuuluda näiteks värvaine komponentide fragmentidele.

3.1. PUNASTE VÄRVAINETE ANALÜÜS ERINEVATE

MEETODITEGA

Kõikide värvainete erinevatel etappidel saadud lahustest (nii taimedest ja putukatest leotatud värvilahustest, kui ka isevärvitud kiududest ekstraheeritud lahustest) otsiti kõiki Lisas 1 toodud m/z väärtuseid. See on vajalik, et olla kindel, et kromatogrammil leitud piik või massispektris tuvastatud joon kuulub kindlasti uuritavale ainele ning vastavad molekulid on olemas vaid õigestes lahustes. Selleks, et omistada kromatogrammil õige piik õigele ühendile, jälgiti kõigepealt erinevatel etappidel saadud uuritavates lahuses (näiteks vereva vöödiku lahustes) konkreetse värvaine komponendi m/z väärtusele vastavat signaali (nt emodiini puhul m/z väärtust 269 juures) ning saadi selekteeritud iooni kromatogramm (ingl. k. *selected ion chromatogram*). Kui ühe m/z väärtuse jälgimisel saadi kromatogrammil mitu piiki, tuvastati esiteks need piigid, mis olid olemas kõikidel töötusetappidel saadud lahuste kromatogrammidel. Seejärel kontrolliti, millised piigid puuduvad kõikide teiste värvaine lahuste (nt santaniil, kermes) selekteeritud ioonide kromatogrammidel. Tuvastatavale ühendile omistati piik, mis oli olemas uuritavate lahuste kromatogrammidel ning puudus teiste värvainete lahuste kromatogrammidel. Kuna on teada, et erinevad värvained sisaldavad erinevaid komponente, siis sama piigi esinemine eri värvainete kromatogrammidel viitab sellele, et tegemist pole mitte värvaine komponendiga vaid muu päritoluga ainega. Osade ühendite korral kasutati täiendava informatsiooni saamiseks lisaks MS/MS analüüsi. Identifitseerimise viimases etapis kinnitati leitud ühendite olemasolu värvainete lahustes HRMS (kõrglahutusega massispektromeetrilise) meetodiga – MALDI- ja/või ESI-FT-ICR-MS).

3.1.1. UURINGUD HPLC-QQQ-MS MEETODIL

HPLC-QQQ-MS korral mõõdeti kõik värvainete lahused negatiivses režiimis (on teada, et happelisi rühmi sisaldavad molekulid ioniseeruvad negatiivses režiimis paremini), seega

käesolevas peatükis, kui räägitakse iooni m/z väärtusest, viidatakse värvaine molekuli anioonile $[M-H]^-$.

HPLC-QQQ-MS korral eraldati lahusest erinevad ühendid kromatograafiliselt ning detekteeriti QQQ-massispektromeetriga. Tänu sellele saadi mass-kromatogramm, kus lisaks piikide retentsioonijale on ühendeid võimalik tuvastada piigile vastavas massispektris erinevate joonte m/z väärtuste järgi. QQQ-MS ei ole kõrglahutus-meetod ja võimaldab eristada m/z väärtuseid ainult molekuli nominaalmassi järgi.

Kõikidele erinevatel etappidel saadud värvainete lahustele registreeriti selekteeritud ionide kromatogramm, mis võiksid kuuluda ainetele, mis teoreetiliselt peaksid lahustes olema. Saadud kromatogrammide abil saadi igale värvaine allikale iseloomulik kombineeritud kromatogramm, mille abil sai värvaineid üksteisest eristada. Kõikide värvainete selekteeritud ionide kombineeritud kromatogramm on toodud Lisas 3. Kõikidele värvainetele leitud iseloomulike piikide retentsioonijad ja MS/MS üleminekud on toodud Lisas 4.

Järgnevalt on lühidalt kirjeldatud HPLC-QQQ-MS-iga saadud iga värvainelahuse analüüsitulemusi.

Punavärviku lahuste analüüsimisel saadud kromatogrammidel jälgiti iooni m/z väärtust 283 juures. Sellise iooni peaks andma munjistiin. Selle iooni jälgimisel saadi kromatogrammidel kaks piiki: retentsioonijaga (t_R) 4.9 minutit ja 7.9 minutit. 7.9 minuti juures olev piik oli olemas peaaegu kõikides lahustes ning lisauuringute abil leiti, et tegemist oli steariinhappe piigiga. Steariinhape on üks levinuimatest rasvhapetest looduses ning kuna antud töös uuriti looduslikke taimi ja putukaid, ei olnud ootamatu, et lahused sisaldasid erinevaid rasvhappeid. Märkatavalt suures koguses erinevaid rasvhappeid sisaldasid just värvilahused, mis olid lambavillakiududest välja ekstraheeritud. Kuna lambavill sisaldab endas suures koguses lanoliini, olid palmitiinhappele ja steariinhappele vastavate anioonide piigid väga intensiivsed [39]. Suur piik $t_R=4.9$ min juures kõikides teistes standardlahustes puudus, seega on tõenäoline, et antud piik kuulub just munjistiinile. Kinnitust andis sellele ka MS/MS analüüs, kus esines nii $[M-H-CO_2]^-$ kui $[M-H-H_2O]^-$ üleminek. m/z 239 jälgimisel saadi piigid $t_R=5.9$ ja 6.3 min juures, mis võivad kuuluda alisariinile ja ksantopurpuriinile. Pikemalt kuumutatud punavärviku lahuse kromatogrammil oli m/z 269 järgi eraldatud piik 5.9 minuti juures, mis kõigi eelduste kohaselt kuulub lutsidiinile. m/z 253 jälgimisel saadi kolm piiki, millest üks kuulub eeldatavasti rubiadiinile. Piik $t_R=7.5$ min juures oli olemas kõikides standardlahuste korral, seega on tegemist tõenäoliselt mõne segava piigiga. Rubiadiinile võiks seega kuuluda piik 7.0 või 5.3 minuti juures. Rubiadiin erineb lutsidiinist vaid ühe OH rühma puudumise

poolest, olles seega hüdrofoobsem aine. See võimaldab omistada rubiadiinile piigi $t_R=7.0$ min juures. m/z 299 järgi eraldatud piik 4.9 minuti juures võiks kuuluda pseudopurpuriinile, kuna antud piik andis MS/MS üleminekul ilusa piigi $[M-H-CO_2]^-$.

Sandlipuu lahuste kromatogrammidel oli kõige iseloomulikum m/z 299 jälgimisel saadud santaali piik retentsiooniajaga 5.7 minutit. Olemas oli ka santaliin A piik, $t_R=6.1$ min juures (m/z 581). m/z 255 järgi eraldatud piik võib kuuluda nii likviritigeniinile kui isolikviritigeniinile. Leiti üks piik, $t_R=6.4$ min juures, mis on olemas kõikidel erinevatel etappidel saadud sandlipuu lahustel, aga puudub teiste värvainete lahuste korral. Seega võiks just see piik kuuluda likviritigeniinile või isolikviritigeniinile. Ühendeid, millele vastab m/z 283 $[M-H]^-$, on sandlipuu korral kaks – maakiain ja homopteokarpiin. Vastava m/z järgi eraldatud piike, mis on olemas ainult sandlipuu lahuses, on kolm: 5.1, 5.4 ja 6.2 minutitel. $t_R=5.4$ min juures olev piik annab MS/MS ülemineku $[M-H-CO_2]^-$. m/z 297 jälgimisel leitud piik kromatograafil 5.3 minutil võiks kuuluda pteokarpiinile.

Košenilli lahuse kromatogrammil tuvastati m/z 491 jälgimisel väga intensiivne ja iseloomulik piik 2.5 minutil, mis tõenäoliselt kuulub karmiinhappele. Lisaks saadi väiksemad piigid m/z 329 ja m/z 313 jälgimisel vastavalt retentsiooniaegadega 3.9 ja 4.1 minutit, mis kuuluvad suure tõenäosusega kermeshappele ja flavokermeshappele. Nende eellasioonide MS/MS analüüsil leiti kõikidel juhtudel $[M-H-CO_2]^-$ fragmendid.

Kermese lahuse korral on intensiivsed kermeshappe ($t_R=3.9$ min, $m/z=329$) ja flavokermeshappe ($t_R=4.1$ min, $m/z=313$) piigid sarnaselt košenilli lahusele.

Vereva võödiku lahuse korral leiti iseloomulikud piigid dermorubiinile, dermoluteiinile, emodiinile, füstsioonile ja dermoglausiinile. Piik $t_R=6.9$ minutil ($m/z=269$) kuulub tõenäoliselt emodiinile. Seda kinnitab ka MS/MS üleminekul saadud $[M-H-CO]^-$ ja $[M-H-H_2O]^-$ ioonid. m/z 283 järgi eraldatud piik $t_R=6.3$ minutil võiks kuuluda füstsioonile. Sama retentsiooniajaga piik on ka sandlipuu lahuse kromatogrammidel, kuid sandlipuu lahuste korral on piigid väga väikesed. $m/z=299$ jälgimisel saadud piik 6.7 minutil võiks kuuluda dermoglausiinile. Seevastu m/z 343 jälgimine annab intensiivsemad piigid 2.2 ja 3.7 minutitel. Piike pole teiste lahuste kromatogrammidel ning 3.7 minutil olev piik on suure intensiivsusega ning annab MS/MS üleminekul $[M-H-CO_2]^-$, seega võiks just see piik kuuluda dermorubiinile.

Värvisafloori korral kasutati värvimisel teisi võtteid (pH reguleerimine) ning punaseks (roosaks) värvus vaid puuvilla kiud. Antud värvaine nii taimest kui ka kiust väljaekstraheeritud värvilahuste uurimisel ei andnud HPLC-QQQ-MS meetod piisavalt

tulemusi, et usaldusväärset tuvastada erinevaid punaste värvainete komponente. Leiti piik $t_R=4.6$ minutil ja $m/z=593$ juures, mis võiks kuuluda safloorkollane A-le. 2.8 minutil olev piik nominaalmassiga 449 võiks kuuluda isokartamiinile. Antud värvaine vajab lisauuringuid.

Värvialkannaga eespool kirjeldatud värvimismetoodikaga värvides, peitsi kasutamata, saadi ainult sinakas-rohelist tooni lahus. Erinevatel etappidel saadud lahuste värv ja kromatogramm olid erinevad ning iseloomulikke piike polnud või olid need väga väikese intensiivsusega. Leiti mõned piigid, mis võiksid antud värvaine koostises olevatele ühenditele kuuluda. m/z 287 järgimisel $t_R=6.9$ min; m/z 329 järgimisel $t_R=7.3$ min ja m/z 369 järgimisel $t_R=7.4$ min võiksid kuuluda vastavalt alkanniinile, atsetüülalkanniinile ja angelüülalkanniinile.

Siiltsesalpiinia puu ekstrakti lahused peaks teoreetiliselt sisaldama põhiliselt brasileiini ning brasiliini vastavalt m/z 283 ja 285 juures. Brasiliini m/z väärtustele vastavaid piike ei leitud üheski siiltsesalpiiniapuu ekstrakti lahuses. m/z 283 järgi eraldatud piike on retentsiooniaegadega 0.5, 2.6 ja 4.3 min. $t_R=4.3$ min juures on paljudel kromatogrammidel väga lai piik ning kõige tõenäolisem brasileiinile kuuluv piik oleks 2.6 minutil. See piik on aga enamuste lahuste korral üsna pisike. Siiltsesalpiiniapuu ekstrakti korral oli kromatogrammil ka väga intensiivne piik retentsioonijaga 5.6 minutit, millele massispektris vastav m/z väärtus asus 313.5 juures. Nii m/z väärtus kui ka isotoopjoonte asukohad massispektris viitavad sellele, et see piik vastab kahelaengulisele ioonile. Seda iooni ei ole praegu veel identifitseerida õnnestunud.

HPLC-QQQ-MS on väga tundlik meetod ning sellega sai palju väärtuslikku informatsiooni erinevate värvainete koostiskomponentide kohta. Oluliseks nüansiks oli see, et meetodiga oli võimalik edukalt analüüsida ka isevärvitud kiududest ekstraheeritud väga madala värvaine sisaldusega lahuseid. Võrreldi analüüsil ka erinevatel etappidel saadud värvilahuste komponentide olemasolu ja sisaldusi. Lisas 3 on toodud kõrvuti putuka- või taime lahuse ja kiududest ekstraheeritud värvaine lahuse kombineeritud kromatogramm. Kiudude värvimine ja värvaine ekstraheerimine kiududest oli oluline etapp, et uurida millised värvaine kiule kinnituvad ja välja ekstraheeruvad. On näha, et piikide intensiivsuste suhted erinesid taimeleotise ja kiududest ekstraheeritud lahuse korral – nt punavärviku taime lahuses oli munjistiini piik lutsidiini ja rubiadiini piigist väiksem, kuid kiududest ekstraheeritud lahuse kromatogrammil oli munjistiinile vastav piik kõige intensiivsem. Leiti, et kuigi kiududest ekstraheeritud lahuste värvaine kontsentratsioonid olid tõenäoliselt väiksemad, oli seal vähem ka erinevaid taime/putuka leotisest pärit lisandeid. Probleemiks osutus aga see, et värvitud

lambavilla kiust eraldus ekstraheerimise käigus suuremates kogustes erinevaid rasvasid, mis oma suure ioniseerimisvõime ja kontsentratsiooni tõttu domineerisid kromatogrammidel.

Erinevate uuritud värvilahuste (saadud nii taimedes ja putukatest väljaleotamisel, kui ka isevärvitud kiududest ekstraheerimisel) kromatogrammide ja nendest pärineva informatsiooni abil on võimalik tundmatu proovi korral teada saada, milliseid värvainete komponente see sisaldab ning selle järgi, millist värvaineallikat on kasutatud.

Antud uurimustöö kontekstis on puuduseks see, et QQQ-MS suudab määrata ühendeid vaid nominaalse massi ja laengu suhtega. Kuna enamiku värvainete korral puuduvad standardained, ei saa täiesti kindel olla, et leitud piigid kindlasti vastavad meie uuritavatele värvainete komponentidele. Täiendava kindluse saamiseks uuriti värvilahuseid lisaks FT-ICR-MS meetodil, mis annab väga täpseid m/z väärtuseid, maksimaalse veaga 1-2 ppm.

3.1.2. UURINGUD MALDI- ja ESI-FT-ICR-MS MEETODITEGA

MALDI ja ESI ionisatsiooniallikatega FT-ICR-MS abil registreeriti samuti massispektreid erinevatest värvainete standardite lahustest erinevatel töötlustappidel (nii taimedest/putukatest, kui ka isevärvitud kiududest ekstraheeritud lahustest). Kui HPLC-MS meetodit on varem värvainete analüüsiks rohkem kasutatud ning kolonni, eluendi ja muude parameetrite paika häälestamine oli tänu kirjandusele lihtsam, siis FT-ICR-MS-i pole antud ainete jaoks praktiliselt kasutatud (Cochran et al. on analüüsinud üksikuid värvaineid lihtsamates maatriksites sarnase meetodiga [23]) ning lisaks sõltuvad optimaalsed parameetrid tugevalt kasutatavast MALDI/ESI-FT-ICR-MS instrumendist. Töö käigus uuriti, kas ja kuidas on võimalik analüüsida värvaineid MALDI ja ESI ionisatsiooniallikatega kasutades FT-ICR-MS massianalüsaatorit. ESI korral uuriti lahuseid negatiivses režiimis ning otsiti m/z väärtuseid, mis vastavad prootoni kaole $[M-H]^-$. MALDI korral mõõdeti põhiliselt positiivses režiimis ning otsiti prooton- ja Na- adukte, vastavalt $[M+H]^+$ ja $[M+Na]^+$. Tehti esialgsed katsetused ka MALDI negatiivse režiimiga. Negatiivset režiimi kasutati, kuna antrakinoon värvid ioniseeruvad eelistatult paremini just negatiivses režiimis (palju on happelisi rühmi). MALDI korral kasutati ka positiivset režiimi, kuna MALDI töötab eelistatult paremini just selles režiimis ning huvitaval kombel on värvaineid MALDI-FT-ICR-MS-ga positiivses režiimis vähe uuritud.

Sisekalibrandid, nende kogus ja kõik masina parameetrid erinesid proovide puhul, olenevalt uuritavate ainete ioniseerimisvõimest, analüütide kontsentratsioonist lahuses ning samuti

kasutatavast lahustist. Lisaks kasutati ESI korral kalibreerimiseks rasvhapete (palmitiinhappe ja steariinhappe) m/z väärtuseid (255.23295 ja 283.26425), kuna nende piigid esinesid kõikide looduslike lahuste korral ning madalamate m/z väärtuste juures oli negatiivseid sisekalibrante puudu. Palmitiinhape ja steariinhape on looduses kõige levinumad rasvhapped [40]. Kuna kõik uuritavad värvained on saadud looduslikest taimedest ja putukatest ning uuritavad villakiud on värvitud just nende looduslike värvidega, võib arvata, et rasvhapped tulevad proovidest. Eriti suurtes kogustes oli neid rasvhappeid just kiududest ekstraheeritud proovides, mis on oodatav, kuna lambavill sisaldab alati väheses koguses lanoliini – erinevatest rasvadest ja vahadest koosnevat võiet [39]. Lisaks kasutatakse rasvhappe soolasid seepide valmistamisel, mida kasutatakse tekstiilikiudude pesemiseks [41]. Sarnaselt HPLC-QQQ-MS tulemuste analüüsile, uuriti kõikide lahuste ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS spektreid kõikide Lisas 1 toodud m/z väärtuste suhtes. MALDI- ja ESI-FT-ICR-MS tulemused annavad lõpliku kinnituse värvainete erinevate komponentide olemasolu kohta lahustes, kuna nende meetodite ülikõrge massitäpsuse tõttu on nendega võimalik tuvastada analüüte väga kõrge usaldusväärsusega. Iga värvaine allika jaoks iseloomulike joonte m/z väärtused koos massilaengu suhte veaga ($\Delta m/z$) on toodud Lisas 4. Lisas 5 on toodud kõikide värvainete jaoks ESI-FT-ICR-MS ja MALDI-FT-ICR-MS spektrid koos interpretatsioonidega. Kuna massispektrid olid väga keerulised, sisaldades paljude komponentide piike, osutus nende interpreteerimine üsna keerukaks. Lisas 5 on tabelites toodud värvainetele kõige iseloomulikumate komponentide piikide m/z väärtuste interpreteeringud.

Järgnevalt on kirjeldatud erinevate värvainete lahuste ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS tulemusi. Kirjeldatud on kõikides värvimis- ja ekstraheerimisetappides saadud lahuste koondtulemusi.

Punavärviku erinevate lahuste korral oli nii ESI-FT-ICR-MS negatiivse režiimi kui MALDI-FT-ICR-MS positiivse režiimi massispektrites võimalik tuvastada punavärviku komponentidele iseloomulikke m/z väärtuseid. Happelisi rühmi sisaldavad antrakinoonid ioniseeruvad paremini ESI negatiivses režiimis. See tuli välja ka käesoleva töö tulemusest ning massispektrites leiti vastavad m/z väärtused alisariinile/ksantopurpuriinile, rubiadiinile, purpuriinile, lutsidiinile, munjistiinile ja pseudopurpuriinile. Valesid jooni, ehk siis neid, mille m/z vastavad mõne muu värvaine koostisosale, oli vähe – väikesed jooned, mis võivad vastata karmiinhappele ja safloorkollane A-le. MALDI-FT-ICR-MS positiivse režiimi massispektrites olid olemas m/z väärtused, mis vastavad alisariinile/ksantopurpuriinile, rubiadiinile ja ruberüüthappele. Kiudude ekstraktist leiti ka lutsidiniile vastav piik m/z väärtusel 271.06041.

Värvaine komponentidele vastavad m/z väärtused ja massivead on toodud Lisas 4 ja spektrid koos interpreteeringutega Lisas 5.

Sandlipuu lahuste massispektrid sisaldasid ESI- ionisatsiooni korral väga palju uuritavaid m/z väärtuseid – nii selliseid, mis vastavad värvaine komponentidele, kui ka muid. Esinesid peaaegu kõik Lisas 1 toodud sandlipuule iseloomulikud m/z väärtused (puudusid vaid kalkooni, flavonooni piigid). Väga intensiivsed olid santaali ning santaliin A ja santaliin B jooned, mis vastavad $[M-H]^-$ ionidele (täpsed m/z ja $\Delta m/z$ toodud Lisades 4 ja 5). Nendest ühenditest, mida antud lahuses me pigem leida ei tahaks, olid esindatud kõik punavärvikule iseloomulikud m/z väärtused; enamus vereva vöödiku, kermese, košenilli ja siiltsesalpiinia puu iseloomulikest m/z väärtustest ning osad värvialkanna ja värvisafloori m/z väärtustest. MALDI-FT-ICR-MS korral andsid aga santaliin A ja B väga intensiivsed piigid, mida on väga hea kasutada sandlipuu värvi tuvastamiseks. Olemas olid nii $[M+H]^+$ kui $[M+Na]^+$ katioonidele vastavad jooned (täpsed m/z ja $\Delta m/z$ toodud Lisades 4 ja 5). Lisaks andsid positiivses MALDI režiimis $[M+H]^+$ katioonid ka maakiain ($m/z = 285.07560$), pteokarpiin ($m/z = 299.09140$) ja santaal ($m/z = 301.07084$). Värvainete komponentidele mitte vastavaid jooni oli MALDI-FT-ICR-MS spektrites vähem ning nende intensiivsused võrreldes uuritavate ühendite joontega olid väga madalad. Seega sobib sandlipuu tuvastamiseks just MALDI positiivne režiim.

Košenilli lahuste korral oli negatiivses ESI režiimis hiiglaslik karmiinhappe $[M-H]^-$ aniooni joon m/z 491.08332 juures ning mitmel massispektril oli väiksema intensiivsusega kermeshappe ja flavokermeshappe $[M-H]^-$ ionid vastavalt m/z 329.03002 ja 313.03558 juures. MALDI positiivses režiimis olid tuvastatavad karmiinhappe Na-adukt $[C_{22}H_{20}O_{13}+Na]^+$ m/z 515.07956 juures.

Kermese lahuste MALDI-FT-ICR-MS massispektritel ei olnud võimalik värvaine komponente tuvastada. Negatiivses režiimis ESI-FT-ICR-MS meetodil mõõdetud massispektrites olid aga kõikide uuritavate lahuste korral olemas kermeshappele ja flavokermeshappele vastavate anioonide jooned (m/z ja $\Delta m/z$ toodud Lisades 4 ja 5). Kermesele mitte kuuluvatest joontest oli väga väike karmiinhappele kuuluva $[M-H]^-$ aniooni piik m/z väärtusega 491.08300. Kermeshappe ja flavokermeshappe $[M-H]^-$ anioonide m/z väärtuste koosleidumine massispektris viitab putukast saadud punasele värvile ning karmiinhappele kuuluva $[M-H]^-$ aniooni joone puudumine m/z 491.08311 juures viitab just kermese kasutamisele.

Vereva vöödiku lahuste MALDI-FT-ICR-MS massipektritel ei olnud võimalik värvaine komponente tuvastada. Negatiivse ESI-FT-ICR-MS režiimi korral olid massispektrites $[M-H]^-$ anioonidele iseloomulikud jooned, mis kuuluvad emodiinile ($m/z = 269.04565$), füstsioonile ($m/z = 283.06145$), dermoglausiinile ($m/z = 299.05637$), endokroosiinile ($m/z = 313.03505$), dermotsübiinile ($m/z = 315.05139$), dermoluteiinile ($m/z = 327.05110$), dermorubiinile ($m/z = 343.04620$) ning ühe spektri korral ka 7-kloroemodiinile ($m/z = 303.00655$). Üksikutes spektrites oli näha jooni, mis m/z väärtuse järgi võiksid kuuluda kermeshappele ja isolikviritigeniinile. Sama aniooni element koostis ($C_{16}H_{12}O_5$), nagu on füstsioonil, on tegelikult ka maakiainil ja brasileiinil, mistõttu nende m/z väärtused on identsed ja ei ole FT-ICR-MS abil eristatavad. Seega ainult massispektri põhjal ei saa öelda, et kas antud joone korral on kindlasti tegu ikkagi füstsiooniga.

Värvisafloori lahuste analüüsil saadi tulemusi vaid MALDI positiivses režiimis. Leiti madala intensiivsusega jooned, mille m/z väärtused vastavad kõrge tõenäosusega isokartamiini ($m/z = 473.10499$), safloorkollane A ($m/z = 617.14764$), kartamiini ($m/z = 933.20517$) ja anhüdrosafloorkollane B ($m/z = 1067.26212$) $[M+Na]^+$ katioonidele.

Värvialkannaga värvides ei saadud punast tooni ning punaka tooniga oli vaid värvimisetapi esimene lahus (enne keetmist). Selle lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektrites leiti $[M-H]^-$ aniooni m/z väärtused, mis kõrge tõenäosusega kuuluvad alkanniniile ($m/z = 287.09235$), atsetüülalkanniinile ($m/z = 329.10344$), angelüülalkanniinile ($m/z = 269.13426$) ja isovalerüülalkanniinile ($m/z = 371.14976$).

Siiltsesalpiiniapuu ekstraktist saadud standardlahuste analüüs andis sarnaseid tulemusi HPLC-QQQ-MS meetodiga. Massispektrites puudusid brasileiini ja brasiliini m/z väärtused, kuid negatiivse ionisatsiooni režiimi korral ilmnis kõrge intensiivsusega kahelaenguline ioon m/z väärtusega 313.56238, millele vastav piik oli olemas ka kromatograafilisel analüüsil (vt ptk 3.1.1). Kõige tõenäolisemalt vastab see piik ühele järgmistest mitmelaengulistest ioonidest: $C_{28}H_9N_{19}O^{-2}$ ja $C_{29}H_{15}N_{12}O_6^{-2}$ ja $C_{30}H_{21}N_5O_{11}^{-2}$ (vastavate neutraalide molekulvalemid on $C_{28}H_{11}N_{19}O$, $C_{29}H_{17}N_{12}O_6$, $C_{30}H_{23}N_5O_{11}$). Massispektrites olid olemas ka vastavad ühelaengulised anioonid. Kirjanduse abil ei õnnestunud neile valemitele ühendeid omistada.

ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS meetodi abil leiti iga värvaineallika lahuste massispektrites vastavale värvainele iseloomulike m/z väärtustega ioonid, mida saab edaspidi kasutada tundmatu värvaine tuvastamiseks. Mitme proovi korra leiti lisaks konkreetsele värvainele kuuluvatele ioonidele ka selliseid, mis ei pärine sellest värvainest. Seega ei piisa värvaine

tuvastamisel vaid ühest leitud õigest piigist. Erinevate värvaine komponentide samaaegne leidumine uuritavates massispektrites aga võimaldab tuvastada õigeid värvaine allikaid.

3.2. KASUTATUD MEETODITE VÕRDUS JA JÄRELDUSED

Magistritöös kasutati kolme erinevat meetodit värvainete komponentide uurimiseks. Tabelis 2 on toodud kasutatavate meetodite võrdlus antud töö kontekstis.

Tabel 2. Antud töös kasutatud meetodite võrdlus

	MALDI-FT-ICR-MS	ESI-FT-ICR-MS	HPLC-QQQ-MS
Eelised	<p>*Ei ole vaja analüütide täielikku lahustamist.</p> <p>*Saab töötada ilma puhaste ainete standarditega ja identifitseerida ained täpsete masside abil.</p> <p>*Saab analüüsida ka suure molekulmassiga ja polümeerseid ühendeid.</p>	<p>*Standardeid pole vaja, saadakse täpne mass.</p>	<p>*Saadakse ühendi koostiskomponentide lahutuvus.</p> <p>*Võimalik tuvastada keeruka koostisega lahustest madalate kontsentratsioonidega komponente.</p>
Puudused	<p>*Sobiva maatriksaine vajadus.</p> <p>*Maatriksaine lahus peab sobima proovi lahusega ja peab toimuma kokkristalliseerumine.</p> <p>*Spektritel on arvukalt muid piike.</p> <p>*Madalas kontsentratsioonis esinevaid aineid ei saa tuvastada.</p>	<p>*Aine peab olema täielikult lahustunud ja lahus filtreeritud.</p> <p>* Madalas kontsentratsioonis esinevaid aineid ei saa tuvastada.</p>	<p>*Aine peab olema täielikult lahustunud ja lahus filtreeritud.</p> <p>*Vaja standardeid, kuna saadakse vaid nominaalmass.</p>

HPLC-QQQ-MS eeliseks on see, et ainete eraldamise abil on võimalik näha ka madalamate sisaldustega aineid, mis värvainete korral on väga oluline. Miinuseks aga see, et QQQ-MS võimaldab eristada aineid vaid ioonide nominaalse massi ja laengu suhte järgi ning looduslikes lahustes võib erinevaid aineid sama massiga olla mitmed. Mingil määral on seda

probleemi võimalik lahendada kasutades MS/MS üleminekuid ning iseloomustada nende abil ühendite struktuuri.

FT-ICR-MS MALDI ja ESI ionisatsiooniga annab väga täpse m/z väärtuse ning seega on võimalik tuvastada aineid ilma standardeid kasutamata. Samas on probleemiks väga madalate sisalduste määramine. Vastavad piigid võivad suuremate piikide vahele kaduda. Samuti pole võimalik eristada sama massiga aga näiteks erinevate kõrvalrühmade asetusega ühendeid.

HPLC-QQQ-MS ja MALDI- ja ESI-FT-ICR-MS koos kasutamisel on võimalik uurida erinevate värvainete koostisi ning saada maksimaalset informatsiooni kangast välja ekstraheeruvate ühendite kohta. Kui mingi eeldatav ühend annab HPLC kromatogrammil piigi, ning FT-ICR-MS-s täpse massi, saab kõrge tõenäosusega öelda, et uuritud värvaineallikas tõesti sisaldab seda värvaine komponenti. Lisas 4 on toodud igale värvaine allikale need ühendid, mis antud uurimistöö järelduste põhjal võiks kuuluda otsitavatele ainetele. ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS tulemuste korral on tabelis toodud mõõdetud täpne m/z ja $\Delta m/z$ ning HPLC-QQQ-MS korral piigi retentsiooniaeg, mis analüüsi põhjal kõige tõenäolisemalt ühendile kuulub.

Käesoleva töö tulemuste põhjal leiti, et tulevikus tasub katsetada kahte võimalust nende meetodite täiendavaks sidumiseks: 1) ühendada vedelikromatograaf ESI-FT-ICR-MS seadmega, mis tagaks piikide lahtuse ning detekteerimisel täpse massi. Kuna nende seadmete ühendamise on keeruline, on 2) teiseks võimaluseks ainete eraldamine kromatograafiliselt, fraktsioonide kogumine ning seejärel nende fraktsioonide uurimine kasutades FT-ICR-MS seadet nii MALDI, ESI kui APCI ionisatsiooniallikatega. Sellise meetodi abil on võimalik HPLC kromatogrammil omistada igale standardainele vastava piigi retentsiooniaeg, ilma paljusid kalleid ja raskesti kättesaadavaid standardaineid kasutama. HPLC kombineerimine FT-ICR-MS-ga on vajalik, kuna ainuüksi FT-ICR-MS meetodiga on raske nii madalaid kiududest ekstraheeritud värviaine kontsentratsioone tuvastada. Kuna ESI/MALDI-FT-ICR-MS spektritel on kõik lahuses olevad molekulid korraga, ei piisa enamasti ka kontsentratsiooni tõstmisest, kuna kiududest ekstraheeritud lahuses on palju teisi molekule, mille kontsentratsioon või ionisatsioonivõime võib olla värvaine molekulide omadest kordades suurem ning seega on nende lisandite piigid nii suured, et värvaine molekule ei ole võimalik tuvastada. Eraldades aga eelnevalt vedelikkromatograafia abil erineva polaarsusega ühendid üksteisest, on võimalik paremini saadud lahuseid uurida.

3.3.SEM-EDS ANALÜÜS KIUDUDES PEITSIDE TUVASTAMISEKS

Teadavaoleva peitsiga töödeldud ning vereva vöödikuga värvitud kiude (tinasoolaga peitsitud, maarjajääga peitsitud ja peitsita) ja ERM-ist saadud proovi analüüsi SEM-EDS abil, et näha, kas värvitud kiud sisaldavad erinevaid metalle. Märgatavas koguses metalliioonide sisaldumine riidekius viitab anorgaaniliste peitside kasutamisele. Erinevad kasutatavad peitsid võivad anda lisainformatsiooni kasutatavate värvainete kohta (osade värvainete korral on teada, et peitse ei kasutatud; teised värvained võivad anda vastavalt kasutatavale peitsile erinevaid toone). Lisas 6 on toodud mõnede uuritavate kiudude SEM-EDS spektrid ja neis sisalduvate elementide protsentuaalsed sisaldused.

SEM-EDS spektrite tulemuste järgi võib esialgu öelda, et tõenäoliselt on enamiku reaalsete proovikiudude värvimisel kasutatud metallipeitse ning kiududest värvi kättesaamine võib olla raskendatud. Värvainete ekstraheerimisel kiududest on tarvis kasutada EDTA ja/või HCl meetodeid.

3.4. REAALSETE PROOVIDE ANALÜÜS KOOSTATUD MEETODI ABIL

Reaalseteks uuritavateks proovideks olid erakogust ja ERMist saadud kiutükid. Kiuproovidest ekstraheeriti värvaineid ning uuriti lahuseid HPLC-QQQ-MS ja ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS meetoditega.

Eelnevalt oli kiududele tehtud ka SEM-EDS analüüs ning leiti, et kuna tõenäoliselt oli kiudude värvimisel kasutatud metallipeitse, teostati HCl etapiga ekstraheerimine. Järgnevalt on kirjeldatud reaalset proovi „ERM A395:6 proov 2“, mille korral õnnestus määrata kius sisalduv värvaine. Informatsioon ja illustratiivsed materjalid proovi kohta on toodud Lisas 7.

Kasutades ATR-FT-IR spektroskoopilist meetodit, kinnitati, et uuritav punane kiud on lambavill. SEM-EDS analüüsi tulemusel leiti, et ERM A395:6 proov 2 sisaldas kõikides spektrites kloori, kaaliumit ja tina. Tina ja kloori sisaldused olid piisavalt kõrged, et järeldada, et kasutati metallisoola peitsi nagu näiteks SnCl_2 [12]. Lisaks oli väiksemates kogustes kaaliumit, naatriumit, alumiiniumit ja kaltsiumit. Metallipeitside sisalduse tõttu kasutati HCl ekstraheerimismeetodit. SEM-EDS spekter on toodud Lisas 6 Joonisel 31.

Saadud ekstraktist registreeriti kromatogramm HPLC-QQQ-MS meetodil ja kõrglahutusega massispekter ESI-FT-ICR-MS meetodil. Kombineeritud selekteeritud iooni kromatogramm ja ESI-FT-ICR-MS massispekter koos interpreteerimisega on toodud Lisas 7.

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et ERM A395:6 proov 2 kromatogrammil on tõenäoliselt karmiinhappe ($t_R=2.5$) ja flavokermeshappe ($t_R=4.1$) piigid, mis viitavad košenilli kasutamisele värvainena.

ESI-FT-ICR-MS massispektril leiti piik $m/z=491.08292$, mis veaga -0.40 ppm kuulub tõenäoliselt karmiinhappele ja piik m/z 313.03562 juures, mis veaga 0.78 ppm kuulub tõenäoliselt flavokermeshappele.

ESI-FT-ICR-MS spektril olid m/z 255.23296 ja 283.26424 jooned ja HPLC-QQQ-MS korral m/z 255 ja 283 järgi eraldatud piigid, mis ESI-FT-ICR-MS spektrites täpsete massidega tõestati ära kui palmitiinhape ja steariinhape. Lisaks mõõdeti nende puhaste rasvhapete kromatogrammid ning retentsiooniaegade põhjal võib öelda, et tegu on tõesti just nende ainetega. Kuna rasvhapped on lipofiilsed ja seetõttu ioniseeruvad ESI negatiivses režiimis väga hästi, on nende piigid suured ning võivad segada analüüsi. Kiududest ekstraheeritud kromatogrammidel olid piigid väga suured ka seetõttu, et rasvhapped tulevad välja gradienti lõpus, kus orgaanilise solvendi sisaldus on suur, mis omakorda tõstab ionisatsiooniefektiivsust. Lisaks olid ESI-FT-ICR-MS spektrites suured segavad piigid m/z väärtustel 297.15309, 325.18411, 339.19980, mis suure tõenäosusega kuuluvad pesuainetele. Kõige intensiivsem piik m/z 325.18411 võiks kuuluda dodetsüülbenseensulfonaadile $[C_{18}H_{29}O_3S]$, mis on Na-soolana põhikomponent riidepesuvahendites [42, 43]. Erinevad rasvhappe anioonid võivad olla pärit lambavillakiududest [39] või seepidest [41]. Kuna kiududes on palju erinevaid hea ioniseeruva võimega lisandeid, on edaspidi värvainete uurimiseks siiski vajalik nende ühendite eraldamine kromatograafiliselt.

4. KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö teoreetilises osas anti ülevaade erinevatest punastest värvainetest, nende keemilisest koostisest ning kasutamisest, värvainete uurimise vajalikkusest ning selle juures esinevatest probleemidest, samuti ekstraheerimis- ja analüüsimeetoditest.

Magistritöö praktilises osas koguti erinevaid punaste värvainete allikaid (punavärvik, košenill jne), teostati nendega värvimiskatseid ning hiljem värvitud riidekiududest värvainete komponentide ekstraheerimist ja analüüsimist. Värvimiskatsete käigus kohandati erinevatele värvaineallikatele mõeldud värvimisretsepte ning töötati välja oma värvimismetoodika. Peitsitud kiududest värvi välja ekstraheerimiseks katsetati kahte meetodit – EDTA ja HCl meetod – ning uuritavate reaalsete proovide töötlemiseks kohaldati neile sobiv ekstraheerimismetoodika.

Erinevatel värvaine standardite värvimisetappidel saadud lahuseid ja kiududest välja ekstraheeritud värvilahuseid analüüsiti kasutades HPLC-QQQ-MS ning ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS meetodeid. Igale värvaine standardile töötati välja oma mõõtmismetoodika. Kõikide instrumentaalmeetoditega leiti igale värvaineallikale iseloomulikud piigid, mida on võimalik kasutada tundmatute värvainete tuvastamiseks. Väljatöötatud mõõtmismetoodikaid kasutati Eesti Rahva Muuseumist ja erakogust saadud reaalsete värvitud kiuproovide analüüsimiseks.

Lisauuringuna analüüsiti teadaoleva peitsiga värvitud kiude ning tundmatuid reaalseid proove SEM-EDS-ga, et tuvastada kiududest erinevate metallipeitside jälgi.

Kõikide eelmainitud instrumentaalmeetodite koos kasutamisel loodi ühtne metoodika tundmatutest tekstiilproovidest punase värvaine tuvastamiseks. Leiti, et edaspidi tuleks metoodika arendamiseks kasutada kombineeritult erinevaid instrumentaalmeetodeid ning koguda rohkem erinevaid värvaine standardeid. Kasutades vedelikromatograafi ainete eraldamiseks ning ESI- ja MALDI-FT-ICR-MS analüüsimeetodeid ühendite detekteerimiseks, oleks võimalik erinevaid värvained identifitseerida ilma standardaineteta.

Antud töös väljatöötatud metoodikat on hiljem võimalik laiendada kõikide erinevate toonidega värvainete analüüsimiseks. Kasutades lisaks veel ATR-FT-IR spektroskoopiat kiudude tuvastamiseks ja SEM-EDS peitside tuvastamiseks, on võimalik moodustada täielik analüüsimeetodite komplekt tundmatute tekstiilproovide analüüsiks.

5. SUMMARY

Pilleriin Peets

Method development for textile dye analysis on the example of red dyes

In the theoretical part of this Master's thesis, an overview of different red dyes, their chemical composition, usage, importance of their identification and extraction as well as possible analytical methods for their analysis is given.

In the practical part of the thesis, different red dyes were collected (madder, cochineal etc) and dyeing of wool and extraction of the dyes from dyed wool was carried out. During dyeing, different recipes were adjusted and suitable dyeing procedure was developed. For mordanted dyed fibres, two methods were used (HCl and EDTA) and suitable extraction method for real samples were customized.

Different dye standard solutions and fibre extracts were analysed, using HPLC-QQQ-MS, ESI- and MALDI-FT-ICR-MS methods and suitable methodology was developed for every dye. With all these methods, characteristic peaks for every dye standard were found, which can be used to identify unknown dyes. The developed methodology was applied to real samples from Estonian National Museum and private collections.

Additionally, different mordants were analysed from known mordanted samples and unknown real samples using SEM-EDS.

On the basis of all instrumental methods used in this work, a unified methodology was composed for identifying unknown red dyes from textile fibres. It was found that in the future it is necessary to bind different methods and collect more dye standards. Using HPLC for separation of compounds and ESI- and MALDI-FT-ICR-MS for detection, it is possible to identify different dye components without standard substances.

Methodology developed in this thesis, can be extended to analysis of other colours and dyes. Additionally using ATR-FT-IR spectroscopy for fibre identification and SEM-EDS for mordants, complete set of analysis methods for identification of unknown fibres can be developed.

6. KASUTATUD KIRJANDUS

1. Delamare, F.; Guineau, B. *Colour: Making and Using Dyes and Pigments*; Thames & Hudson Ltd: London, 2000.
2. Manhita, A.; Ferreira, T.; Candeias, A.; Barrocas Dias, C. Extracting Natural Dyes from Wool—an Evaluation of Extraction Methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (5), 1501–1514.
3. Colombini, M. P.; Andreotti, A.; Baraldi, C.; Degano, I.; Łucejko, J. J. Colour Fading in Textiles: A Model Study on the Decomposition of Natural Dyes. *Microchem. J.* **2007**, *85* (1), 174–182.
4. Cardon, D. *Natural Dyes*; Archetype Books: London, 2007.
5. Maria Perla Colombini; Modugno, F. *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*; John Wiley and Sons, Ltd: United Kingdom, 2009.
6. Degano, I.; Ribechini, E.; Modugno, F.; Colombini, M. P. Analytical Methods for the Characterization of Organic Dyes in Artworks and in Historical Textiles. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2009**, *44* (5), 363–410.
7. Karapanagiotis, I.; Chryssoulakis, Y. Investigation of Red Natural Dyes Used in Historical Objects by HPLC-DAD-MS. *Ann. Chim.* **2006**, *96* (1–2), 75–84.
8. Mirzajani, F.; Bernard, F.; Zeinali, S. M.; Goodarzi, R. Identification of Hydroxy-Safflor Yellow A, Safflor Yellow B, and Precarthaminin Safflower Using LC/ESI-MSMS. *J. Food Meas. Charact.* **2015**, *9* (3), 332–336.
9. Karapanagiotis, I.; Daniilia, sist.; Tsakalof, A.; Chryssoulakis, Y. Identification of Red Natural Dyes in Post-Byzantine Icons by HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28* (5), 739–749.
10. Strych, S.; Trauner, D. Biomimetic Synthesis of Santalin A,B and Santarubin A,B, the Major Colorants of Red Sandalwood. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (36), 9509–9512.
11. Khattak, S. P.; Rafique, S.; Hussain, T.; Inayat, F.; Ahmad, B. Colour Fastness and Tensile Strength of Cotton Fabric Dyed with Natural Extracts of *Alkanna Tinctoria* by Continuous Dyeing Technique. *J. Chem. Soc. Pak.* **2015**, *37* (5).
12. Järvoja, E. *Taimedega Värvimine. Renovatum Anno.* **1991**, 10–13.
13. Vilbaste, G. *Taimedega Värvimisi Eestis*; Eesti Rahva Muuseum: Tartu, 1939.
14. Lee, J.; Ceglia, A.; Kim, K.-J.; Lee, Y. Characterization of Dyed Textiles Using TOF-SIMS and FT-IR: Characterization of Dyed Textiles. *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44* (6), 653–657.

15. Rafaelly, L.; Heron, S.; Nowik, W.; Tchapla, A. Optimisation of ESI-MS Detection for the HPLC of Anthraquinone Dyes. *Dyes Pigments* **2008**, *77* (1), 191–203.
16. Orska-Gawryś, J.; Surowiec, I.; Kehl, J.; Rejniak, H.; Urbaniak-Walczak, K.; Trojanowicz, M. Identification of Natural Dyes in Archeological Coptic Textiles by Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *J. Chromatogr. A* **2003**, *989* (2), 239–248.
17. Zhang, X.; Laursen, R. A. Development of Mild Extraction Methods for the Analysis of Natural Dyes in Textiles of Historical Interest Using LC-Diode Array Detector-MS. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (7), 2022–2025.
18. Novotná, P.; Pacáková, V.; Bosáková, Z.; Štulík, K. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Some Anthraquinone and Naphthoquinone Dyes Occurring in Historical Textiles. *J. Chromatogr. A* **1999**, *863* (2), 235–241.
19. Valianou, L.; Karapanagiotis, I.; Chryssoulakis, Y. Comparison of Extraction Methods for the Analysis of Natural Dyes in Historical Textiles by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395* (7), 2175–2189.
20. Lech, K.; Jarosz, M. Novel Methodology for the Extraction and Identification of Natural Dyestuffs in Historical Textiles by HPLC–UV–Vis–ESI MS. Case Study: Chasubles from the Wawel Cathedral Collection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (9), 3241–3251.
21. Gulmini, M.; Idone, A.; Diana, E.; Gastaldi, D.; Vaudan, D.; Aceto, M. Identification of Dyestuffs in Historical Textiles: Strong and Weak Points of a Non-Invasive Approach. *Dyes Pigments* **2013**, *98* (1), 136–145.
22. Brosseau, C. L.; Rayner, K. S.; Casadio, F.; Grzywacz, C. M.; Van Duyne, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Direct Method to Identify Colorants in Various Artist Media. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (17), 7443–7447.
23. Cochran, K. H.; Barry, J. A.; Muddiman, D. C.; Hinks, D. Direct Analysis of Textile Fabrics and Dyes Using Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (2), 831–836.
24. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*, 2 edition.; Wiley-Interscience, 2010.
25. Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3 edition.; Wiley-Interscience: Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ, 2007.

26. Soltzberg, L. J.; Hagar, A.; Kridaratikorn, S.; Mattson, A.; Newman, R. MALDI-TOF Mass Spectrometric Identification of Dyes and Pigments. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (11), 2001–2006.
27. Cole, R. B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*; John Wiley & Sons: New Jersey, 2011.
28. Gross, J. H. *Mass Spectrometry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011.
29. McIver, R. T.; McIver, J. R. *Fourier Transform Mass Spectrometry. Principles and Applications*; IonSpec Corporation: Irvine, 2006.
30. Reimer, L. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*; Springer: 2013.
31. Willard, H. H.; Jr, L. L. M.; Dean, J. A. *Instrumental Methods of Analysis*, 7 Sub edition.; Jr, F. A. S., Ed.; Wadsworth Publishing Company: Belmont, Calif, 1988.
32. Teearu, A.; Vahur, S.; Haljasorg, U.; Leito, I.; Haljasorg, T.; Toom, L. 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Solution in MALDI-MS: Ageing and Use for Mass Calibration: DHB Solution in MALDI-MS. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49* (10), 970–979.
33. Peets, P. Tekstiilikiudude analüüs ja klassifitseerimine ATR-FT-IR spektroskoopia meetodil. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, 2014.
34. Vahur, S.; Teearu, A.; Peets, P.; Joosu, L.; Leito, I. ATR-FT-IR Spectral Collection of Conservation Materials in the Extended Region of 4000-80 Cm⁻¹. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (13), 3373–3379.
35. Peets, P.; Vahur, S.; Leito, I.; Pelt, J. Identification and Classification of Textile Fibres Using ATR-FT-IR Spectroscopy with Chemometric Methods. No. *Spectrochimia Acta Part A*. (avaldamiseks saadetud august 2015)
36. Dyeing with Safflower – Reconstructing History <https://www.reconstructinghistory.com/articles/japanese-articles/dyeing-with-safflower.html> (viimati kontrollitud 23.03.2016)
37. Natural Red Dyes - dyeing http://www.wildcolours.co.uk/html/red_dyes.html (uuendatud 28.12.2015)
38. Petroviciu, I.; Albu, F.; Medvedovici, A. LC/MS and LC/MS/MS Based Protocol for Identification of Dyes in Historic Textiles. *Microchem. J.* **2010**, *95* (2), 247–254.
39. Unger, A.; Schniewind, A.; Unger, W. *Conservation of Wood Artifacts: A Handbook*; Springer Science & Business Media: Germany, 2001.

40. Gunstone, F. D.; Hardwood, J. L.; Dijkstra, A. J. *The Lipid Handbook 3rd Ed*; CRC Press: Boca Raton, 2007.
41. Peets, H. Pesemisvahendid Ja Nende Kasutamine Tekstiilide Konserveerimisel. *Renovatum Anno*. **1991**, 19–21.
42. Smulders, E.; Rähse, W.; Jakobi, G. *Laundry Detergents*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
43. Broze, G. *Handbook of Detergents: Properties*; CRC Press, 1999.

LISAD

LISA 1 – Töös kasutatavad värvained ja neis sisalduvad komponendid

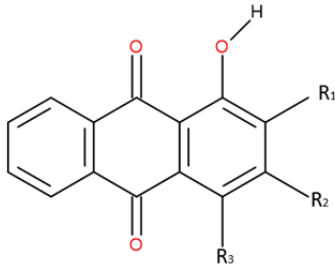
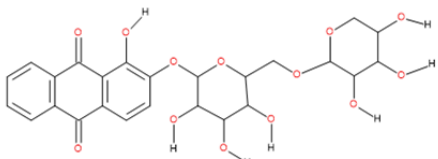
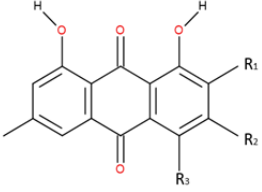
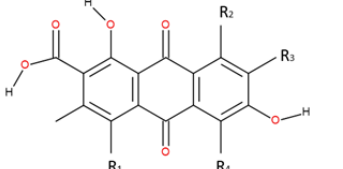
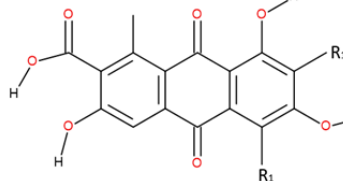
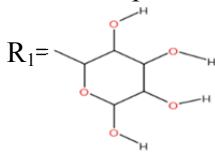
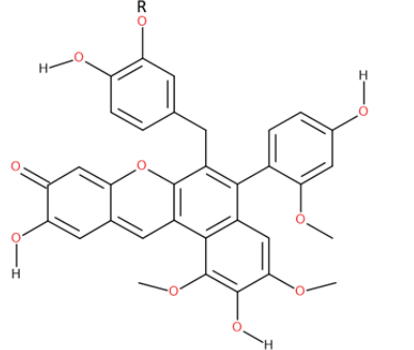
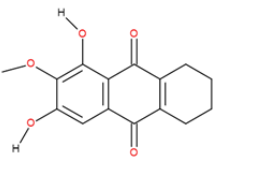
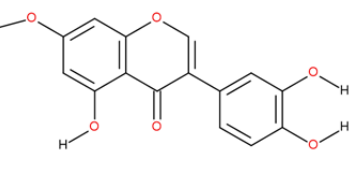
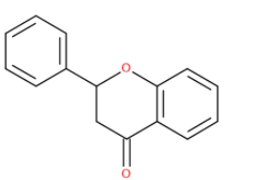
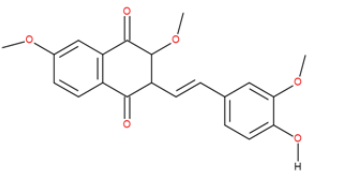
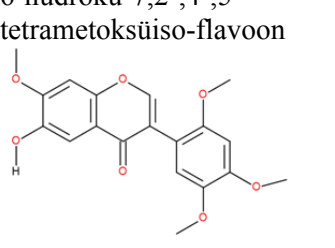
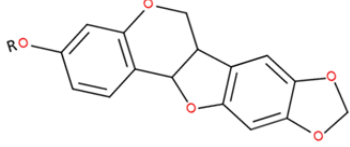
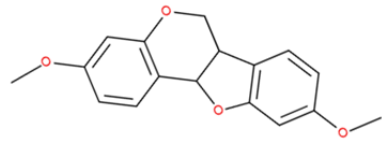
Tabel 1. Analüüsitavad punased värvained, neis sisalduvad komponendid ning nende keemilised koostised koos molekulidele ja ioonidele vastavate massidega. [1, 2, 3]

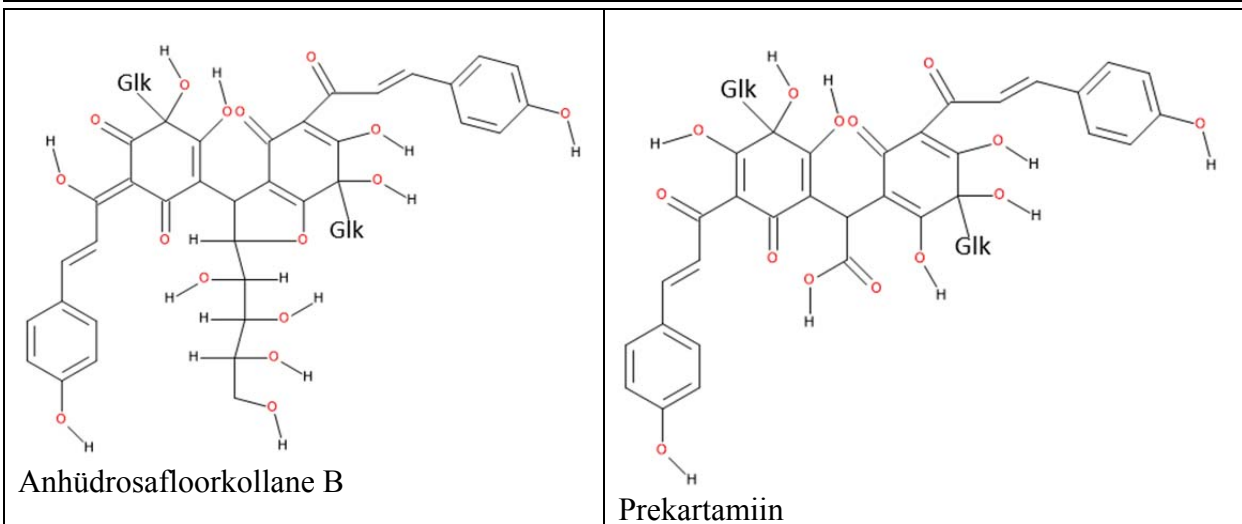
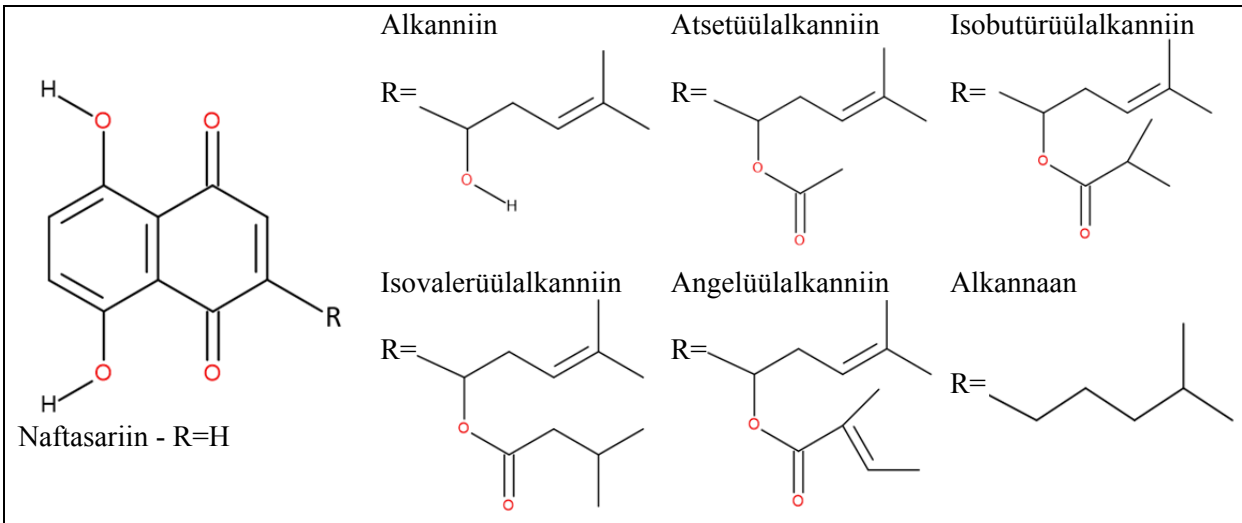
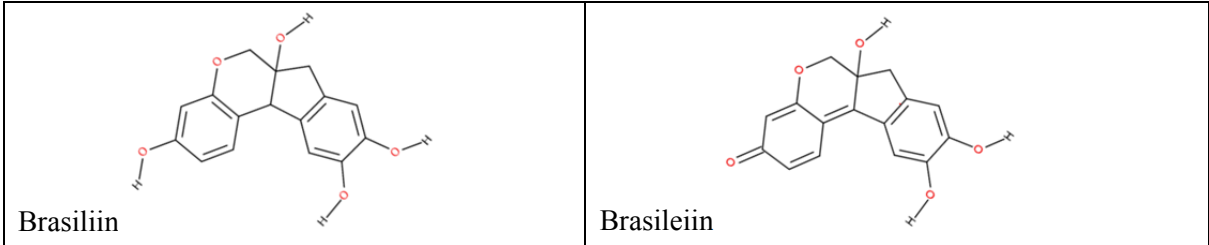
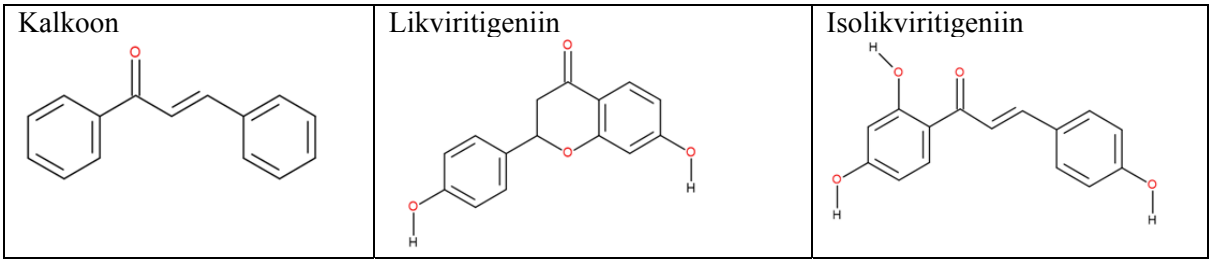
Looduslik allikas	Värvaine nimetus	Ühendi keemiline koostis	Molekulmass (M_w)	$[M-H]^-$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
Puna-värvik	Alisariin	$C_{14}H_8O_4$	240.04226	239.03498	241.04954	263.03148
	Ruberüthape	$C_{25}H_{26}O_{13}$	534.13734	533.13006	535.14462	557.12656
	Pseudopurpuriin	$C_{15}H_8O_7$	300.02700	299.01973	301.03428	323.01622
	Rubiadiin	$C_{15}H_{10}O_4$	254.05791	253.05063	255.06519	277.04713
	Munjistiin	$C_{15}H_8O_6$	284.03209	283.02481	285.03936	307.02131
	Kristofiin	$C_{17}H_{14}O_5$	298.08412	297.07685	299.09140	321.07334
	Purpuriin	$C_{14}H_8O_5$	256.03717	255.02990	257.04445	279.02639
	Ksantopurpuriin	$C_{14}H_8O_4$	240.04226	239.03498	241.04954	263.03148
Lutsidiin	$C_{15}H_{10}O_5$	270.05282	269.04555	271.06010	293.04204	
Verev vöödik	Emodiin	$C_{15}H_{10}O_5$	270.05282	269.04555	271.06010	293.04204
	Dermotsübiin	$C_{16}H_{12}O_7$	316.05830	315.05103	317.06558	339.04752
	Dermorubiin	$C_{17}H_{12}O_8$	344.05322	343.04594	345.06049	367.04244
	Füstsioon	$C_{16}H_{12}O_5$	284.06847	283.06120	285.07575	307.05769
	Endokrosiin	$C_{16}H_{10}O_7$	314.04265	313.03538	315.04993	337.03187
	Dermoglausiin	$C_{16}H_{12}O_6$	300.06339	299.05611	301.07066	323.05261
	Dermoluteiin	$C_{17}H_{12}O_7$	328.05830	327.05103	329.06558	351.04752
	7-kloroemodiin	$C_{15}H_9O_5Cl$	304.01385	303.00657	305.02113	327.00307
	5,7-dikloro-emodiin	$C_{15}H_8O_5Cl_2$	337.97488	336.96760	338.98216	360.96410
	5,7-dikloro-endokrosiin	$C_{16}H_8O_7Cl_2$	381.96471	380.95743	382.97198	404.95393
Košenill	Karmiinhape	$C_{22}H_{20}O_{13}$	492.09039	491.08311	493.09767	515.07961
	Kermeshape	$C_{16}H_{10}O_8$	330.03757	329.03029	331.04484	353.02679
	Flavokermeshape	$C_{16}H_{10}O_7$	314.04265	313.03538	315.04993	337.03187
Kermes	Kermeshape	$C_{16}H_{10}O_8$	330.03757	329.03029	331.04484	353.02679
	Flavokermeshape	$C_{16}H_{10}O_7$	314.04265	313.03538	315.04993	337.03187
Sandlipuu	Santaliin A	$C_{33}H_{26}O_{10}$	582.15260	581.14532	583.15987	605.14182
	Santaliin B	$C_{34}H_{28}O_{10}$	596.16825	595.16097	597.17552	619.15747
	Deoksüsantaliin	$C_{20}H_{18}O_6$	354.11034	353.10306	355.11761	377.09956
	Santaliin (jic)	$C_{15}H_{14}O_5$	274.08412	273.07685	275.09140	297.07334
	Santaal	$C_{16}H_{12}O_6$	300.06339	299.05611	301.07066	323.05261
	6-hüdrokü-7,2',4',5'-tetrametoksüiso-flavoon	$C_{19}H_{18}O_7$	358.10525	357.09798	359.11253	381.09447
	Pterokarpiin	$C_{17}H_{14}O_5$	298.08412	297.07685	299.09140	321.07334
	Homopterokarpiin	$C_{17}H_{16}O_4$	284.10486	283.09758	285.11214	307.09408
	Maakiaiin	$C_{16}H_{12}O_5$	284.06847	283.06120	285.07575	307.05769

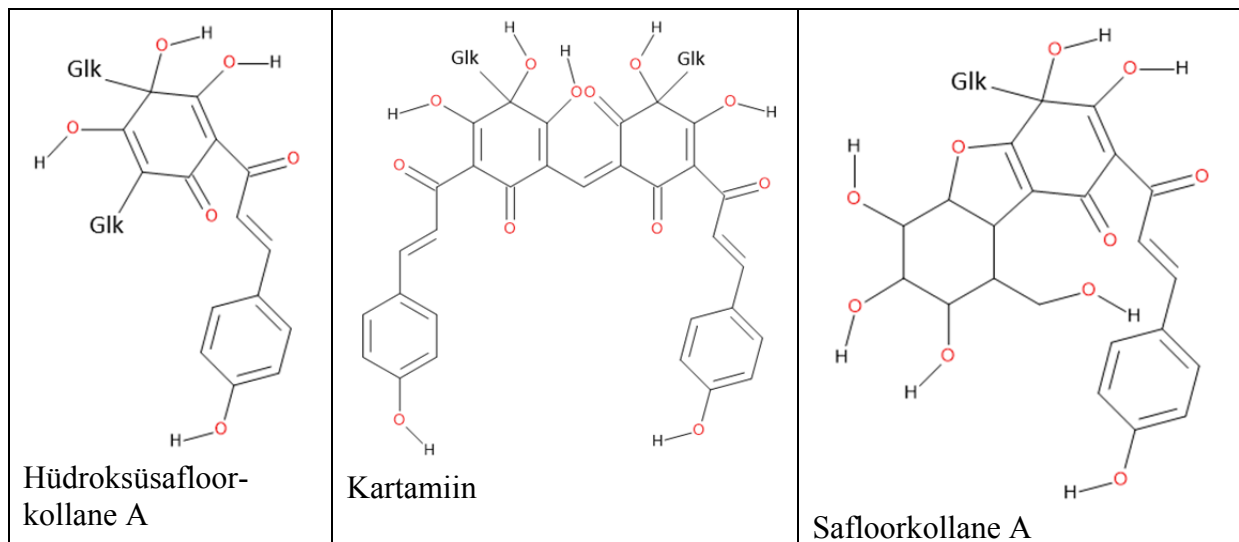
	Flavanoon	$C_{15}H_{12}O_2$	224.08373	223.07645	225.09101	247.07295
	Likviritigeniin	$C_{15}H_{12}O_4$	256.07356	255.06628	257.08084	279.06278
	Kalkoon	$C_{15}H_{12}O$	208.08882	207.08154	209.09609	231.07804
	Isolikviritigeniin	$C_{15}H_{12}O_4$	256.07356	255.06628	257.08084	279.0678
Siiltsesal- piiniapuu	Brasiliin	$C_{16}H_{14}O_5$	286.08412	285.07685	287.09140	309.07334
	Brasileiin	$C_{16}H_{12}O_5$	284.06847	283.06120	285.07575	307.05769
Värvi- alkanna	Naftasariin	$C_{10}H_6O_4$	190.02661	189.01933	191.03389	213.01583
	Alkanniin	$C_{16}H_{16}O_5$	288.09977	287.09250	289.10705	311.08899
	Atsetüül- alkanniin	$C_{18}H_{18}O_6$	330.11034	329.10306	331.11761	353.09956
	Isobutürüül- alkanniin	$C_{20}H_{22}O_6$	358.14164	357.13436	359.14891	381.13086
	Isovalerüül- alkanniin	$C_{21}H_{24}O_6$	372.15729	371.15001	373.16456	395.14651
	Angelüül- alkanniin	$C_{21}H_{22}O_6$	370.14164	369.13436	371.14891	393.13086
	Alkannaan	$C_{16}H_{18}O_4$	274.12051	273.11323	275.12779	297.10973
Värvi- safloor	Kartamiin	$C_{43}H_{42}O_{22}$	910.21677	909.20950	911.22405	933.20599
	Hüdroksüsafloor- kollane A	$C_{27}H_{32}O_{16}$	612.16903	611.16176	613.17631	635.15826
	Prekartamiin (kollane)	$C_{44}H_{44}O_{24}$	956.22225	955.21498	957.22953	979.21147
	Anhüdrosafloor- kollane B	$C_{48}H_{52}O_{26}$	1044.2746	1043.26741	1045.28196	1067.2639
	Isokartamiin	$C_{21}H_{22}O_{11}$	450.11621	449.10894	451.12349	473.10543
	Safloorkollane A	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.15847	593.15119	595.16575	617.14769

1. Cardon, D. *Natural Dyes*; Archetype Books: London, 2007.
2. Thomson, R. H. *Naturally Occurring Quinones*; Academic Press: London, 1971.
3. Gulrajani, M. L.; Bhaumik, S.; Oppermann, W.; Hardtmann, G. Dyeing of Red Sandalwood on Wool and Nylon. *Indian J. Fibre Text. Res.* **2003**, 28, 221–226.

Erinevate värvainete keemilised struktuurid ja nimetused

	<p>Alisariin – $R_1=OH, R_2=H, R_3=H$ Pseudopurpuriin – $R_1=COOH, R_2=OH, R_3=OH$ Rubiadiin – $R_1=CH_3, R_2=OH, R_3=H$ Munjistiin – $R_1=COOH, R_2=OH, R_3=H$ Kristofiin – $R_1=CH_2-O-CH_2CH_3, R_2=OH, R_3=H$ Purpuriin – $R_1=OH, R_2=H, R_3=OH$ Lutsidiin – $R_1=CH_2OH, R_2=OH, R_3=H$ Ksantopurpuriin – $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$</p>	
<p>Ruberüüthape</p> 	 <p>Emodiin - $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$ Dermotsübiin - $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=OH$ Füstsiin - $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=H$ Dermoglausiin - $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=H$ 7-kloroemodiin - $R_1=Cl, R_2=OH, R_3=H$ 5,7-kloroemodiin - $R_1=Cl, R_2=OH, R_3=Cl$</p>	
	<p>Dermorubiin – $R_1=OH, R_2=OCH_3, R_3=H, R_4=H$ Dermoluteiin - $R_1=H, R_2=OCH_3, R_3=H, R_4=H$ Endokrosiin - $R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=H$ 5,7-dikloroendokrosiin - $R_1=H, R_2=OH, R_3=Cl, R_4=Cl$</p>	
	<p>Kermeshape – $R_1=H, R_2=OH$ Flavokermeshape – $R_1=H, R_2=H$</p> <p>Karmiinhape – $R_2=OH,$ $R_1=$ </p>	
 <p>Santaliin A – $R=H$ Santaliin B – $R=CH_3$</p>	<p>Santaliin</p> 	<p>Santaal</p> 
	<p>Flavanon</p> 	<p>Deoksüsantaliin</p> 
<p>6-hüdrokü-7,2',4',5'-tetrametoksüiso-flavoon</p> 	 <p>Pteokarpiin – $R=CH_3$ Maakiaiin – $R=H$</p>	<p>Homopteokarpiin</p> 





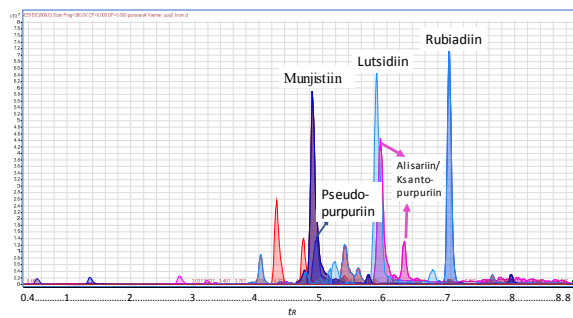
Glk = glükoos

LISA 2 – Värvainete lahused ja värvitud kiud

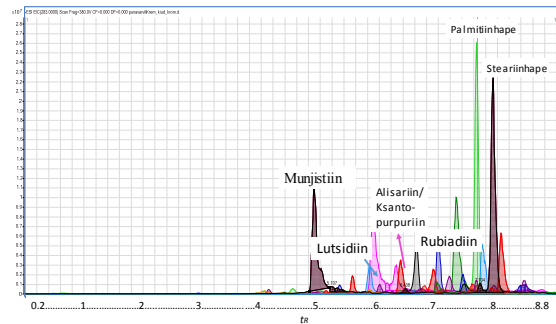


1– ERMist saadud punavärviku ja vereva vöödiku vesilahused, 2 - Košenilli, sandlipuu, siiltsesalpiiniapuu ja värvisafloori vesilahused, 3 – Kermese vesilahused, 4 – värvialkanna etanoolilahused, 5 – värvisafloori lahused erinevatel pH-del, 6 – sandlipuu etanoolilahused, 7 – punavärviku lahused (Kremer Pigmente), 8 – ERMist saadu punavärviku ja vereva vöödikuga värvitud villakiud, 9 – siiltsesalpiiniapuga värvitud villakiud, 10 – košenilliga värvitud villakiud, 11 – sandlipuuga värvitud villakiud (vesilahus), 12 – sandlipuuga värvitud villakiud (etanoolilahus), 13 – värvialkanna etanoolilahusega ja punavärvikuga (Kremer Pigmente) värvitud villakiud, 14 – värvisaflooriga värvitud villa- ja puuvillakiud, 15 – kermesega värvitud villakiud 16 – erinevatel töötlustappidel saadud värvilahused

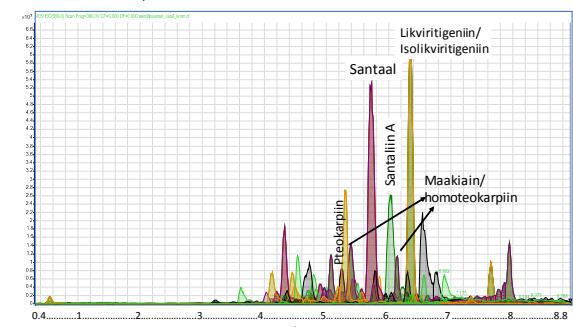
LISA 3. Värvaine standardite kombineeritud kromatogramm – taime- või putukaleotis ja kiududest ekstraheeritud värvainelahus.



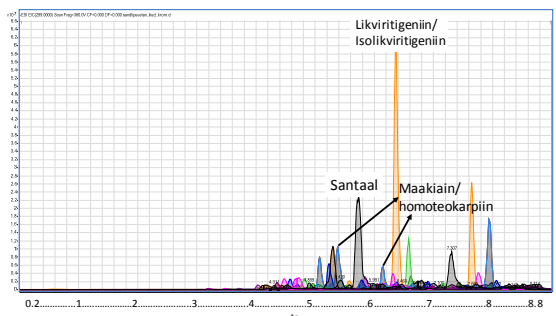
Joonis 1. Punavärviku lahus (30 minut kuumutamist)



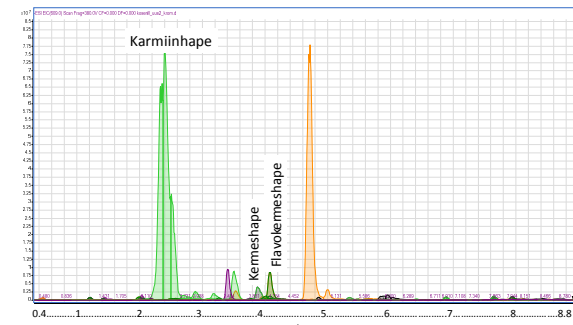
Joonis 2. Punavärvikuga värvitud villakiududest saadud ekstrakt



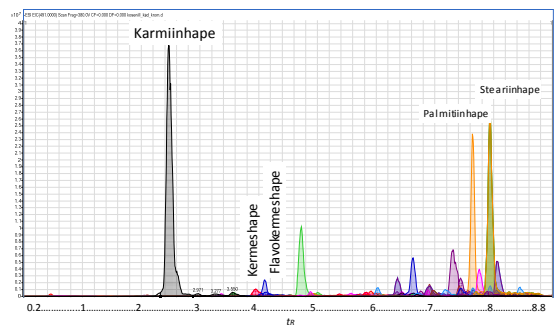
Joonis 3. Sandlipuu lahus (30 minutit kuumutamist)



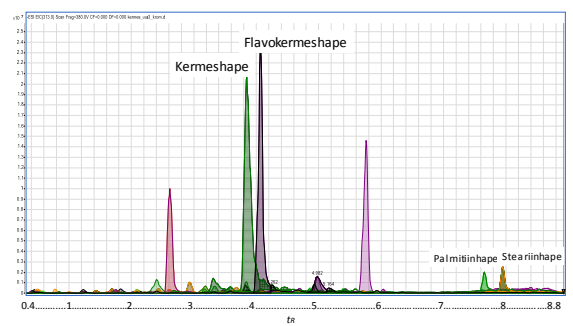
Joonis 4. Sandlipuuga värvitud villakiududest saadud ekstrakt



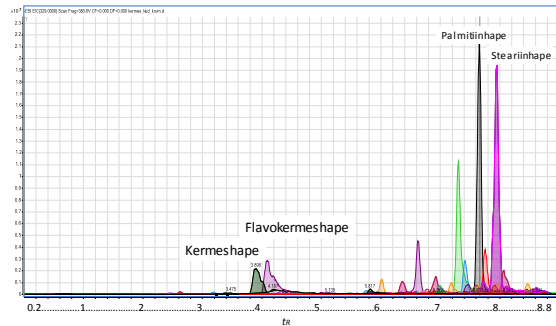
Joonis 5. Košenilli lahus (30 minutit kuumutamist)



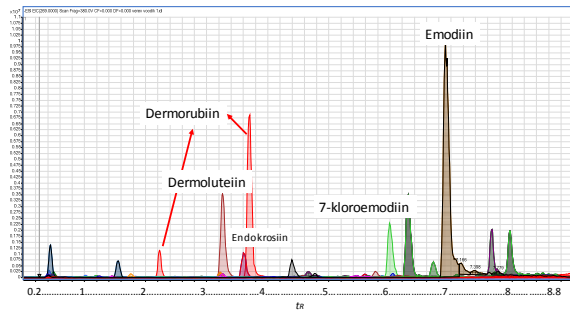
Joonis 6. Košenilliga värvitud villakiududest saadud ekstrakt



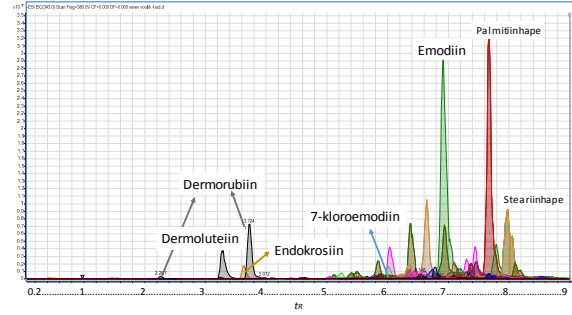
Joonis 7. Kermese lahus (60 minutit kuumutamist)



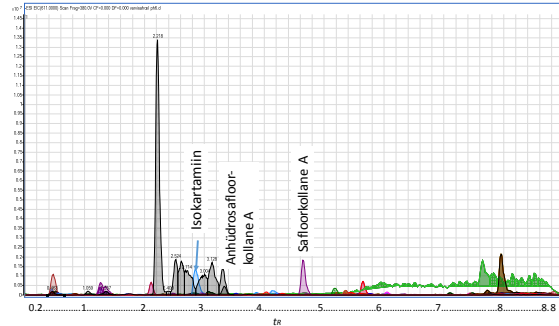
Joonis 8. Kermese kiudude ekstrakt



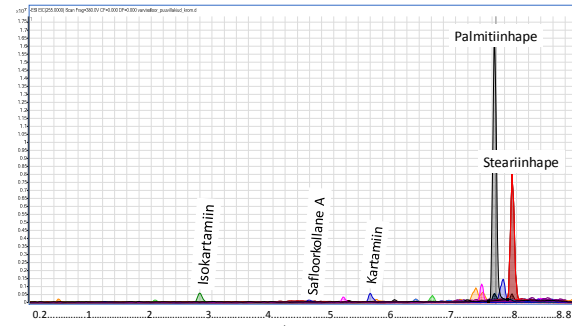
Joonis 9. Vereva vöödiku lahus (4 tundi kuumutamist)



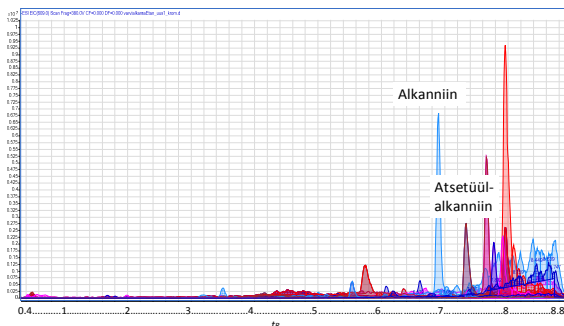
Joonis 10. Vereva vöödikuga värvitud villakiududest saadud ekstrakt



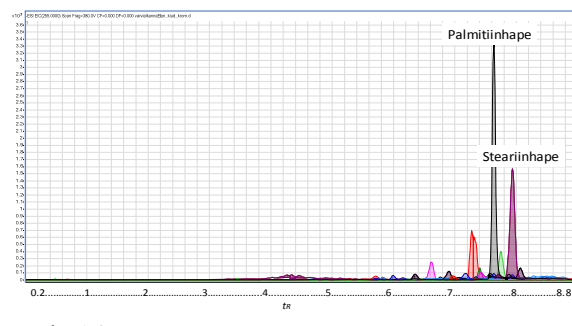
Joonis 11. Värvisaffloor lahus pH=6



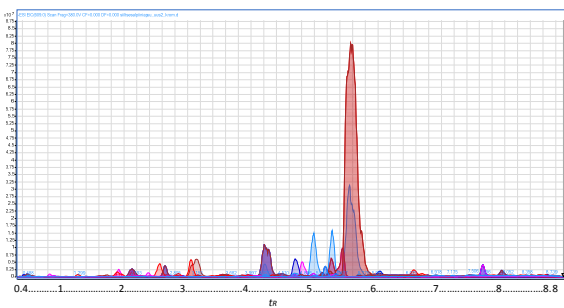
Joonis 12. Värvisafflooriga värvitud puuvillakiust saadud ekstrakt



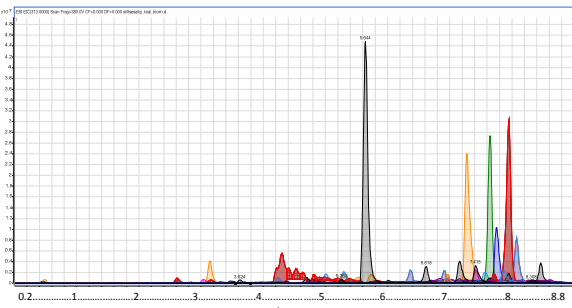
Joonis 13. Värvialkanna lahus (16 tundi 40% etanoolis seisnud)



Joonis 14. Värvialkannaga värvitud villakiududest saadud ekstrakt



Joonis 15. Siiltsesalpiiniapuu lahus (30 minutit kuumutamist)



Joonis 16. Siiltsesalpiinipuuga värvitud villa-kiududest saadud ekstrakt

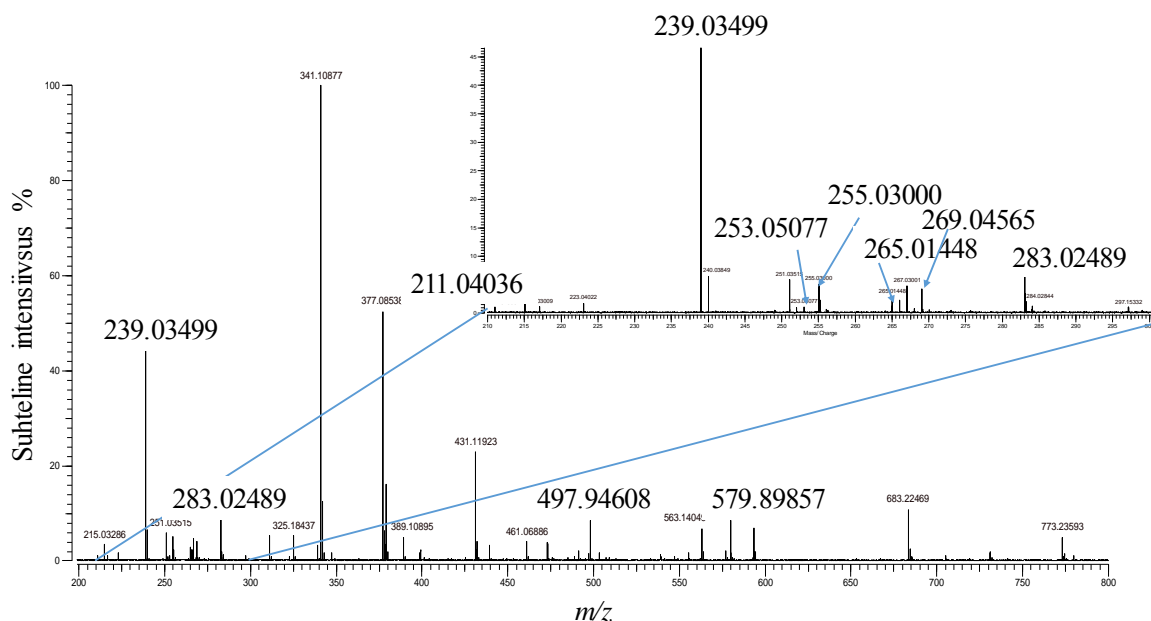
LISA 4 – Värvainete tulemuste koondtabel

Tabel 2. Värvaine standardite tulemuste koontabel, kus on toodud igale värvaine allikale iseloomulike komponentide m/z väärtused ja massivead ($\Delta m/z$) ESI-ja MALDI-FT-ICR-MS korral ning retentsiooniaeg ja MS/MS analüüsi fragmendi kadu HPLC-QQQ-MS analüüsil

Värvaine allikas	Värvaine molekul	MALDI-FT-ICR m/z ja $\Delta m/z$ (ppm) * $[M+H]^+$ ** $[M+Na]^+$	ESI-FT-ICR m/z ja $\Delta m/z$ (ppm) $[M-H]^-$	HPLC-MS t_R (min), (fragmendi kadu)
Punavärvik	Alisariin	$m/z=241.04942^*$ $\Delta m/z=0.50$	$m/z=239.03499$ $\Delta m/z=0.05$	5.9/6.3 (-H ₂ O)
	Ksantopurpuriin	241.04942* $\Delta m/z=0.50$	$m/z=239.03499$ $\Delta m/z=0.05$	5.9/6.3 (-H ₂ O)
	Rubiadiin	255.06517* $\Delta m/z=0.07$	$m/z=253.05077$ $\Delta m/z=0.54$	5.3/7 (-H ₂ O ja -CO)
	Munjistiin	-	$m/z=283.02489$ $\Delta m/z=0.28$	4.9 (-CO ₂ ; -H ₂ O)
	Pseudopurpuriin	-	$m/z=299.02014$ $\Delta m/z=1.38$	4.9 (-CO ₂)
	Lutsidiin	$m/z=271.06041^*$ $\Delta m/z=1.13$	$m/z=269.04565$ $\Delta m/z=0.39$	5.9 (-H ₂ O)
Sandlipuu	Santaliin A	$m/z=583.15948^*$ $\Delta m/z=-0.68$ $m/z=605.14203^{**}$ $\Delta m/z=0.34$	$m/z=581.14573$ $\Delta m/z=0.70$	6.1
	Santaliin B	$m/z=597.17512^*$ $\Delta m/z=-0.68$ $m/z=619.15813^{**}$ $\Delta m/z=1.06$	$m/z=595.16111$ $\Delta m/z=0.22$	6.6
	Maakiaiin	$m/z=285.07560^*$ $\Delta m/z=-0.51$	$m/z=283.06107$ -0.47	5.1/5.4/6.2 (-CO ₂ - 5.4)
	Pterokarpiin	$m/z=299.09140^*$ $\Delta m/z=0.01$	$m/z=297.07693$ $\Delta m/z=0.26$	5.3 (-H ₂ O)
	Santaal	$m/z=301.07084^*$ $\Delta m/z=0.58$	$m/z=299.05599$ $\Delta m/z=-0.42$	5.7 (-CO; -CO ₂)
Košenill	Karmiinhape	$m/z=515.07956^{**}$ $\Delta m/z=-0.11$	$m/z=491.08332$ $\Delta m/z=0.40$	2.5 (-CO ₂)
	Kermeshape	-	$m/z=329.03002$ $\Delta m/z=-0.82$	3.9 (-CO ₂)
	Flavokermeshape	-	$m/z=313.03558$ $\Delta m/z=0.66$	4.1 (-CO ₂)

Kermes	Kermeshape	-	$m/z=329.03013$ $\Delta m/z=-0.50$	3.9 (-CO ₂)
	Flavokermeshape	-	$m/z=313.03533$ $\Delta m/z=-0.17$	4.1 (-CO ₂)
Verev vöödik	Emodiin	-	$m/z=269.04565$ $\Delta m/z=0.36$	6.9 (-H ₂ O; -CO)
	7-kloro- emodiin	-	$m/z=303.00655$ $\Delta m/z=-0.07$	6.0 (-CO)
	Endokrosiin	-	$m/z=313.03505$ $\Delta m/z=-1.05$	3.6 (-CO ₂)
	Dermoluteiin	-	$m/z=327.05110$ $\Delta m/z=0.23$	3.3 (-CO ₂)
	Dermorubiin	-	$m/z=343.04620$ $\Delta m/z=0.76$	2.2 / 3.7 (-CO ₂ - 3.7)
Värvi- safloor	Isokartamiin	$m/z=473.10499^{**}$ $\Delta m/z=-0.95$	-	2.8
	Safloor- kollane A	$m/z=617.14764^{**}$ $\Delta m/z=-0.09$	-	4.6
	Anhüdro- safloor- kollane B	$m/z=1067.26212^{**}$ $\Delta m/z=-1.67$	-	3.3
	Kartamiin	$m/z=933.20517^{**}$ $\Delta m/z=-0.90$	-	5.1
Värvi- alkanna	Alkanniin	-	$m/z=287.09235$ $\Delta m/z=-0.51$	6.9
	Atsetüül- alkanniin	-	$m/z=329.10344$ $\Delta m/z=1.14$	7.3
	Angelüül- alkanniin	-	$m/z=369.13426$ $\Delta m/z=-0.27$	7.4

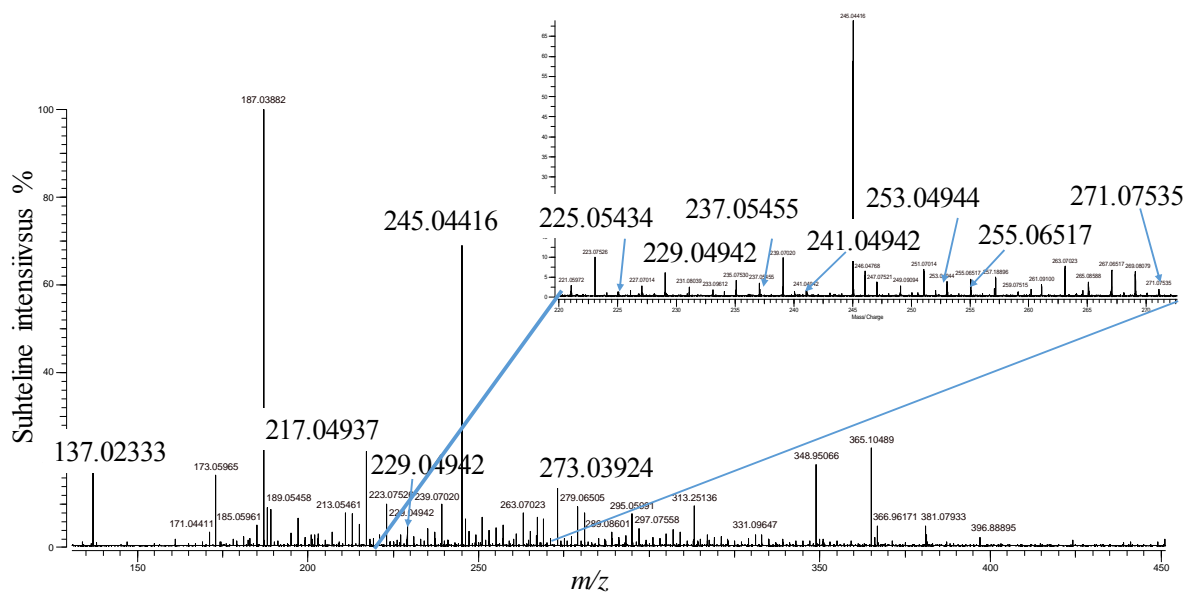
LISA 5 – Värvainete ESI-ja MALDI-FT-ICR-MS massispektrid ja interpreteeringud



Joonis 17. Punavärviku lahuse ESI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 3. Punavärviku lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

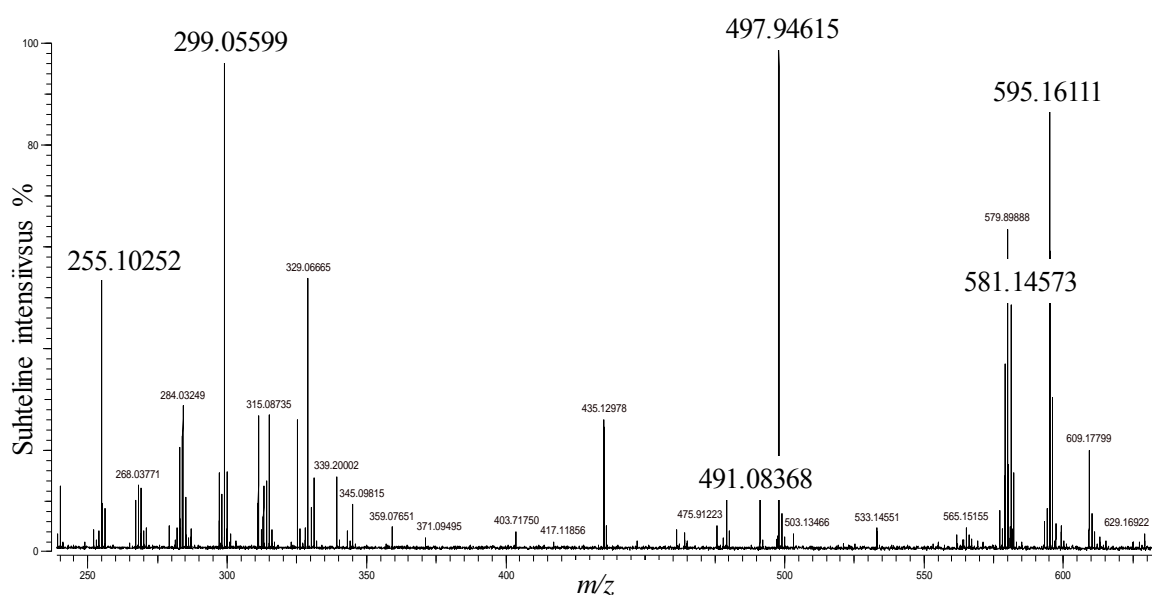
Mõõdetud m/z	Ioonvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Anioon	Eeldatav ühend
211.04036	$C_{13}H_7O_3^-$	1.38	$[C_{14}H_8O_4-CO-H]^-$	Alisariin/ksantopurpiin
239.03499	$C_{14}H_7O_4^-$	0.05	$[C_{14}H_8O_4-H]^-$	Alisariin/ksantopurpiin
253.05077	$C_{15}H_9O_4^-$	0.54	$[C_{15}H_{10}O_4-H]^-$	Rubiadiin
255.03000	$C_{14}H_7O_5^-$	0.41	$[C_{14}H_8O_5-H]^-$	Purpuriin
255.23291	$C_{16}H_{31}O_2^-$	-0.16	$[C_{16}H_{32}O_2-H]^-$	Palmitiinhape
265.01448	$C_{15}H_5O_5^-$	0.87	$[C_{15}H_8O_6-H_2O-H]^-$	Munjistiin
269.04565	$C_{15}H_9O_5^-$	0.39	$[C_{15}H_{10}O_5-H]^-$	Lutsidiin
283.02489	$C_{15}H_7O_6^-$	0.28	$[C_{15}H_8O_6-H]^-$	Munjistiin
283.26431	$C_{18}H_{35}O_2^-$	0.19	$[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$	Steariinhape
299.02014	$C_{15}H_7O_7^-$	1.38	$[C_{15}H_8O_7-H]^-$	Pseudopurpuriin



Joonis 18. Punavärviku lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 4. Punavärviku lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

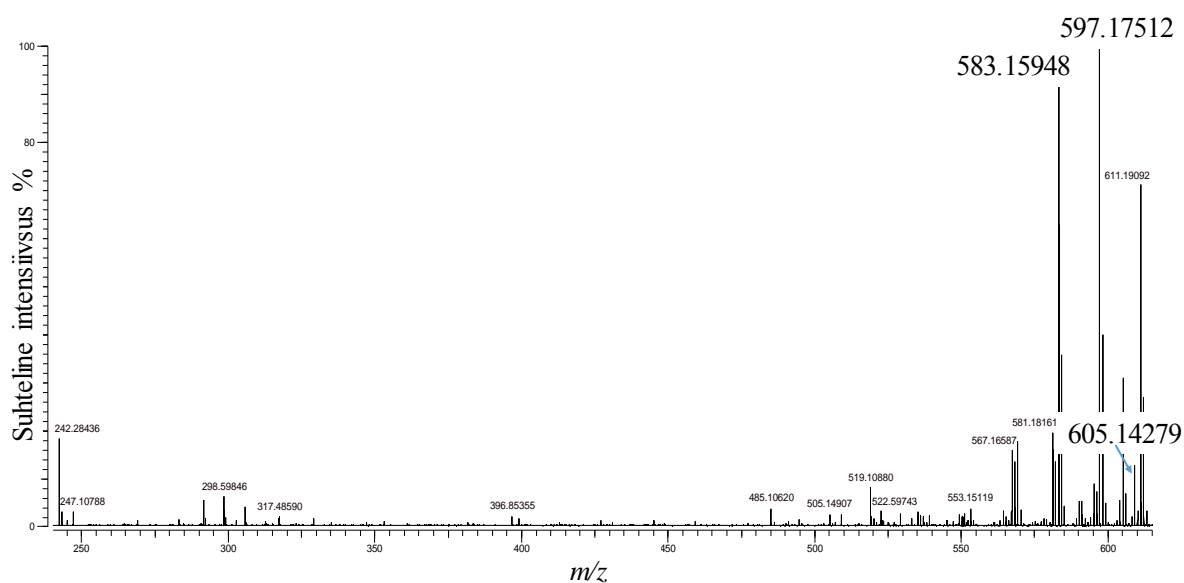
Mõõdetud m/z	Ioonvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Katioon	Eeldatav ühend
225.05434	$C_{14}H_9O_3^+$	-1.25	$[C_{15}H_{10}O_5-H_2O-CO+H]^+$	Lutsidiin
229.04942	$C_{13}H_9O_4^+$	-0.49	$[C_{14}H_8O_5-CO+H]^+$	Purpuriin
237.05455	$C_{15}H_9O_3^+$	-0.28	$[C_{15}H_{10}O_4-H_2O+H]^+$	Rubiadiin
241.04942	$C_{14}H_9O_4^+$	-0.5	$[C_{14}H_8O_4+H]^+$	Alisariin/ksantopurpuriin
253.04944	$C_{15}H_9O_4^+$	-0.39	$[C_{15}H_{10}O_5-H_2O+H]^+$	Lutsidiin
255.06517	$C_{15}H_{11}O_4^+$	-0.07	$[C_{15}H_{10}O_4+H]^+$	Rubiadiin
271.06041	$C_{15}H_{11}O_5^+$	1.13	$[C_{15}H_{10}O_5+H]^+$	Lutsidiin



Joonis 19. Sandlipuu lahuse ESI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 5. Sandlipuu lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

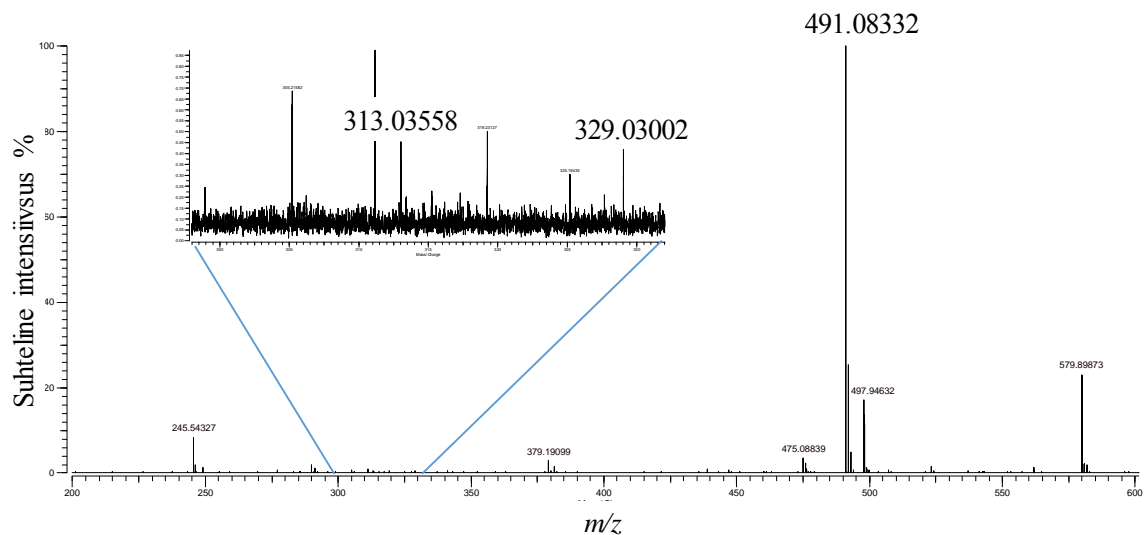
Mõõdetud <i>m/z</i>	Ioonvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Anioon	Eeldatav ühend
255.02998	$C_{14}H_7O_5^-$	0.3	$[C_{14}H_8O_5-H]^-$	Purpuriin
255.23279	$C_{16}H_{31}O_2^-$	-0.63	$[C_{16}H_{32}O_2-H]^-$	Palmitiinhape
269.04516	$C_{15}H_9O_5^-$	-1.43	$[C_{15}H_{10}O_5-H]^-$	Lutsidiin, emodiin
283.02506	$C_{15}H_7O_6^-$	0.86	$[C_{15}H_8O_6-H]^-$	Munjistiin
283.06107	$C_{16}H_{11}O_5^-$	-0.47	$[C_{16}H_{12}O_5-H]^-$	Maakiain
283.26447	$C_{18}H_{35}O_2^-$	0.77	$[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$	Steariinhape
285.07687	$C_{16}H_{13}O_5^-$	0.06	$[C_{16}H_{14}O_5-H]^-$	Brasiliin
287.09248	$C_{16}H_{15}O_5^-$	-0.07	$[C_{16}H_{16}O_5-H]^-$	Alkanniin
297.07693	$C_{17}H_{13}O_5^-$	0.26	$[C_{17}H_{14}O_5-H]^-$	Pteokarpiin
299.05599	$C_{16}H_{11}O_6^-$	-0.42	$[C_{16}H_{12}O_6-H]^-$	Santaal
313.03540	$C_{16}H_9O_7^-$	0.06	$[C_{16}H_{10}O_7-H]^-$	Endokrosiin
315.05152	$C_{16}H_{11}O_7^-$	1.57	$[C_{16}H_{12}O_7-H]^-$	Dermotsübiin
491.08368	$C_{22}H_{19}O_{13}^-$	1.13	$[C_{22}H_{20}O_{13}-H]^-$	Karmiinhape
581.14573	$C_{33}H_{25}O_{10}^-$	0.7	$[C_{33}H_{26}O_{10}-H]^-$	Santaliin A
595.16111	$C_{34}H_{27}O_{10}^-$	0.22	$[C_{34}H_{28}O_{10}-H]^-$	Santaliin B



Joonis 20. Sandlipuu lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 6. Sandlipuu lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

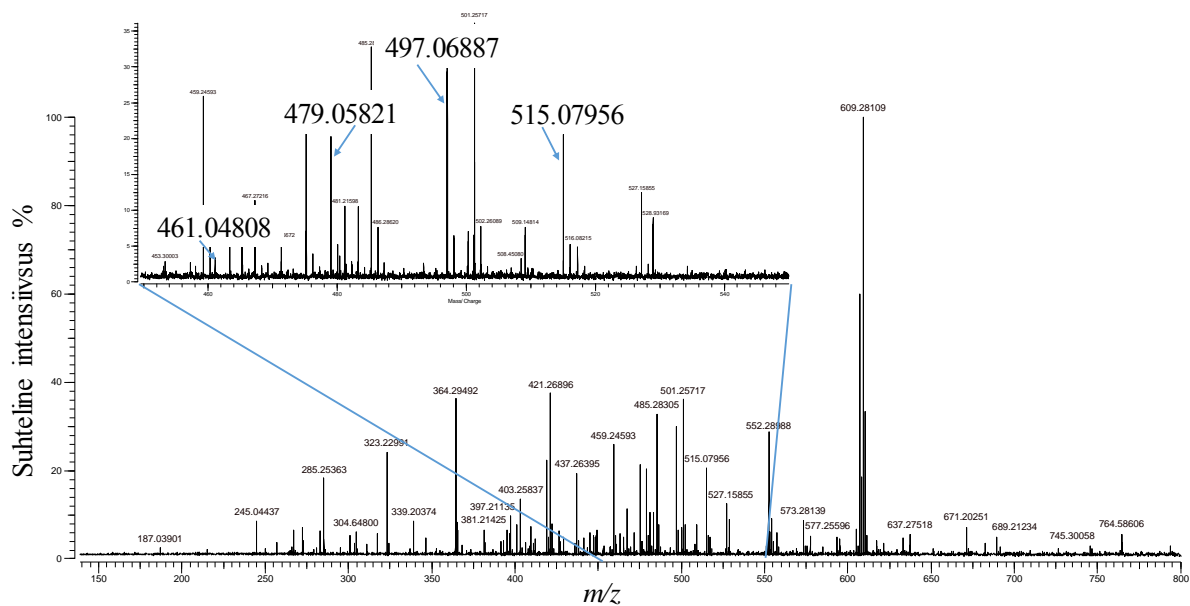
Mõõdetud m/z	Ionvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Katioon	Eeldatav ühend
299.09140	$C_{17}H_{15}O_5^+$	0.01	$[C_{17}H_{14}O_5+H]^+$	Pteokarpiin
583.15948	$C_{33}H_{27}O_{10}^+$	-0.68	$[C_{33}H_{26}O_{10}+H]^+$	Santaliin A
597.17512	$C_{34}H_{29}O_{10}^+$	-0.68	$[C_{34}H_{28}O_{10}+H]^+$	Santaliin B
605.14279	$C_{33}H_{26}O_{10}Na^+$	1.61	$[C_{33}H_{26}O_{10}+Na]^+$	Santaliin A



Joonis 21. Košenilli lahuse ESI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 7. Košenilli lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

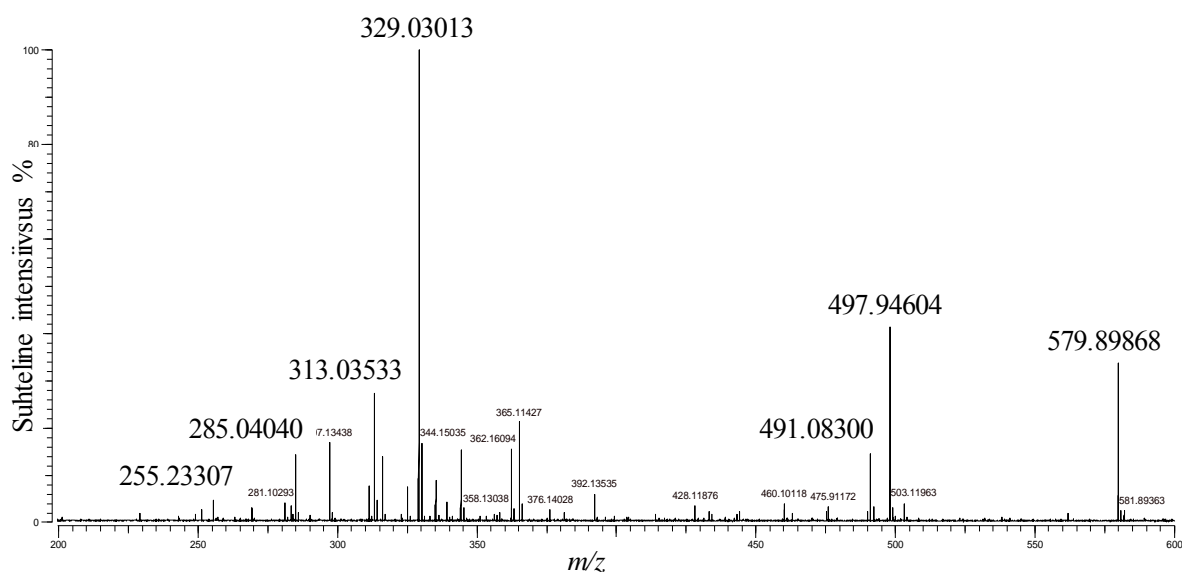
Mõõdetud <i>m/z</i>	Ioonvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Anioon	Eeldatav ühend
283.26422	$C_{18}H_{35}O^-$	-0.13	$[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$	Steariinhape
313.03558	$C_{16}H_9O_7^-$	0.66	$[C_{16}H_{10}O_7-H]^-$	Kermeshape
329.03002	$C_{16}H_9O_8^-$	-0.82	$[C_{16}H_{10}O_8-H]^-$	Flavokermeshape
491.08332	$C_{22}H_{19}O_{13}^-$	0.4	$[C_{22}H_{20}O_{13}-H]^-$	Karmiinhape



Joonis 22. Košenilli lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 8. Košenilli lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

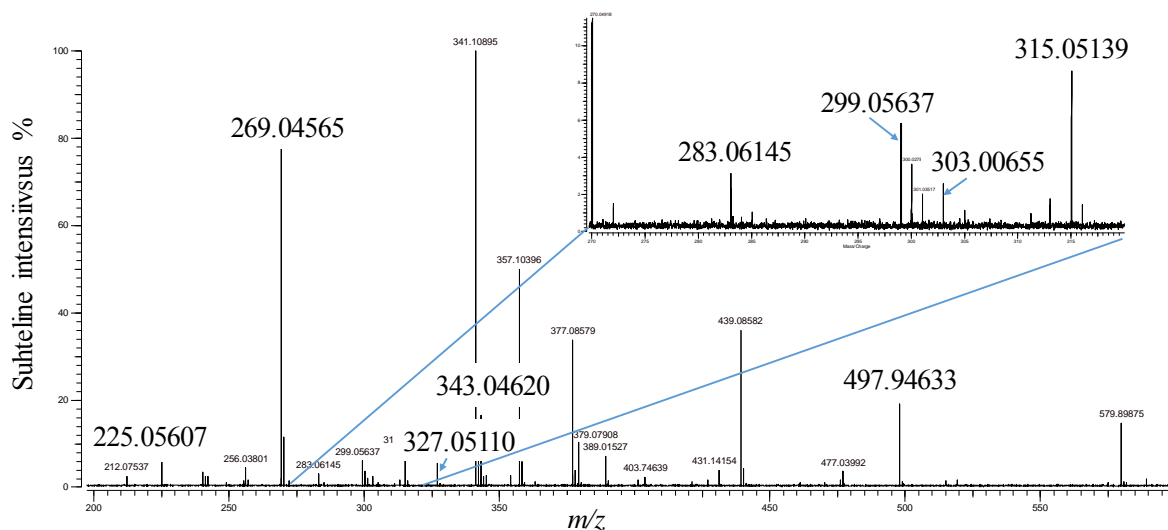
Mõõdetud m/z	Ioonvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Katioon	Eeldatav ühend
461.04808	$C_{22}H_{14}O_{10}Na^+$	0.35	$[C_{22}H_{20}O_{13}-3H_2O+Na]^+$	Karmiinhape
479.05820	$C_{22}H_{16}O_{11}Na^+$	-0.57	$[C_{22}H_{20}O_{13}-2H_2O+Na]^+$	Karmiinhape
497.06887	$C_{22}H_{18}O_{12}Na^+$	-0.36	$[C_{22}H_{20}O_{13}-H_2O+Na]^+$	Karmiinhape
515.07956	$C_{22}H_{20}O_{13}Na^+$	-0.11	$[C_{22}H_{20}O_{13}+Na]^+$	Karmiinhape



Joonis 23. Kermese lahuse ESI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 9. Kermes lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

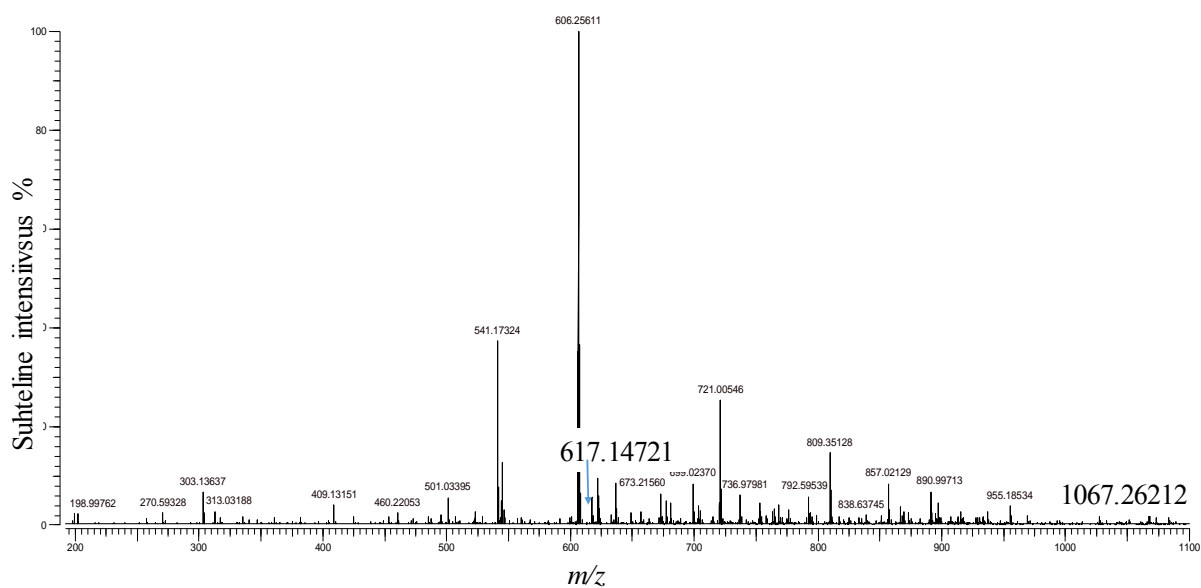
Mõõdetud m/z	Ioonvalem	$\Delta m/z$ ppm	Anioon	Eeldatav ühend
255.23307	$C_{16}H_{31}O_2^-$	0.46	$[C_{16}H_{32}O_2-H]^-$	Palmitiinhape
269.04573	$C_{15}H_9O_5^-$	0.67	$[C_{16}H_{10}O_7-CO_2-H]^-$	Flavokermeshape
283.26406	$C_{18}H_{35}O_2^-$	-0.69	$[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$	Steariinhape
285.04040	$C_{15}H_9O_6^-$	-0.22	$[C_{16}H_{10}O_8-CO_2-H]^-$	Kermeshape
313.03533	$C_{16}H_9O_7^-$	-0.17	$[C_{16}H_{10}O_7-H]^-$	Flavokermeshape
329.03013	$C_{16}H_9O_8^-$	-0.50	$[C_{16}H_{10}O_8-H]^-$	Kermeshape
491.08300	$C_{22}H_{19}O_{13}^-$	-0.24	$[C_{22}H_{20}O_{13}-H]^-$	Karmiinhape



Joonis 24. Vereva vöödiku lahuse ESI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 10. Vereva vöödiku lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

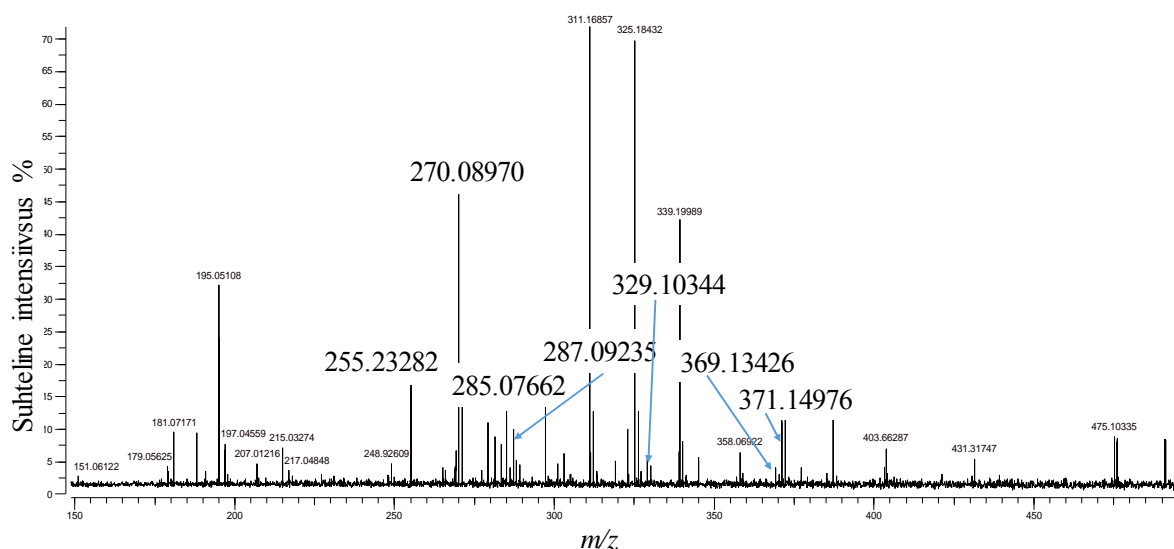
Mõõdetud m/z	Ionvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Anioon	Eeldatav ühend
225.05607	$C_{14}H_9O_3^-$	1.56	$[C_{15}H_{10}O_5 - CO_2 - H]^-$	Emodiin
255.23295	$C_{16}H_{31}O_2^-$	0.00	$[C_{16}H_{32}O_2 - H]^-$	Palmitiinhape
269.04565	$C_{15}H_9O_5^-$	0.36	$[C_{15}H_{10}O_5 - H]^-$	Emodiin
283.06145	$C_{16}H_{11}O_5^-$	0.9	$[C_{16}H_{12}O_5 - H]^-$	Füstsioon
299.05637	$C_{16}H_{11}O_6^-$	0.85	$[C_{16}H_{12}O_6 - H]^-$	Dermoglausiin
300.02782	$C_{15}H_8O_7^-$	0.88	$[C_{17}H_{12}O_8 - CH_3 - CO - H]^-$	Dermorubiin
303.00655	$C_{15}H_8O_5Cl^-$	-0.07	$[C_{15}H_9O_5Cl - H]^-$	7-kloroemodiin
313.03577	$C_{16}H_9O_7^-$	1.24	$[C_{16}H_{10}O_7 - H]^-$	Endokroosiin
315.05139	$C_{16}H_{11}O_7^-$	1.14	$[C_{16}H_{12}O_7 - H]^-$	Dermotsübiin
327.05110	$C_{17}H_{11}O_7^-$	0.23	$[C_{17}H_{12}O_7 - H]^-$	Dermoluteiin
343.04620	$C_{17}H_{11}O_8^-$	0.76	$[C_{17}H_{12}O_8 - H]^-$	Dermorubiin



Joonis 25. Värvisafloori lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 11. Värvisafloori lahuse MALDI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

Mõõdetud m/z	Ioonvalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Katsoon	Eeldatav ühend
473.10488	$C_{21}H_{22}O_{11}Na^+$	-1.17	$[C_{21}H_{22}O_{11}+Na]^+$	Isokartamiin
617.14721	$C_{27}H_{30}O_{15}Na^+$	-0.78	$[C_{27}H_{30}O_{15}+Na]^+$	Safloorkollane A
635.15753	$C_{27}H_{32}O_{16}Na^+$	-1.15	$[C_{27}H_{32}O_{16}+Na]^+$	Hüdroksüsafloorkollane A
933.20517	$C_{43}H_{42}O_{22}Na^+$	-0.9	$[C_{43}H_{42}O_{22}+Na]^+$	Kartamiin
1067.26212	$C_{48}H_{52}O_{26}Na^+$	-1.67	$[C_{48}H_{52}O_{26}+Na]^+$	Anhüdrosafloorkollane B

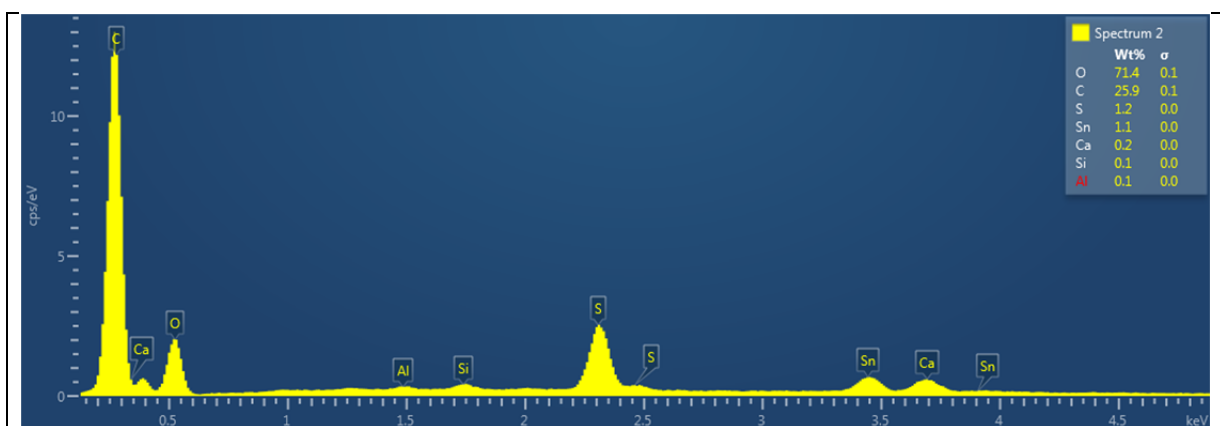


Joonis 26. Värvialkanna lahuse ESI-FT-ICR-MS massispekter

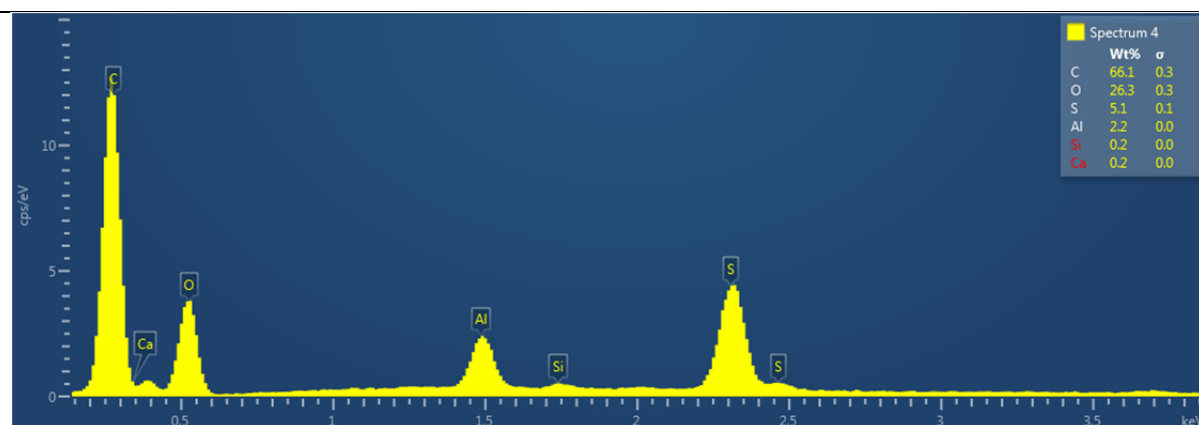
Tabel 12. Värvialkanna lahuse ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

<i>m/z</i>	Ioonvalem	$\Delta m/z$ ppm	Anioon	Eeldatav ühend
255.23282	$C_{16}H_{31}O_2^-$	-0.54	$[C_{16}H_{32}O_2-H]^-$	Palmitiinhape
270.08970	$C_{16}H_{14}O_4^-$	-0.22	$[C_{18}H_{18}O_6-C_2H_3O_2-H]^-$	Atsetüülalkanniin
270.08970	$C_{16}H_{14}O_4^-$	-0.22	$[C_{21}H_{22}O_6-C_5H_7O_2-H]^-$	Angelüülalkanniin
270.08970	$C_{16}H_{14}O_4^-$	-0.22	$[C_{21}H_{24}O_6-C_5H_9O_2-H]^-$	Isovalerüülalkanniin
283.26445	$C_{18}H_{35}O_2^-$	0.71	$[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$	Steariinhape
285.07662	$C_{16}H_{13}O_5^-$	-0.79	$[C_{18}H_{18}O_6-C_2H_4O-H]^-$	Atsetüülalkanniin
285.07662	$C_{16}H_{13}O_5^-$	-0.79	$[C_{21}H_{22}O_6-C_5H_8O-H]^-$	Angelüülalkanniin
285.07662	$C_{16}H_{13}O_5^-$	-0.79	$[C_{21}H_{24}O_6-C_5H_{10}O-H]^-$	Isovalerüülalkanniin
287.09235	$C_{16}H_{15}O_5^-$	-0.51	$[C_{16}H_{16}O_5-H]^-$	Alkanniin
329.10344	$C_{18}H_{17}O_6^-$	1.14	$[C_{18}H_{18}O_6-H]^-$	Atsetüülalkanniin
369.13426	$C_{21}H_{21}O_6^-$	-0.27	$[C_{21}H_{22}O_6-H]^-$	Angelüülalkanniin
371.14976	$C_{21}H_{23}O_6^-$	-0.69	$[C_{21}H_{24}O_6-H]^-$	Isovalerüülalkanniin

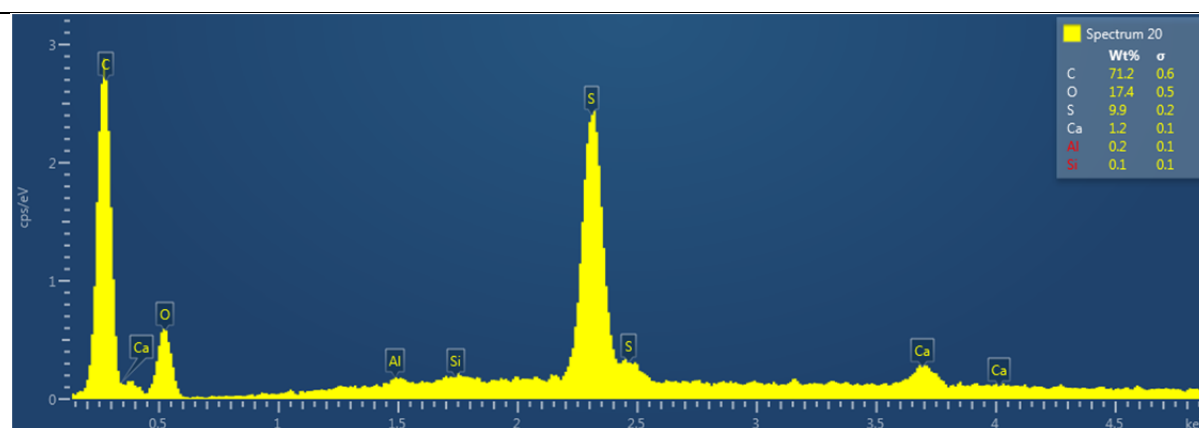
LISA 6 – SEM-EDS spektrid



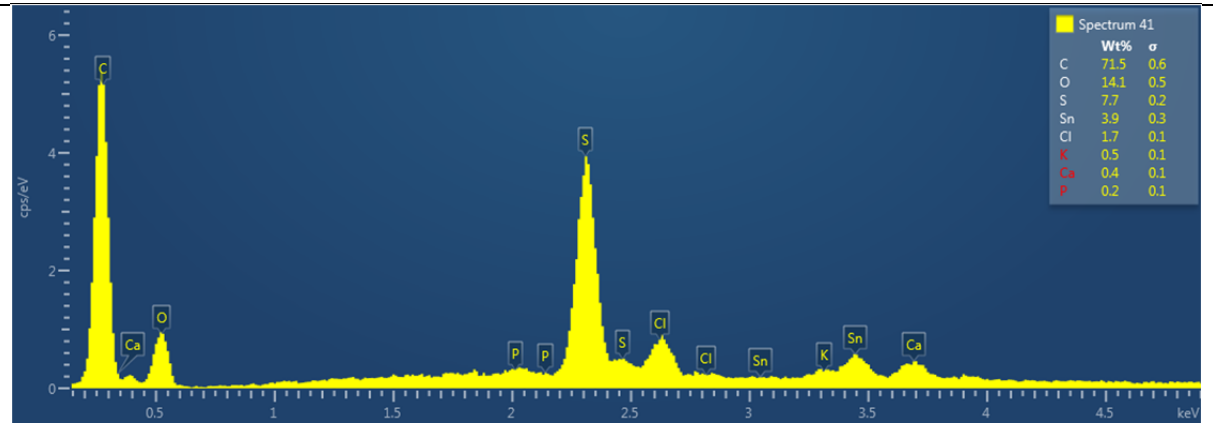
Joonis 27. SEM-EDS spekter vereva vöödikuga värvitud ja tinasoolaga peitsitud villakiust



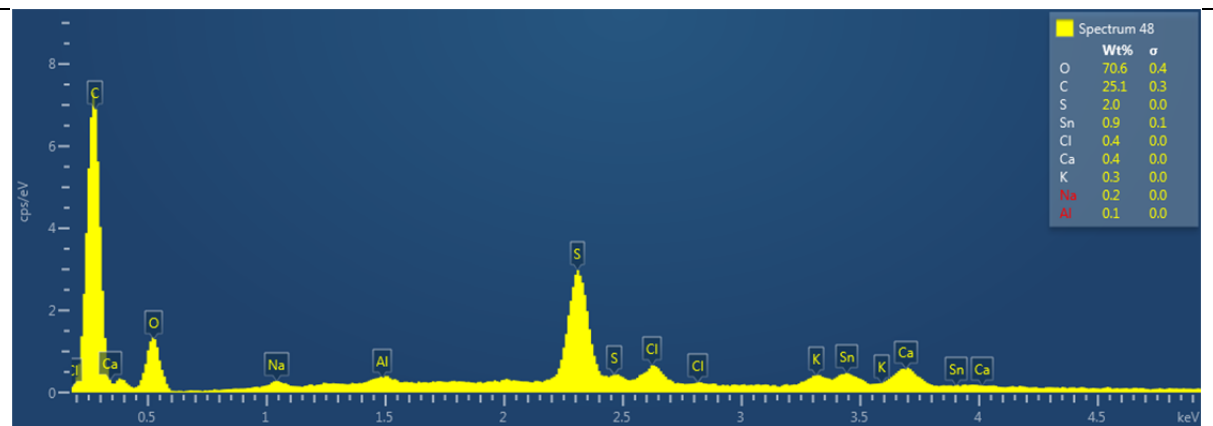
Joonis 28. SEM-EDS spekter vereva vöödikuga värvitud ja maarjajäega peitsitud villakiust



Joonis 29. SEM-EDS spekter vereva vöödikuga värvitud peitsimata villakiust



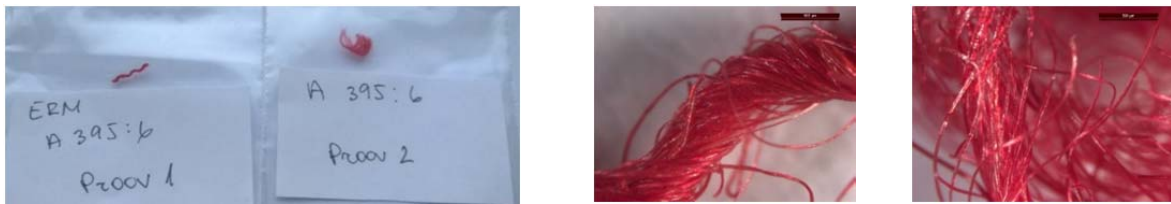
Joonis 30. SEM-EDS spekter ERM A 395:6 proov 1 villakiust



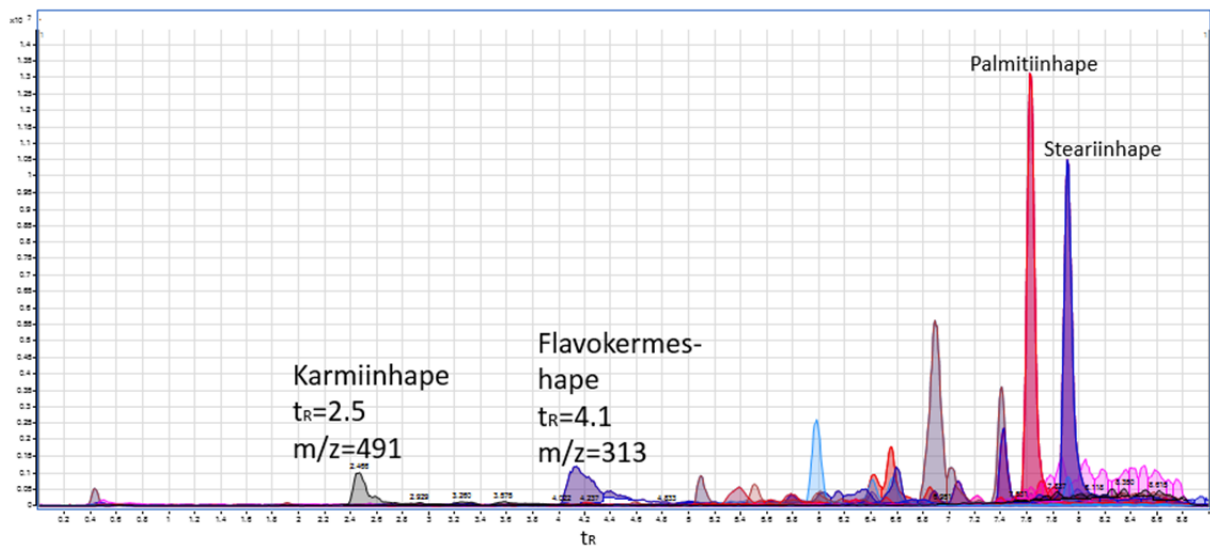
Joonis 31. SEM-EDS spekter ERM A395:6 proov 2 villakiust

LISA 7 – Meetodi rakendus reaalsele proovile „ERM A395:6 proov 2“

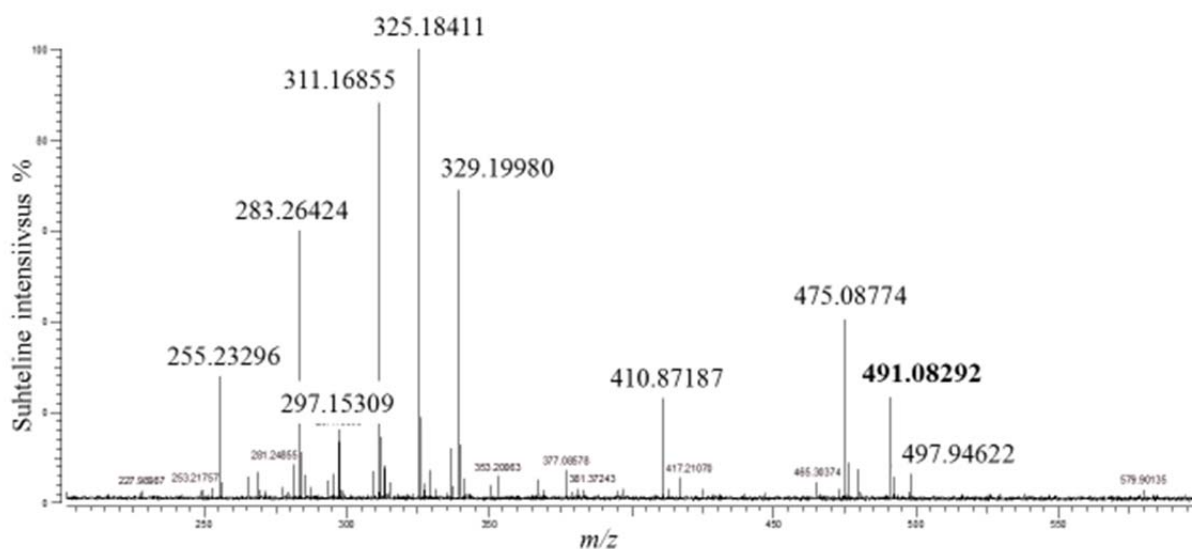
Informatsioon proovi kohta Eesti Rahva Muuseumist: Villane ja linane vaip. Autor Mari Schmidt. Vaiba mõõtmed: 156x131. ERMi vastu võetud 1934/35 a. Koetud valge lõime sisse, kohati värviliste joonte seest paistab valge linane lõim muustrina. Legend: *Kuduja on 86 aastasena kudunud selle vaiba. Värvidena kasutatud putukapunast ja madarapunast, mille juured on piirituses leotatud. Müünud 8 kr eest pr Mikk Väike-Kaar 20-1, Tartu. Proovid 1 ja 2 on võetud sama vaiba erinevatest kohtades.*



Pilt 1. ERM A395:6 proovi kiu tükid ja optilise mikroskoobi pildid kiududest



Joonis 32. ERM A395:6 proovi 2 ekstraktist HPLC-QQQ-MS-ga saadud kombineeritud kromatogramm



Joonis 33. ERM A395-6 proov 2 ESI-FT-ICR-MS massispekter

Tabel 13. ERM A395-6 proov 2 ESI-FT-ICR-MS massispektri interpreteering

Mõõdetud m/z	Anioonivalem	$\Delta m/z$ (ppm)	Toimunud protsess	Arvatav algne komponent
255.23296	$C_{16}H_{31}O_2^-$	0.02	$[C_{16}H_{32}O_2-H]^-$	Palmitiinhape
265.14769	$C_{12}H_{25}O_4S^-$	-0.82	$[C_{12}H_{25}O_4S-Na]^-$	Naatrium laurülsulfaat
269.04604	$C_{15}H_{9}O_5^-$	1.82	$[C_{16}H_{10}O_7-COO-H]^-$	Flavokermeshape
281.24855	$C_{18}H_{33}O_2^-$	-0.19	$[C_{18}H_{34}O_2-H]^-$	Oleiinhape
283.26424	$C_{18}H_{35}O_2^-$	-0.05	$[C_{18}H_{36}O_2-H]^-$	Steariinhape
297.15309	$C_{16}H_{25}O_3S^-$	0.33	$[C_{16}H_{25}O_3S-Na]^-$	Naatrium-4-detsüülbenseensulfonaat
297.24374	$C_{18}H_{33}O_3^-$	0.75	$[C_{18}H_{33}O_3-H]^-$	Ritsinoolhape
313.03562	$C_{16}H_9O_7^-$	0.78	$[C_{16}H_{10}O_7-H]^-$	FLAVOKERMESHAPE
325.18411	$C_{18}H_{29}O_3S^-$	-0.54	$[C_{18}H_{29}O_3S-Na]^-$	Naatrium-dodetsüülbenseensulfonaat
339.19980	$C_{19}H_{31}O_3S^-$	-0.41	$[C_{19}H_{31}O_3S-Na]^-$	Tridetsüülbenseenesulfonaat
491.08292	$C_{22}H_{19}O_{13}^-$	-0.40	$[C_{22}H_{20}O_{13}-H]^-$	KARMIINHAPE

INFOLEHT

Metoodika arendus tekstiilivärvide uurimiseks looduslike punaste värvainete näitel

Käesoleva töös anti ülevaade erinevatest punastest värvainetest, nende keemilisest koostisest ning kasutamisest, värvainete uurimise vajalikkusest ning selle juures esinevatest probleemidest, samuti ekstraheerimis- ja analüüsimeetoditest. Praktilise töö käigus koguti erinevaid punaste värvainete allikaid (punavärvik, košenill jne), teostati nendega värvimiskatseid ja hiljem kiududest värvaine komponentide ekstraheerimist. Erinevatel värvaine standardite värvimisetappidel saadud lahuseid ja kiududest välja ekstraheeritud värvilahuseid analüüsiti, kasutades HPLC-QQQ-MS ning ESI-ja MALDI-FT-ICR-MS meetodeid. Nende meetodite abil töötati välja ühtne metoodika tundmatust tekstiiliproovidest punase värvaine tuvastamiseks. Väljatöötatud metoodikat rakendati Eesti Rahva Muuseumist ja erakogust saadud proovidele. Antud töös väljatöötatud metoodikat on hiljem võimalik laiendada kõikide erinevate toonidega värvainete analüüsimiseks.

Märksõnad: tekstiili värvained, HPLC-MS, MALDI, ESI, FT-ICR-MS

Method development for textile dye analysis on the example of red dyes

In this Master's thesis, an overview of different red dyes, their chemical composition, usage, importance of their identification and extraction as well as possible analytical methods for their analysis is given. In the practical part of the thesis, different red dyes were collected (madder, cochineal etc) and dyeing of wool and extraction of the dyes from dyed wool was carried out. Different dye standard solutions and fibre extracts were analysed, using HPLC-QQQ-MS, ESI- and MALDI-FT-ICR-MS methods. On the basis of all instrumental methods used in this work, a unified methodology was composed for identifying unknown red dyes from textile fibres. The developed methodology was applied to real samples from Estonian National Museum and private collections. Methodology developed in this thesis, can be extended to analysis of other colours and dyes.

Keyword: textile dyes, HPLC-MS, MALDI, ESI, FT-ICR-MS

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Pilleriin Peets

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Metoodika arendus tekstiilivärvide uurimiseks looduslike punaste värvainete näitel,

mille juhendajad on Teadur Signe Vahur ja Prof Ivo Leito.

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **31.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016