

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

Eliise Tammekivi

**Õlivärvides sideaine määramine GC-MS meetodil**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad: Teadur Signe Vahur, PhD

Ott Kekišev, MSc

Tartu 2017

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
1. SISSEJUHATUS .....	4
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	5
2.1. Õlivärvid .....	5
2.2. Õlide vananemine .....	7
2.3. Analüüsimetodid õlisideainete uurimiseks .....	9
2.3.1. Gaasikromatograafia (GC) .....	9
2.3.1.1. Levinuimad derivatiseerimisreagensid.....	11
3. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	14
3.1. Analüüsitud materjalid .....	14
3.2. Kasutatud kemikaalid ja seadmed .....	14
3.3. Kvantitatiivne analüüs .....	16
3.3.1. Õli derivatiseerimismetoodikate väljatöötamine.....	16
3.3.2. Õlidele kvantitatiivse mudeli loomine .....	17
3.4. Kvalitatiivne analüüs .....	19
3.4.1. Linaseemneõli vanandamine .....	19
3.5. Realse proovi analüüs .....	20
4. TULEMUSED JA ARUTELU .....	21
4.1. Kvantitatiivne analüüs .....	21
4.1.1. Õlide kvantitatiivse mudeli väljatöötamine.....	21
4.1.2. Rapsiõli kvantitatiivne analüüs .....	22
4.1.3. Värske linaseemneõli kvantitatiivne analüüs .....	24
4.1.4. Kuivanud linaseemneõli kvantitatiivne analüüs.....	26
4.2. Linaseemneõli vananemise uurimine .....	29
4.2.1. Linaseemneõli vanandamisseeria tulemused .....	29
4.3. Derivatiseerimismetodite kokkuvõtlik võrdlus.....	32
4.4. Reaalsete proovide analüüs .....	34
5. KOKKUVÕTE .....	36
6. SUMMARY .....	37
7. KASUTATUD KIRJANDUS .....	38
8. LISAD.....	41

## KASUTATUD LÜHENDID

A/P	aselahappe ja palmithappe piikide pindalade suhe
A/Su	aselahappe ja suberhappe piikide pindalade suhe
ATR	nõrgendatud täielik sisepeegeldus
BSTFA	N,O-bis(trimetüülsilüül)trifluoroatsetamiid
DCM	diklorometaan
DLaTGS	deutereeritud L-alaniiniga töödeldud triglütüsiinsulfaat
ET	etüül-
FAEES	etüleeritud rasvhapete segu ( <i>fatty acid ethyl esters</i> )
FAME	metüleeritud rasvhapete segu ( <i>fatty acid methyl esters</i> )
FID	leek-ionisatsioon-detektor
FT	Fourier' teisendus
GC	gaasikromatograafia
HAPE	happekatalüütiline metüleerimine
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
IR	infrapunane
$m/z$	massi-laengu suhe
MS	massispektromeetriline detektor
NaOEt	naatriumetanolaat
NMR	tuumamagnetresonants-spektroskoopia ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
P/S	palmithappe ja steariinhappe piikide pindalade suhe
TMAH	tetrametüülammooniumhüdrosiid
TMS	trimetüülsilüül-
TMTFTH	<i>m</i> -(trifluorometüül)fenüültrimetüülammooniumhüdrosiid (Meth-Prep II)
$t_R$	retentsiooniaeg

# 1. SISSEJUHATUS

Enamus ajaloolisi kultuuriväärtuseid (näiteks maalid, polükroomsed objektid, ehitised, jt) sisaldavad erinevaid materjale, mille kindlakstegemine võib kunstiajaloolastele ja konservatoritele anda vajaliku informatsiooni objekti ülesehituse, päritolu, vanuse, aga ka kunstniku käekirja ning materjalikasutuse kohta.

Käesolevas töös uuritakse värvide õlisideaineid (peamiselt linaseemneõli), mille ülesandeks on siduda omavahel värvi erinevad komponendid (pigmentid, täitained). Analüüsi läbiviimiseks kasutati gaasikromatograafia (GC) meetodit koos eelneva proovi derivatiseerimisega, mis on üks levinumaid analüüsimeetodeid õlide uurimiseks nii konserveerimisteaduses kui ka arheoloogias. Õlide derivatiseerimiseks on kasutatud erinevaid derivatiseerimismetoodikaid, kuid ei ole leitud, milline on kõige sobilikum õlisideaine kvalitatiivse ja kvantitatiivse analüüsi läbiviimiseks. Siiani ei ole uuritud, kui efektiivne ehk täielik on derivatiseerimisprotsess. Selline lähenemine nõuab aga kvantitatiivset sideaine analüüsi. Kirjanduse andmetel on eelnevalt tehtud peamiselt ainult kvalitatiivset analüüsi või kasutatud poolkvantitatiivset meetodit, kus P/S ehk kahe rasvhappe (palmit- ja steariinhappe) signaalide pindalade suhte põhjal tehakse järeldus, mis õliga võib olla tegemist. P/S suhte leidmisel ei ole aga arvestatud, et erinevate rasvhapete sisalduse samaväärne suurenemine võib nende pindalaid suurendada erineval määral. Seetõttu on vaja kvantitatiivset meetodit, millega oleks võimalik täpsemalt määrata õli peamiste komponentide sisaldused ning leida selle kaudu kvantitatiivne P/S suhe. Kvantitatiivne meetod nõuab aga proovis oleva õli täielikku lahustumist, mis on üks suurimaid probleeme kuivanud õli analüüsis.

Kokkuvõtlikult olid magistritööl järgmised eesmärgid:

- Töötada välja derivatiseerimismetoodikad (TMTFTH, happekatalüütiline metüleerimine, NaOEt ja BSTFA derivatiseerimine) olemasolevale GC seadmele.
- Kolmekuuse linaseemneõli vanandamisseries hinnata GC-MS-iga derivatiseerimismetoodikate sobilikust kuivanud õli komponentide määramiseks.
- Luua kvantitatiivne mudel nii värske kui ka kuivanud õli peamiste komponentide määramiseks GC-MS/FID seadmega ja leida meetodite derivatiseerimiseefektiivsused.
- Võrrelda kasutatud derivatiseerimismetoodikaid ning leida sobivaim edaspidisteks analüüsideks.
- Rakendada väljatöötatud meetodikat reaalsete proovide sideaine analüüsis.

## 2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 2.1. Õlivärvid

Värvid on mitmesuguste komponentide segud, mis kantakse pinnale, et anda objektile värvitooni või seda kaitsta. Värvide põhilisteks koostisosadeks on pigmendid, (anorgaanilised või orgaanilised värvilised pulbrid), täiteained (inertsed valged ained) ning sideained, mida kasutatakse pulbriliste ainete sidumiseks omavahel ja pinnaga. Sideainetena on kasutatud näiteks õlisid (linaseemne-, päevalilleõli), valgulisi aineid (muna, kaseiin), süsivesikuid (kummiaraabik) ja vahasid (mesilasvaha). Alates 15. sajandist kuni tänapäevani on sideainetena kasutusel erinevad taimeõlid (linaseemne-, mooni-, pähkliõli). Käesolevas töös keskendutaksegi õli sisaldavatele värvidele ehk õlivärvidele. Kuigi neid on palju uuritud, on siiani küsimusi õli koostise, ajas muutumise ja säilivuse kohta. Orgaaniliste ühendite muundumine ja nende kindlakstegemine materjalides on konservaatoreid ja materjaliteadlasi huvitanud aastakümneid, kuna selle informatsiooni abil oleks võimalik eristada erinevaid maalimistehnikaid, leida lahendusi värvide lagunemisprotsesside aeglustamiseks, kontrollida teose originaalsust või leida parim viis kunstiväärtuse säilitamiseks. [1–3]

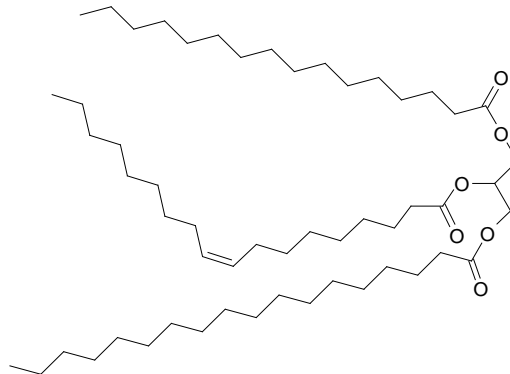
Õlivärv muutub aja jooksul õhu, valguse, temperatuuri ja teiste keskkonna mõjutuste tõttu kollakamaks, hakkab pragunema või kobrutama. Sellised muutused õlivärvis on põhjustatud keemiliste reaktsioonide poolt. Värvidele olevad orgaanilised ühendid reageerivad pigmentidega ja kokkupuutudes hapnikuga oksüdeeruvad ning polümeriseeruvad. Seetõttu tekkivad lagunemissaadused, mis teevad algse mitmekomponentse segu veelgi keerukamaks. [2,3]

Kuni 20. sajandi alguseni kasutasid kunstnikud enamasti enda valmistatud õlivärve. Pigmentid segati koos õliga ühtlaseks massiks ja vajadusel mõnikord ka kuumutati, et värvimass tuleks võimalikult homogeenne ja pinnale kergesti kantav. 19. sajandil hoiustati saadud värvi näiteks nahast tehtud kotis, loomapõies või haruldasel juhul metallist tuubides. [4] Koostiselt olid need õlivärvid lihtsamad võrreldes kaasaegsete õlivärvidega, mida hakati valmistama 19. sajandi lõpus. Suurtööstuste ja teaduse arenguga hoogustus moodsate õlivärvide tootmine 20. sajandi alguses. Traditsioonilisi õlivärve modifitseeriti, et neid oleks võimalik toota odavamalt ja suuremas koguses. Sideainetena hakati kasutama teisi õlisid (päevalille-, kastrol-, puuvillaseemneõli), millele lisati dispergente, kuivatajaid, tugevdajaid jt ühendeid, et parandada õli omadusi. Muudatused õlivärvide koostises põhjustasid uusi probleeme – näiteks on moodsad õlivärvid ebastabiilsemad, tundlikumad vee suhtes ja halvemini kuivavad kui traditsioonilised õlivärvid. Seetõttu ei saa moodsatele

õlivärvidele enamasti rakendada samu uurimismetoodikaid, mis traditsioonilistele õlivärvidele, mistõttu neid käesolevas töös ei vaadeldud. [5-7] Järgnevalt kirjeldatakse õli koostist lähemalt.

### 2.1.1. Õli koostis

Õlid koosnevad triglütseriididest, kus glütseroolester on seotud kolme rasvhappe jäägiga (Joonis 1) [6, 8]. Lisaks triglütseriididele sisaldavad õlid ka väga vähesel määral vitamiine, steroole ja teisi ühendeid, kuid need ei sega käesolevas töös õli komponentide määramist [2].



Joonis 1. Ülevõtt alates palmit-, oleiin- ja steariinhappe jääkidest koosnev triglütseriid

Linaseemne-, mooni- ja pähkliõli koosnevad samadest rasvhappe jääkidest, kuid kuna nende rasvhapete protsendiline osakaal on erinev, on ka õlide füüsikalised ja keemilised omadused erinevad. Protsentide väärtused varieeruvad lisaks ka sama liiki õli korral, sest need sõltuvad õli päritolust, eelnevast töötlemisest ja isegi tooraine korjamise aastaajast. [9] Rasvhappe jääkide erineva sisalduse abil on võimalik määrata õli tüüp teades selles olevate rasvhappe jääkide massiprotsente. Mainitud õlisid on võimalik kasutada värvimisel, sest need sisaldavad vähemalt 66% polüküllastamata rasvhappe jääke, mis õhuhapniku toimel polümeriseeruvad ja moodustavad tahke kile. Seetõttu nimetatakse neid ka kuivavateks õlideks. [6, 8]

Tabel 1. Peamiste rasvhapete sisaldus (% kõikidest rasvhapetest) triglütseriidide koostises erinevate vedelate kuivavate õlide korral [1].

Rasvhappe jääk	IUPACi nimetus	Linaseemneõli	Mooniõli	Pähkliõli
Palmitihape <b>C16:0</b>	heksadekaanhape	4-10	9-11	3-8
Steariinhape <b>C18:0</b>	oktadekaanhape	2-8	1-2	0,5-3
Oleiinhape (Z+E) <b>C18:1</b>	9-oktadetseenhape	10-24	11-18	9-30
Linoolhape <b>C18:2</b>	9Z,12Z-oktadekadienhape	12-19	69-77	57-76
Linoleenhape <b>C18:3</b>	9Z,12Z,15Z-oktadekatrieenhape	48-60	3-5	2-16

Edaspidi kasutatakse käesolevas magistritöös tabelis toodud viie rasvhappe ja nende derivaatide lühemaks nimetamiseks vormi C(süsinike arv ahelas):(kaksiksidemete arv ahelas). Kui mainitakse teist samade parameetritega rasvhapet, siis on lühendile lisatud selgitus.

On leitud, et kuivavad õlid ei koosne lihtsatest triglütseriididest nagu tripalmitiin või tristeariin, vaid iga kindel rasvhappe jääk on võimalikult paljudes triglütseriidides esindatud. Samuti on glütserooli jäägi teise süsiniku juures eelistatult küllastumata rasvhappe jääk ning ülejäänud rasvhapped on jagunenud suvaliselt glütserooli primaarsete süsinike vahel. Kõikide erinevate kompositsioonide tõttu võibki näiteks linaseemneõli koosneda 55 erinevast triglütseriidist, mis teeks õli määramise tervete triglütseriidide põhjal vägagi keerukaks. [9]

Kõige populaarsem õlivärvide sideaine on linaseemneõli. Seetõttu keskendutakse ka käesolevas magistritöös selle õli analüüsimisele. Linaseemneõli toodetakse linataime (*Linum usitatissimum*) seemnetest, mis sisaldavad massi järgi umbes 34% õli. Linaseemneõlile on iseloomulik kõrge linoleenhappe sisaldus (ligikaudu 50% kogu õli massist), mistõttu on see mainitud õlidest kõige kiiremini kuivav. Linaseemneid on kasutatud Egiptuses alates 8000 eKr linase riide valmistamiseks. Alates 15. sajandist kuni tänapäevani on linaseemneõli üks kõige levinuimad sideaineid õlimaalides, kuigi sellel on omadus muutuda kuivamisel kollakaks. [10]

## 2.2. Õlide vananemine

Õli koostise muutumist kuivamisel nimetatakse õli vananemiseks. Maalimisel kasutatakse kuivavaid õlisisid, sest nende koostises olevad triglütseriidid sisaldavad palju kaksiksidemetega rasvhappe jääke. Küllastumata rasvhapped reageerivad õhuhapnikuga, oksüdeeruvad ja moodustavad polümeerse struktuuri. Eriti kiiresti kuivab linaseemneõli, sest selles on rohkem kolme kaksiksidet sisaldavat linoleenhapet (C18:3), kui teistes õlides. Kuivamisprotsessi on jaotatud kahte suurde rühma: 1) oksüdeerumine ning 2) polümeriseerumine. Esimeste reaktsioonide korral tekivad õlis peamiselt valguse või kuumuse tõttu vabad radikaalid (Joonis 13 Lisas 1). Need reageerivad hapnikuga ja moodustub hüdroperoksiidrühm, mis on ebastabiilne ja laguneb. Seetõttu võib õhuga kokkupuutunud linaseemneõlist leida oksüdeerumisproduktidena nii epoksiide, alkohole, keto-ühendeid, dikarboksüülhappeid kui ka aldehüüde. Konkureerivates reaktsioonides põhjustavad vabad radikaalid ka rasvhapete vahelisi põiksidestumisi (tekivad uued C-C või C-O-C sidemed) ning moodustub polümeerne struktuur, mis vähendab õli lahustuvust. Kuigi linaseemneõli moodustab tahke kihi mõne päevaga, jätkub õli oksüdeerumine ja polümeriseerumine veel aastaid. [11, 12]

Kõige rohkem tekib õli kuivamisel küllastumata rasvhapetest (oleiinhape C18:1, linoolhape C18:2 ja linoleenhape C18:3)  $\alpha,\omega$ -dikarboksüülhappeid (enim esindatud suberhape 2C8:0, sebatshape 2C10:0 ja aselahape 2C9:0).  $\alpha,\omega$ -dikarboksüülhappetes ehk lühidalt dihapetes on esimese ja viimase süsiniku küljes karboksüülrühm. Dihapete tähistamiseks kasutatakse viisi, kus 2-näitab, et ühend on dikarboksüülhape-C8(süsinike arv ahelas):0(kaksiksidemete arv). Enamasti mida vanem on õli, seda rohkem on selles dihapteid, mistõttu kasutatakse näiteks aselahappe (2C9:0 dikarboksüülhape) ja palmithappe suhet (A/P) otsustamisel, kas sideainena on kasutatud kuivavat õli või muna (temperavärv). A/P väärtus kuivava õli korral on  $>1$ , kuid muna korral  $<0,3$ . [2] Vananemisel tekkivad dikarboksüülhapped annavad veel informatsiooni: näiteks iseloomustab aselahappe ja suberhappe suhe kas kuivavat õli on kuumutatud (A/Su suhe 2,8-4,5) või mitte (A/Su suhe 6-7) [13]. Kirjanduses kõige levinum suhe on palmithappe ja steariinhappe (P/S) suhte väärtus, mille abil ennustatakse sideainena kasutatud õli tüüp. Väidetavalt proovi vananemine ega pigmendid ei mõjuta nende küllastunud rasvhapete suhet. [14]

Hiljutisemate andmete järgi on P/S suhe enamasti usaldusväärne linaseemneõli korral aga mitte rakendatav kaasaegsetele õlimaalidele. Õlidele on saadud mitmeid erinevaid P/S suhte väärtuseid (näiteks leidub linaseemneõlile kirjanduses P/S väärtusi 1,4 kuni 2,4) olenevalt õli kvaliteedist, eeltötlusest ja hoiustamisest, mistõttu ei piisa poolkvantitatiivselt leitud P/S suhte väärtusest sideaine identifitseerimiseks. P/S väärtuste leidmisel on kasutatud erinevaid meetodeid, mis põhjendab väärtuste laia vahemikku veelgi. [3, 6] Tabelis 2 on toodud ühe allika P/S väärtused. Enamasti kehtib ühe allika sees kuivavate õlide P/S väärtuse seos: linaseemneõli  $<$  pähkliõli  $<$  mooniõli, kuid võrreldes erinevate allikate P/S väärtusi, on näiteks ühes allikas pähkliõli P/S = 2,8 aga teises allikas mooniõli P/S = 2,13 ehk väiksem [15]. Mõne õli koostises on aga karakteristlikud rasvhapped (näiteks rapsiõli korral 11Z-eikoseenhape ja eruuk- ehk 13Z-dokoseenhape), mis koos P/S suhtega võimaldavad tuvastada õli tüüpi. [3, 6] P/S väärtuse põhjal järelduste tegemise teeks usaldusväärsemaks poolkvantitatiivse analüüsi asemel kvantitatiivse kasutamine.

Tabel 2. Kõige laialdasemalt kasutatavate traditsiooniliste kuivavate õlide P/S suhte võimalikud väärtused ühe allika põhjal [6].

Õli	Linaseemneõli	Püsivõli	Mooniõli	Päevalilleõli	Puuvillaseemneõli	Rapsiõli
P/S	1,6 +/-0,3	1,3 +/-0,4	3,9 +/-1	3,3 +/-0,2	9,5 +/-0,5	3,7 +/-0,3

Püsiv õli (inglise keeles *stand oil*) saadakse linaseemneõli kuumutamisel üle 270 °C hapnikuvabas keskkonnas. Kõrgemal temperatuuril küllastumata rasvhapped polümeriseeruvad ja triglütseriidid liituvad kokku. Saadud õli on viskoosem kui algne linaseemneõli ning kuivab kiiremini, mistõttu eelistatakse seda mõnikord maalimises. Tabelist 2 on näha, et püsiva linaseemneõli P/S keskmine väärtus on väiksem, kui kuumutamata linaseemneõlil, millest saab järeldada, et erineval määral kuumutatud õlil võib olla erinev P/S väärtus. [16]

### **2.3. Analüüsimeetodid õlisideainete uurimiseks**

Ajalooliste objektide analüüsimiseks on enamasti vaja meetodeid, mis võimaldavad analüüdi tuvastamist keeruka koostisega ja vananenud proovidest [9]. Lisaks eelistatakse mittedestruktiivseid meetodeid või analüüse, mis vajavad väga väikest proovi kogust, et võimalikult vähe kahjustada väärtuslikku objekti. Tänu analüütiliste meetodite arengule on tänapäeval võimalik uurida isegi keerulise koostisega väiksekoguselisi proove. [8] Analüüsimiseks kasutatakse peamiselt kas spektromeetrilisi, kromatograafilisi (ehk eraldusmeetodeid) või massispektromeetrilisi meetodeid. Infrapunaspetskoopia ja Raman spektroskoopia on mittedestruktiivsed analüüsimeetodid, mis võimaldavad eristada erinevaid sideaine tüüpe (näiteks õli proteiinist), kuid mitte sarnase ehitusega rasvhappe jääke. [13] Tuumamagnetresonants-spektroskoopiaga (NMR) oleks võimalik kindlaks määrata rasvhappe täpne valem, kuid selle jaoks oleks vaja eraldada segust puhas rasvhape [13].

Kuna õlivärvi proovid on erinevate ühendite segud, siis eelistatakse enamasti kromatograafilisi meetodeid, et eraldada ning seejärel vajadusel tuvastada ühendid [9]. Sama ainerühma molekule on võimalik eristada isegi keerukatest segudest kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (HPLC) või gaasikromatograafia-massispektrometria (GC-MS) abil. Meetodid on destruktiivsed, kuid GC-MS analüüsiks on vajalik väike proovi kogus (1 µg kuni 1 mg) ning meetod on kõrge selektiivsuse ja tundlikusega. [13, 17]

#### **2.3.1. Gaasikromatograafia (GC)**

Gaasikromatograafia on efektiivne eraldusmeetod, mida kasutatakse nii gaaside, vedelike kui ka tahkete ainete (lahustatakse mõnes lenduvad solvendis) analüüsimiseks. Proov aurustatakse ja kantakse kandegaasi (mobiilne faas) abil läbi kolonni (statsionaarne faas). Proovis olevad komponendid eralduvad lenduvuse ja faasidevahelise jaotumise järgi. Niisiis on retentsiooniaeg seda väiksem, mida lenduvama ja statsionaarse faasiga halvemini seostuv on ühend. [18]

Umbes 10-20% orgaanilistest ühenditest sobivad gaasikromatograafiliseks analüüsiks, ülejäänud ei ole kas termiliselt stabiilsed või küllalt lenduvad. Seetõttu on tihti vajalik analüüdi derivatiseerimine. [13] Kuigi GC uuringud on enamasti pika proovi ettevalmistuse ja analüüsi ajaga, on see hea viis orgaaniliste ühendite eraldamiseks ja määramiseks keerukates segudes. Lisaks on võimalik kvalitatiivse analüüsi järel läbi viia ka poolkvantitatiivset või kvantitatiivset analüüsi. [2] Nii värsked kui ka vananenud õlid on segud mitmetest orgaanilistest ühenditest. Seetõttu on sobiv GC-MS seade, mille abil on võimalik komponendid eraldada ning seejärel massispektri interpreteerimisel tuvastada. [3] 1960. aastatest alates on olisideaine määramiseks kasutatud meetodeid, kus algul viiakse prooviga läbi keemiline eeltöötlus ning seejärel tehakse gaasikromatograafiline analüüs [19].

GC detektoritena kasutatakse enamasti FID ehk leek-ionisatsioon- või MS ehk massispektromeetrilist detektorit. MS detektori korral pommitatakse ionisatsioonikambris kolonnist väljunud gaaside segu elektronide vooga, mistõttu analüüt kaotab elektrone ja muutub positiivse laenguga iooniks. Enamasti on selline molekulaarioon ebastabiilne ning laguneb ühendile iseloomulikeks fragmentideks. Kõik positiivsed ioonid juhitakse kambrist välja ning eraldatakse massianalüsaatoris massi järgi. Detekteeritakse ühendile iseloomulik massispekter, kus on fragmendid massi/laengu suhte ning intensiivsuse järgi. [9]

FID-i korral seguneb kolonnist väljuv gaaside segu vesinikuga, see süüdatakse õhu keskkonnas ning seejärel mõõdetakse pinget elektrodide vahel, mis on teine teisel pool leeki. Puhta vesiniku leegi juhtivus on väga madal, kuid orgaaniliste ühendite sattumisel kolonnist leeki tekivad ioonid, mis suurendavad leegi juhtivust ehk voolutugevust suureneb. Niisiis on FID-ga saadud kromatogrammil piigi pindala proportsioonis leegis olnud orgaanilise ühendi kogusega, mistõttu eelistatakse seda detektorit tihti kvantitatiivses analüüsis. GC-FID korral võib aga olla problemaatiline kromatogrammide interpreteerimine, kui ei tea täpselt ühendite retentsiooniaegasid. Seepärast on leitud, et tasub ühendada GC-MS ja GC-FID analüüs rasvhapete õigesti tuvastamiseks ja kvantitatiivseks tundmatute proovide korral. [9, 20]

Kvantitatiivselt on võimalik leida komponentide sisaldused proovis sisestandardi meetodiga. Siiani on olisideaine rasvhapete sisalduste leidmiseks kasutatud enamasti nõ poolkvantitatiivseid meetodeid, kus näiteks uuritakse P/S suhet [6]. Kvantitatiivsemat analüüsi on tehtud kasutades sisestandardit, kus teatakse selle kontsentratsiooni analüüsitava proovis ning seejärel leitakse selle abil rasvhappe kontsentratsioon [6, 21]. Vaja oleks aga kasutada sisestandardi meetodit koos kalibreerimisgraafikuga (peatükk 3.3.2.), sest kuigi sisestandardina kasutatakse analüütidele sarnaseid ühendeid, ei põhjusta sisestandardi ja

analüüdi võrdne sisalduse suurenemine proovis alati samaväärset signaali suurenemist. On kasutatud ka meetodit, kus valmistatakse analüütidest ja sisestandardist kindla kontsentratsiooniga standardlahused, viiakse läbi derivatiseerimised ja mõõtmistulemustest arvutatakse välja tundlikkusfaktorid. Teades sisestandardi kontsentratsiooni tundmatu protsendilise koostisega proovis, saab leida tundlikkusfaktorit kasutades kõikide vastavate rasvhapete sisaldused, millele on standardlahusega mõõtmised tehtud. Selle meetodi korral peab aga igal analüüsipäeval derivatiseerima ja mõõtma ka standardlahused. Metoodikas kasutati vabu rasvhappeid standardlahustes, kuid tegelikus õlis on rasvhapped seotud triglütseriidi koostisesse. [6] Samuti ei ole võimalik leida erinevate meetodite derivatiseerimiseefektiivsust, sest tundlikkusfaktori sisse arvatakse see, kui palju analüüti jäi derivatiseerimata. Lisaks kehtivad leitud tundlikkusfaktorid ka ainult konkreetsele meetodile.

### **2.3.1.1. Levinuimad derivatiseerimisreagendid**

Kirjandusest on leida mitmeid erinevaid reagente ja metoodikaid õlide derivatiseerimiseks, et komponendid oleksid gaasikromatograafia analüüsitavad. Derivatiseerimismetoodikate valik on suures plaanis olnud juhuslik ning omavahel võrreldud on neid vähe. Enamasti on tehtud kvalitatiivset või poolkvantitatiivset analüüsi (P/S suhe), mistõttu ei ole keskendutud derivatiseerimisprotsessi täielikkuse uurimisele. Eelnevates derivatiseerimisreagentide võrdlustes on rasvhapete sisalduste ja näiteks P/S suhte leidmiseks kasutatud kromatogrammilt saadud piike ehk on tehtud lihtsusust, et palmihappe ja steariinhappe samaväärne sisalduse muutus mõjutab kromatogrammi piiki sama palju. Lisaks ei ole leitud, kas reagendid derivatiseerivad kogu õli ehk kui efektiivsed on derivatiseerimisreagendid. Samuti ei ole aja möödudes analüüsitud erinevate derivatiseerimisreagentidega õlis olevate komponentide sisalduste muutust. [21, 22] Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda kolme derivatiseerimisreagenti nendest aspektidest.

GC analüüsile eelnev derivatiseerimine on vajalik muutmaks makromolekulaarsed triglütseriidid lenduvaks väikese molekulmassiga ühenditeks. Üheks meetodiks on pürolüüs GC-MS, kus hapnikuvaeses keskkonnas lagundatakse kuumuse toimele makromolekulid väiksemateks fragmentideks, mida seejärel analüüsitakse. Kuna polaarsed ühendid ei ole sellise meetodi korral detekteeritavad, teostatakse triglütseriidide korral ka derivatiseerimine. Seetõttu on sideainete määramise korral õigem öelda termokemolüüs GC-MS. [13] Teiseks on märg derivatiseerimine, kus esimeses etapis toimub rasvhapete eraldamine hüdrolyüüsi teel triglütseriidist. Teises etapis muudetakse karboksüülhappele või alkoholile vastavad fragmendid vähem polaarseteks ja lenduvamateks estriteks või eetriteks. [3, 17]

Triglütseriidide derivatiseerimine koosneb suures plaanis järgmistest etappidest – esimesena hüdrolyüsitakse või seebistatakse triglütseriidid, tekkinud vabad rasvhapped enamasti metüleeritakse või etüleeritakse ning seejärel ekstraheeritakse välja. Vanemad derivatiseerimismeetodid on aeganõudvad ja mitmeetapilised (erinevate reagentide lisamised, mitmed ekstraheerimised, lahuste ülekandmised ja aurustamised). [23] Kvantitatiivses analüüsis või väikeste proovi koguste korral on eriti vajalik leida derivatiseerimismeetod, kus oleks võimalikult vähe etappe ning proovi ülekandmisi.

Käesolevas töös vaadeldakse kolme derivatiseerimismeetodit, mida alljärgnevalt kirjeldatakse veidi pikemalt.

#### Naatriumetanolaat ja BSTFA reagentidega derivatiseerimine

Üheks variandiks oli naatriumetanolaadi ja N,O-bis-(trimetüülsilüül)trifluorootsetamiidiga (BSTFA, struktuurivalem Lisas 1) kahe-etapiline derivatiseerimine, mis on õlisideainete uurimises laialt levinud. Esimeses etapis toimub esterrühma transetüleerimine naatriumetanolaadiga, mille tulemusena saadakse etüleeritud rasvhapped. Teiseks etapiks on alkoholide ja vabade rasvhapete trimetüülsilüülimine. Uurides toimuvaid reaktsioone (Lisa 1) on näha, et selle derivatiseerimisega on võimalik eraldiseisvana määrata nii triglütseriidi seotud rasvhapped kui ka vabad rasvhapped, sest seotud rasvhapped saavad etüleeritud ning vabad rasvhapped trimetüülsilüülitud. Vabu rasvhappeid leidub õlis vähe, enamasti 0,3-4 % kõikidest rasvhapetest ja on leitud, et nende protsendiline koostis on sarnane seotud rasvhapete koostisega. [6, 19]

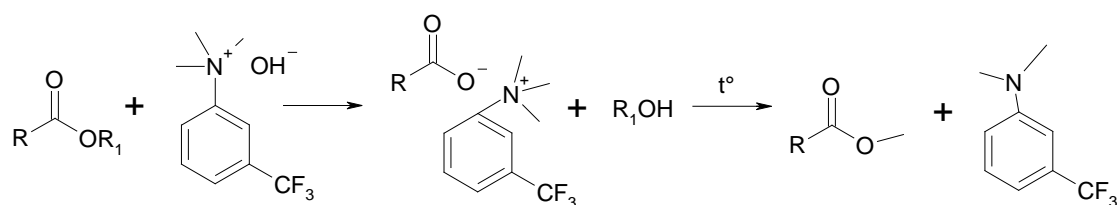
#### TMTFTH reagentiga derivatiseerimismeetod

Üha enam eelistatakse õlimaalide sideainetes olevate triglütseriidide derivatiseerimiseks kasutada kvaternaarseid N-metüülammooniumsoolasid, millest käesolevas töös uuriti *m*-(trifluorometüül)fenüültrimetüülammooniumhüdrosiidi (TMTFTH, toote nimega Meth-Prep II, struktuurivalem Lisas 1). See uudne reagent õlivärvide analüüsis suudab efektiivselt metüleerida triglütseriidideks seotud rasvhappe jääke ning derivatiseerimine ei vaja keerukat proovi eeltöötlust ega ekstraheerimise etappe. [24]

Lisaks on õlisideainete uurimisel laialt levinud reagentiks ka TMAH ehk tetrametüülammooniumhüdrosiid, mis on samuti N-metüülammooniumsool. Metüleerimisreaktsioon TMAH reagentiga on toodud Joonisel 14 Lisas 1. Kui derivatiseerimisel TMTFTH reagentiga saab kasutada mõõdukaid temperatuure (220-300 °C), siis TMAH korral on vaja proovi kuumutada vähemalt 360 °C juures või kõrgematel

temperatuuridel, mistõttu kasutatakse tihti pürolüüsi. Meetod on kiire ja vajab minimaalset proovi kogust. Derivatiseerimisel TMAH reagentiga on aga leitud, et peamiselt kõrge temperatuuri tõttu toimuvad ka soovimatud kõrvalreaktsioonid nagu polüküllastumata rasvhapete isomerisatsioon ja liigne metüleerimine, mida TMTFTH reagentiga on vähem märgatud. [25, 24]

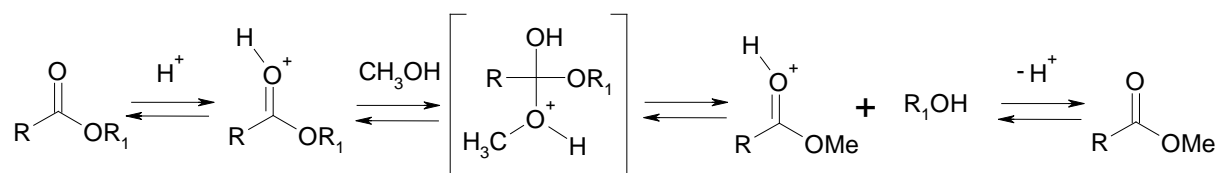
Reaktsioon TMTFTH reagentiga toimub metüleerimine madalamatel temperatuuridel ning ei vaja pürolüüs-gaasikromatograafia süsteemi [14]. Reaktsiooniskeem on toodud Joonisel 2. Esimeses etapis toimub triglütseriidi reaktsioon derivatiseerimisreagentiga ning moodustub ammooniumi sool, mis teises etapis laguneb GC sisendi kõrge temperatuuri tõttu vastava rasvhappe metüülestriks ja *m*-(trifluorometüül)-*N,N*-dimetüülaniliiniks. [6]



Joonis 2. Seotud rasvhappe reaktsioon TMTFTH (Meth-Prep II) reagentiga [6].

### Happekatalüütiline metüleerimine

Lisaks viimastel aastatel keemikute ja konservatorite seas laialt levinud meetoditele otsustati kasutada rasvhapete derivatiseerimiseks ka happekatalüütilist metüleerimist, mis on levinud õlide derivatiseerimisviisi arheoloogias. Meetod otsustati võtta kasutusele õlivärvide sideaine analüüsimiseks, sest nagu arheoloogias on ka käesoleva töö eesmärgiks kasutada derivatiseerimist sellistel objektidel, mille analüüsiks võetavad proovid on väiksed ning vananenud. Happekatalüütiline metüleerimine on uurimisalla võetud derivatiseerimistest kõige pikem ning keerukam, kus proovile lisatakse metanool ja kontsentreeritud väävelhape ning kuumutatakse 4h 70 °C juures. Toimuva reaktsiooni skeem on toodud Joonisel 3. Seejärel ekstraheeritakse derivatiseeritud rasvhapped heksaaniga, vajadusel kontsentreeritakse proovi aurustamise teel ning analüüsitakse GC-MS-iga. [26] Happekatalüütiline metüleerimine ei ole siiani levinud derivatiseerimismeetod õlisideaine analüüsis.



Joonis 3. Seotud rasvhappe happekatalüütiline metüleerimine [27].

### 3. EKSPERIMENTAALNE OSA

#### 3.1. Analüüsitud materjalid

Värske õli analüüsiks kasutati selitatud linaseemneõli (Lefranc & Bourgeois). Selitatud linaseemneõli tootmisel hoitakse linaseemnetest välja pressitud õli päikse käes ehk selitatakse. Toodet kasutatakse maalimisel enamasti tumedamate värvide koostises, sest ajajooksul linaseemneõli kolletub. [28] Vananenud õli analüüsimetoodika väljatöötamiseks kasutati sama tootja selitatud linaseemneõli, mis oli Petri tassil kuivanud peaaegu 16 kuud. Petri tassi oli hoitud toatemperatuuril ja pimedas. Ajaga oli peaaegu värvitu ning vedel linaseemneõli moodustanud kollase tahke kile.

Kvantitatiivse mudeli väljatöötamisel kasutati Olivia rapsiõli.

Väljatöötatud meetodikaid rakendati reaalselt objektidelt võetud värviproovidele. Analüüsitud proovid olid järgmised:

- Tundmatu kunstniku maalilit (20. saj) võetud tumeroheline värviproov.
- Karja Katariina kiriku krutsifiksilt (15. saj) võetud valge värviproov (ülemaaling).

#### 3.2. Kasutatud kemikaalid ja seadmed

Alljärgnevas tabelites on toodud analüüsis kasutatud kemikaalid. FAME ja FAEES on ainete segud – Tabelis 3 on toodud ühendite puhtuste vahemikud nendes segudes (lähemalt alapeatükis 3.3.2.). Lisaks kasutati happekatalüütilises metüleerimises ka Supelco klaasvilla.

Tabel 3. Analüüsis kasutatud kemikaalid

Reagent	Firma	Sisaldus	Reagent	Firma	Sisaldus
BSTFA	Sigma-Aldrich	≥ 99,8%	NaOEt	Sigma-Aldrich	21% metanoolis
TMTFTH	Alfa Aesar	5% metanoolis	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	VWR Chemicals	98%
Tripalmitiin	Sigma-Aldrich	≥ 99%	Trioleiin	Sigma-Aldrich	≥ 99%
Heksadekaan	Sigma-Aldrich	≥ 99%	NH <sub>4</sub> Cl	Reakhim	99,5%
FAME	Supelco	99,8-99,9%	FAEES	Supelco	99,0-99,9%
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Reakhim	99,5%			

Tabel 4. Kasutatud lahendid ja nende parameetrid

Solvent	Firma	Puhtus	Keemistemperatuur (°C) [29]	Tihedus (g/cm <sup>3</sup> ) [29]
DCM	Sigma-Aldrich	≥ 99,8%	39,6	1,3266
Etanool	Premium	96,7%	78,2	0,7893
Tolueen	Reakhim	99,5%	110,6	0,8669
Metanool	Sigma-Aldrich	≥ 99,9%	64,96	0,7914
Heksaan	Sigma-Aldrich	≥ 99%	68,7	0,6548

Prooviettevalmistuse jaoks kasutati viiekohalist analüütilist kaalu (*GENIUS Sartorius*), termostateeritud kokkuaurutit (*Pierce, USA*), kus gaasiks oli lämmastik, ja kuivatusahju (*Memmert*).

Proovi kromatograafiliseks ja massispektromeetriliseks analüüsiks oli kasutusel Agilent Technologies 7890A gaasikromatograaf ja detektoriks Agilent Technologies kvadрупool massispektromeeter 5975C. Sobivaks kolonniks leiti Agilent DB-225MS kapillaarkolonn, mis on tootja ehk Agilent Technologies sõnul mõeldud lahutamaks *cis*- ja *trans*-rasvhapete metüülestreid [30]. DB-225MS on 30 m pikkune ja 0,25 mm diameetriga keskmise polaarsusega kolonn, mille statsionaarse kihi paksuseks on 0,25 µm ja mis on käitumiselt sarnane (50% - tsüanopropüülfenüül) – metüülpolüsiloksaaniga. Kolonni sobilikuks temperatuurivahemikuks on 40-240 °C. Selle kolonniga on võimalik eraldada huviall olevad küllastumata rasvhapped (C18:1, C18:2, C18:3), kuid mitte C18:1 rasvhappe *cis*- ja *trans*-vorme. Nende isomeeride eraldamist oleks võimalik teha polaarsema või pikema kolonniga. Käesolevas töös aga ei olnud vaja neid vorme teineteisest eralda, sest kirjandusest leiti, et õli oleiinhappe (C18:1) sisaldus antakse kahe vormi summeeritud väärtusena [1, 6, 12]. Seetõttu jätkati analüüse olemasoleva Agilent DB-225MS kolonniga. Algselt testiti ka Agilent DB-5MS UI kolonni (30 m pikk, 0,25 mm diameetriga, statsionaarse kihi paksus 0,25 µm, sobilik temperatuurivahemik -60 kuni 350 °C, käitumiselt sarnane (5% - difenüül) – dimetüülpolüsiloksaaniga), mis oli liiga vähepolaarne ning ei eraldanud C18:1, C18:2 ja C18:3 derivatiseeritud rasvhappeid.

Testimiste tulemusena osutus sobivaimaks järgmine temperatuuriprogramm: 2 minutit 80 °C juures, 10 °C/min tõus 200 °C-ni, kus hoiab temperatuuri 4 minutit ja seejärel 5 °C/min tõus 220 °C-ni, kus hoiab seda temperatuuri 5 minutit ning 10 °C/min tõus 230 °C-ni. Sisendi temperatuur oli 300 °C ning mõõtmisajaks 28 minutit. Kandegaasiks oli heelium 6.0, kolonni gaasivoolukiiruseks 3 ml/min ja süstitav ruumala 1 µl. FID analüüsil kasutati vesiniku generaatorit (*Linde Gas*). Saadud kromatogramme analüüsiti programmis Agilent MSD ChemStation ja massispektreid andmebaasis NIST MS Search 2.0. Kvantitatiivse analüüsi jaoks kasutati GC detektorina nii MS kui ka FID detektorit. Kvalitatiivses analüüsis tehti mõõtmised GC-MS seadmega.

ATR-FT-IR spektroskoopilised analüüsid viidi läbi teemantkristalliga ATR-mikroanalüsaatoril (*Smart Orbit*), mis on paigaldatud Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR spektromeetile (optiliseks materjaliks CsI, Vectra Aluminum interferomeeter, DLaTGS detektor). ATR-FT-IR spektrid registreeriti läbilaskvuse skaalas, mõõtepiirkonnaks valiti

4000-225  $\text{cm}^{-1}$ , lahutusvõimega 4  $\text{cm}^{-1}$  ja skanneeringute arv oli 64. FT-IR spektromeetrit juhiti ja spektreid töödeldi Thermo Electron's OMNIC 9 programmis.

### 3.3. Kvantitatiivne analüüs

Sideaine kvantitatiivse analüüsi mudel sooviti luua linaseemneõlile, sest see on maalikunstis kõige levinum õlisideaine. Kuna kirjanduses on leida rasvhapete sisaldused värskele õlile, siis otsustati alguses luua meetod sellele ning hiljem modifitseerida kuivanud õli analüüsimiseks. Järgnevalt on kirjeldatud väljatöötatud derivatiseerimismetoodikaid.

#### 3.3.1. Õli derivatiseerimismetoodikate väljatöötamine

Kirjanduse põhjal leiti, et BSTFA koos naatriumetanolaadiga (edaspidi lühendatult BSTFA) on üks levinuim kasutuses olev reagent õlisideaine analüüsis, kuid samas kiidetakse viimastel aastatel populaarset TMTFTH ehk Meth-Prep II reagenti. Käesolevas magistritöös otsustati neid derivatiseerimisreagente omavahel võrrelda, et saada teada nende eelised ja puudused. Lisaks otsustati kaasata võrdlusesse happekatalüütiline metüleerimine (edaspidi lühendatult HAPE), sest see on arheoloogide seas väga levinud ja võrreldes teiste meetoditega odav rasvhapete derivatiseerimisviis. Samuti ei ole kirjanduse põhjal seda derivatiseerimist eelnevalt kasutatud õlivärvi sideaine analüüsimiseks. Meetodite esialgsed eeskirjad võeti kirjandusest [14, 19, 31] ning modifitseeriti. Eeskirjades viidi tahke proov otse derivatiseerimisse, aga täpsuse parandamiseks otsustati käesolevas töös lahustada analüüsiv proov toluenis ehk teha nõ emalahus (lähtelahus) kontsentratsiooniga 1,6 g/l, millest võeti osa analüüsiks. Teised muudatused olid spetsiifilisemad ning on toodud järgnevate derivatiseerimiseeskirjade all.

a) TMTFTH ehk Meth-Prep II. Derivatiseerimismeetodi loomisel tugineti Manzano et al [14] eeskirjale. Viaali võeti 0,45 ml emalahust ja lisati 0,05 ml TMTFTH 5% lahust metanoolis. Reaktsioonisegu hoiti 30 minutit ultraheli vannis. Pärast ultraheliga töötlemist hoiti reaktsioonisegu 24 h toatemperatuuril [24], sest kasutades algset eeskirja [14] ei olnud derivatiseerimine täielik. Viimaks lisati reaktsioonisegule 1,5 ml solventi, viidi üle kromatograafia viaali ning analüüsiti GC-MS või GC-FID seadmega.

b) Happekatalüütiline metüleerimine (HAPE). Derivatiseerimismeetodi loomisel tugineti Graig et al [31] eeskirjale. 0,25 ml õli emalahust aurutati termostateeritud kokkuauriti abil solvendist vabaks, lisati 1 ml metanooli ja töödeldi ultraheliga 15 minutit. Seejärel lisati ettevaatlikult 0,2 ml kontsentreeritud väävelhapet ning kuumutati 4 tundi 70 °C juures. Pärast

proovide jahtumist lisati 0,2 ml heksaani ning lahust segati vibratsioonsegistil (*vortex*), et ekstraheerida välja metüleeritud rasvhapped. Klaaspipetiga eraldati ettevaatlikult heksaani kiht, mis seejärel juhtiti läbi klaasvilla ja kaaliumkarbonaadiga täidetud klaaspipeti, et neutraliseerida väävelhappe jäägid. Ekstraheerimist korrati veel kaks korda. Ekstraktid koguti, aurutati kokku ning lahustati uuesti 1 ml heksaanis ning viidi kromatograafia viaali analüüsimiseks.

c) BSTFA ja naatriumetanolaat (BSTFA). Derivatiseerimismeetodi loomisel tugineti van den Berg et al [19] eeskirjale. Kahe-etapilise prooviettevalmistuse esimeses etapis lisati 0,06 ml naatriumetanolaadi lahust (kontsentratsioon 0,01 M) kromatograafi viaalis olevale 0,45 ml emalahusele. Viaalist juhiti läbi lämmastik, sulgeti tugevalt metallkorgiga ning pandi kuivatusahju 70 °C juurde 1,5 tunniks. Seejärel lisati jahtunud proovidele 0,06 ml küllastunud NH<sub>4</sub>Cl lahust etanoolis. 20 minuti pärast aurustati lahustid termostateeritud kokkuaurutiga ära ning jääk lahustati uuesti 0,2 ml heksaanis. Teises etapis lisati lahusele 0,015 ml BSTFA-d, viaal sulgeti metallkorgiga ja pandi kuivatusahju 70 °C juurde 30 minutiks. Pärast proovi jahtumist kanti lahus üle suuremasse viaali, kuhu lahjenduste tegemiseks mahuks vähemalt 2 ml lahustit. Proovi ülekandmisel loputati kromatograafia viaali kolm korda 0,5 ml heksaani kogustega, et proovi kadu oleks minimaalne. Viimaks lahustid aurustati ning produktid lahustati uuesti 2 ml DCM-s. Proov viidi üle kromatograafia viaali analüüsimiseks.

### **3.3.2. Õlidele kvantitatiivse mudeli loomine**

Õlisideaine kvantitatiivse analüüsi läbiviimiseks kasutati sisestandardi meetodit. Sisestandardiks valitakse analüüdile sarnane ühend, mida ei leidu uuritavas proovis. Sisestandardit lisatakse analüüsitavatesse proovidesse ja kalibreerimislahustesse nii, et selle kontsentratsioon lõpplahuses oleks teada. Saadud analüüdi signaali võrreldakse sisestandardi signaaliga ning leitakse analüüdi sisaldus proovis. Sisestandardi meetodi abil vähenevad maatriksefektid ning masina stabiilsusest ja lahuste valmistamisest tulenevad mõõtemääramatused. [33]

Alljärgnevalt on välja toodud kvantitatiivse analüüsi etapid. Täpsema tulemuse saamiseks kaaluti analüütilisel kaalul kõik proovi- ja kalibreerimislahuste komponendid ning masside kaudu arvutati välja lahuste kontsentratsioonid.

1. Kalibreerimislahused. TMTFTH ja HAPE meetodite kalibreerimislahuste valmistamiseks kasutati viie metüleeritud rasvhappe (palmit-, steariin-, oleiin-, linool- ja linoleenhappe) teadaoleva sisaldusega FAME segu. BSTFA derivatiseerimise korral saadakse aga etüleeritud

või trimetüüsilüülitud rasvhapped. Seetõttu tuli kasutada teisi kalibreerimislahuseid, mis koosnevad metüleeritud rasvhapete asemel etüleeritud rasvhapetest - FAEES segu. Selles segus on värske linaseemneõli viiest rasvhapest sees kaks (etüleeritud palmit- ja steariinhape). Leiti, et kahe rasvhappe sisalduse analüüsis piisas BSTFA derivatiseerimise iseloomustamiseks. Nii FAME kui ka FAEES segudest valmistati 7 erineva kontsentratsiooniga lahust. Katsete vältel valmistati kõiki kalibreerimislahuseid kolm korda (ühe lahuse ruumala 2 ml), et etappi ei oleks vaja korrata iga analüüsipäev. Saadud lahuseid hoiustati sügavkülmas. Kalibreerimislahuste analüüsimiseks GC-MS-iga või GC-FID-iga sisestati lahused kromatograafia viaalis olevasse 150 µl koonusviaalidesse, et vähendada kalibreerimislahuste kulu.

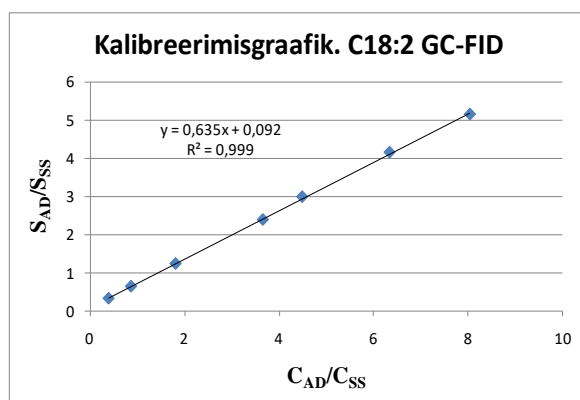
2. Lisaproovid. Derivatiseerimiseefektiivsuse leidmiseks ja GC süsteemi puhtuse ning korrasolu kontrollimiseks valmistati tripalmitiini ja trioleiini (struktuurivalemid Lisas 1) täpse kontsentratsiooniga kontrollproov toluenis (edaspidi nn triõlide segu). Nende triglütseriidide valimisel arvestati, et oleks esindatud nii küllastunud (palmithape C16:0), kui ka küllastumata (oleiinhape C18:1) rasvhape. Lisaks kontrollproovile kasutati ka puhast solventi kontrollimiseks, et analüüsitavaid ühendeid ei tule prooviettevalmistuse käigus kasutatavatest vahenditest juurde. Olenevalt derivatiseerimismeetodist oli puhtaks solvendiks kas heksaan (HAPE) või DCM ja tolueni segu (TMTFTH, BSTFA). Kontrollproovi ja puhta solvendiga viidi igal analüüsipäeval läbi samad derivatiseerimised ja analüüsid, mis õliproovidega.

3. GC-MS/FID analüüs. Enne analüüsi läbiviimist lisati puhtale solvendile ja kalibreerimis-, kontroll- ning proovilahustele sisestandardi (heksadekaani) emalahust toluenis (kontsentratsiooniga 0,5 g/l). Sisestandardi emalahuse kontsentratsioon leiti katsetamiste teel – eesmärgiks oli saada lahus, mille korral heksadekaani signaal jääb samasse suurusjärku, kui kõige suurema ja kõige madalama kontsentratsiooniga kalibreerimislahuse signaalid.

Saadud lahused kanti üle kromatograafia viaalidesse ning mõõtmised tehti järjestikuse (*sequence*) meetodiga. Nii GC-MS kui ka GC-FID meetodiga viidi lahuste analüüs läbi juhuslikus järjekorras (näiteks kalibreerimislahus 3, õliproov 2, kalibreerimislahus 6, puhas solvent, jne). Mõõtes juhuslikus järjekorras on võimalik vähendada süstemaatilist viga.

4. Tulemuste interpreteerimine. Pärast lahuste GC-MS või GC-FID analüüsi saadi kromatogrammilt sisestandardi ( $S_{SS}$ ) ja derivatiseeritud analüüdi ( $S_{AD}$ ) signaalide pindalad. Kalibreerimisgraafiku koostamiseks kasutati x-teljel sisestandardi ja derivatiseeritud analüüdi kontsentratsioonide suhet  $C_{AD}/C_{SS}$  ja y-teljel signaalide pindalade suhet  $S_{AD}/S_{SS}$  (Joonis 4).

Seejärel oli võimalik leida proovis oleva derivatiseeritud analüüdi kontsentratsioon, sest signaalide pindalad saab kromatogrammi andmetest ja lisatud sisestandardi kontsentratsiooni saab arvutada. Igale rasvhappele saadakse oma kalibreerimisgraafik, mille abil on võimalik leida vastava derivatiseeritud rasvhappe täpne kontsentratsioon proovis. Teades derivatiseeritud vormi sisaldust saab välja arvutada derivatiseerimata rasvhappe sisalduse moolides või massi järgi kõikide leitud rasvhapete summeeritud sisalduse suhtes.



Joonis 4. Kalibreerimisgraafiku näide. FAME kalibreerimislahustes määratud linoolhappe C18:2 sisaldus GC-FID meetodiga.

### 3.4. Kvalitatiivne analüüs

Kvalitatiivse analüüsi eesmärgiks oli uurida, kuidas muutuvad linaseemneõlis rasvhapete sisaldused selle vananedes. Lisaks sooviti GC-MS-iga analüüsida, mis muutused toimuvad õliga vananemisel (laguproduktide tekkimine, struktuurilised muutused, polümeriseerumine jne). Leiti, et parim viis sellise analüüsi läbiviimiseks oleks seeria, kus aja möödudes võetakse kuivama pandud linaseemneõlist proov, mida derivatiseeritakse ja analüüsitakse. Samuti kasutati taaskord erinevaid derivatiseerimismeetodeid (TMTFTH, HAPE ja BSTFA), et hinnata, milline on kõige sobilikum õli komponentide identifitseerimiseks.

#### 3.4.1. Linaseemneõli vanandamine

Seeria (edaspidi vanandamisserie) jaoks pandi linaseemneõli võrdses koguses ja kihipaksuses kahele Petri tassile kuivama, ühte hoiti toatemperatuuril eemal otsese valguse käest ning teist kuivatusahjus 70 °C juures. Analüüsitavaid proove oli kokku neli: toatemperatuuril ja kuivatusahjus seisnud linaseemneõli, puhas solvent ehk tühiproov ning triõlide kontrollproov. Lõpuks saadi kolme derivatiseerimisreagentiga iga mõõtmispäev 12 lahust, mille komponente analüüsiti GC-MS seadmega. Vanandamisserie derivatiseerimisi ja mõõtmisi teostati 18 korda kolme kuu jooksul. Teades, et suurimad muudatused õli koostises

toimuvad esimestel nädalatel, tehti vanandamiseeria alguses rohkem katsepäevi, mida hiljem vähendati. Vanandamiseerias otsustati teha ainult GC-MS-iga mõõtmised (mitte GC-FID-iga), sest oluline ei olnud teada saada rasvhapete täpsed kontsentratsioonid, vaid nende sisalduste muutused proovis. Samuti on MS detektori eeliseks FID-i ees see, et on võimalik identifitseerida proovis olevad ühendid. See on eriti oluline vananeva õli puhul, kuhu tekivad õli kuivamise käigus juurde laguproduktid.

### **3.5. Reaalse proovi analüüs**

Väljatöötatud derivatiseerimismetoodikatest sobivaimaid (TMTFTH ja happekatalüütiline metüleerimine) rakendati kahe erineva objekti sideaine analüüsimiseks. Alustuseks analüüsiti värvide proove ATR-FT-IR spektroskoopilisel meetodil, et määrata kindlaks sideaine tüüp (õli, süsivesik, proteiin) proovis. Kui selgus, et tegemist võis olla estri-tüüpi ainega (oletatavasti õlivärviga), jätkati analüüsi loodud GC-MS ja GC-FID meetoditega. Prooviettevalmistus viidi läbi kvantitatiivse analüüsi derivatiseerimismetoodikatega, mis olid välja töötatud peaaegu 16 kuud Petri tassil kuivanud linaseemneõlile. Teades, et reaalses proovis on lisaks sideainele ka pigmendid ja täiteained, vähendati solventi või solventide segu koguseid derivatiseerimisjärgsete lahjenduste tegemisel. Tulemuste interpreteerimine viidi lõpuni, kui analüüdi ja sisestandardi piigi signaalide suhe jäi vastava derivatiseeritud rasvhappe kalibreerimisgraafiku alasse.

## 4. TULEMUSED JA ARUTELU

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli teostada põhjalik õlisideainete kvalitatiivne ja kvantitatiivne analüüs GC-MS ja/või GC-FID meetodile ning leida kõige sobivam meetodika (seal hulgas ka derivatiseerimisreagent) analüüsi teostamiseks. Kuna kultuuriväärtused on vanad objektid, siis on ajajooksul nende keemilise koostisega toimunud erinevaid muutuseid. Seega antud töö raames uuriti nii värsket õli, selle muutumist aja jooksul kui ka vananenud õli. Antud juhul oli peamiseks analüüsitavaks õliks linaseemneõli, sest see on kunstis üks enimkasutatavaid õlisideaineid.

Alljärgnevalt on koondatud analüüsides saadud tulemused. Magistritöö koosnes järgmistest etappidest: derivatiseerimismetoodikate väljatöötamine ja vastavalt proovile nende modifitseerimine, seejärel derivatiseeritud proovide analüüsimine GC-MS või GC-FID meetoditega, saadud kromatogrammide ning massispektrite interpreteerimine ja arvutuste tegemine. Alustuseks töötati välja õlisideaine koostiskomponentide tuvastamise kvantitatiivne mudel. Järgmisena teostati põhjalik vanandamisseeria, kus hinnati erinevate derivatiseerimismeetodite sobilikkust ning linaseemneõli komponentide sisalduste muutumist ajas. Viimasena rakendati kõige sobilikumat derivatiseerimismetoodikat vananenud objektidelt võetud värviproovidele.

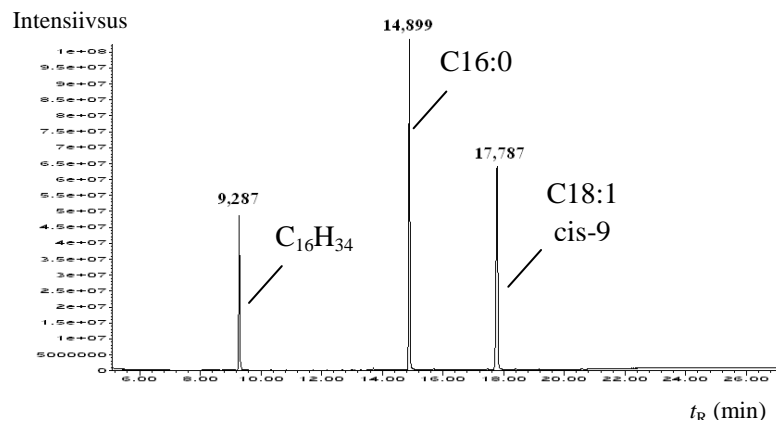
### 4.1. Kvantitatiivne analüüs

Analüüsi eesmärgiks oli luua kvantitatiivne mudel kõige efektiivsema derivatiseerimismetoodikaga, et oleks võimalik määrata peamiste rasvhapete sisaldused nii värskes kui ka vananenud linaseemneõlis. Järgnevalt kirjeldatakse kvantitatiivse analüüsi mudeli väljatöötamist ja saadud tulemusi.

#### 4.1.1. Õlide kvantitatiivse mudeli väljatöötamine

Enne õli kvantitatiivse mudeli loomist alustati eksperimente FAME ja FAEES kalibreerimis-, kontroll- ja sisestandardilahuste kontsentratsioonide leidmisest. Eesmärgiks oli saada sellised kontsentratsioonid, et analüüdi signaal eristuks taustamürast, kuid samas ei küllastaks MS detektorit üle („lõigatud piigid“). Lisas 3 on näitena toodud kaks interpreteeritud kromatogrammi, mis on saadud FAME ja FAEES kalibreerimislahuste mõõtmisel. Joonisel 5 on toodud TMTFTH derivatiseeritud kontrollproovi kromatogramm (teiste derivatiseerimismeetoditega saadud kromatogrammide on Lisas 4). Kõikide meetoditega saadi kromatogrammide, mille rasvhapete piigid vastasid metüleeritud, etüleeritud või

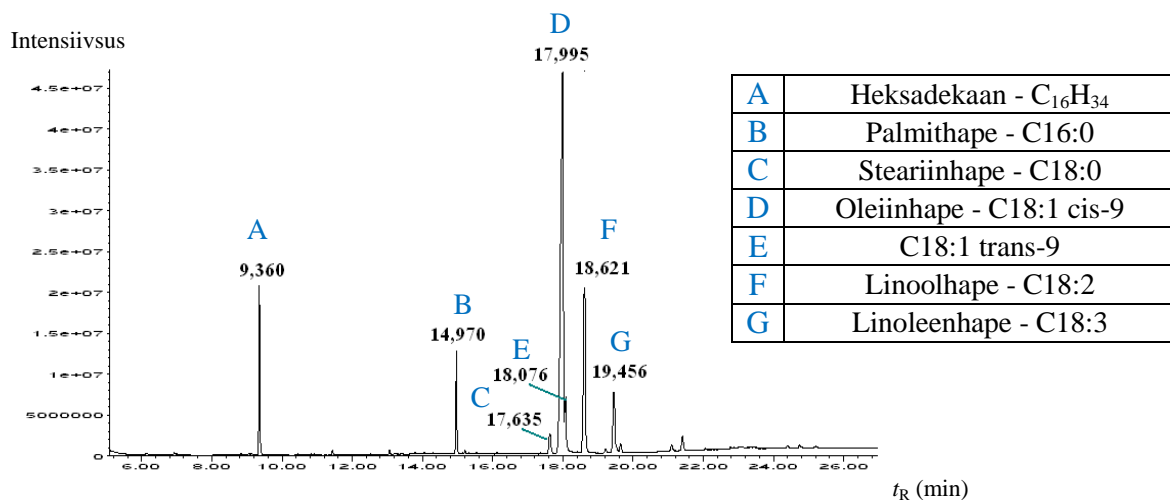
trimetüülsilüülitud vormidele. Kui mainitud lahuste kromatogrammidel olid piigid sobivate intensiivsustega, siis mindi edasi õliproovide analüüsimise juurde. Õlide uurimist alustati vedela õli kvantitatiivsest analüüsist.



Joonis 5. TMTFTH derivatiseeritud triõlide ning sisestandardi ( $C_{16}H_{34}$ ) lahuse kromatogramm. Retentsiooniaegadele vastavad lühendid on toodud derivatiseerimata vormi kohta.

#### 4.1.2. Rapsiõli kvantitatiivne analüüs

Õlisideaine kvantitatiivse mudeli väljatöötamist alustati linaseemneõli asemel rapsiõlist. Rapsiõli rasvhappeline koostis ei ole nii varieeruv kui linaseemneõlil ja on olemas võrreldavaid kirjandusandmeid õli kvantitatiivse koostise kohta. Seetõttu valiti rapsiõli mudeli loomiseks, kuigi seda ei kasutata õlivärvide valmistamisel. Rapsiõli GC-MS/FID kvantitatiivne analüüs (kvantitatiivse analüüsi kirjeldus alapeatükis 3.3.2.) viidi läbi TMTFTH, HAPE ja BSTFA derivatiseerimismeetoditega. Joonisel 6 on toodud TMTFTH derivatiseeritud rapsiõli kromatogramm. Teiste derivatiseerimistega saadi sarnased kromatogrammid, mis on toodud Lisas 4.



Joonis 6. TMTFTH derivatiseeritud rapsiõli kromatogramm ja retentsiooniaegadele vastavate ühendid.  $C_{18}:1$  trans-9 on oleiinhappe isomeer 9E-oktadetseenhape.

Sisestandardi meetodil leiti viie derivatiseeritud rasvhappe (palmit-, steariin-, oleiin-, linool- ja linoleenhape) sisaldused proovi lahuses. Rapsiõli analüüsi korrati viis korda, kuni analüütide väärtused jäid kalibreerimisgraafikute alasse. Tabelis 5 on toodud väljatöötatud rapsiõli kvantitatiivse analüüsi viimased tulemused erinevate derivatiseerimisreagentide ja detektoritega. Rasvhapete sisaldused arutati ringi millimoolidesse, et derivatiseerimisreagente oleks võimalik omavahel võrrelda. BSTFA analüüsil identifitseeriti rapsiõli proovis ka derivatiseeritud küllastumata rasvhapped, kuid kvantitatiivselt nende sisaldust ei leitud, sest FAEES kalibreerimislahustes olid ainult etüleeritud palmit- ja steariinhape. Tabelist 5 on näha, et küllastunud rasvhapete (C16:0 ja C18:0) määramises on meetodid olnud ligikaudu võrdväärsed. Erinevus tuleb sisse derivatiseeritud küllastumata (C18:1, C18:2 ja C18:3) rasvhapete määramisel, kus TMTFTH korral saadi suuremad sisaldused kui HAPE derivatiseerimisel.

Tabel 5. Rapsiõli kvantitatiivne analüüs. Rasvhappe sisaldus **mmol**/100 g rapsiõli kohta.

Proov	Rasvhape	BSTFA GC-MS	BSTFA GC-FID	HAPE GC-MS	HAPE GC-FID	TMTFTH GC-MS	TMTFTH GC-FID
Rapsiõli	C16:0	11	11	7	10	11	15
	C18:0	2	4	2	3	4	5
	C18:1	-	-	113	102	165	185
	C18:2	-	-	39	32	64	72
	C18:3	-	-	16	18	40	38

Et tulemusi oleks võimalik võrrelda ka kirjanduses antud rapsiõli rasvhappelise koostisega, leiti rasvhappe osakaal massi järgi kõigi määratud viie rasvhappe summast (Tabel 6). Kuna BSTFA puhul oli võimalik määrata viiest rasvhapest kaks, siis ei ole selle meetodiga saadud tulemused võrreldavad kirjandusandmetega. Selline väljendusviis on kirjanduses tavaline, kuid ei anna informatsiooni, kui efektiivne on olnud derivatiseerimisprotsess.

Tabel 6. Rapsiõli kvantitatiivne analüüs. Rasvhappe sisaldus **g**/100 g kõikide kvantitatiivselt määratud rasvhapete suhtes.

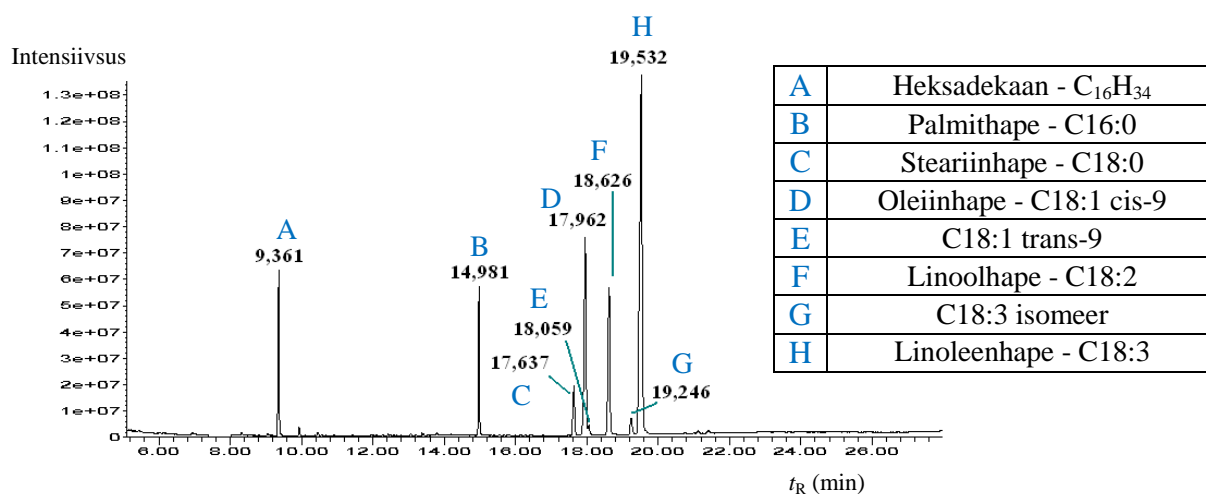
Proov	Rasvhape	HAPE GC-MS	HAPE GC-FID	TMTFTH GC-MS	TMTFTH GC-FID	Kirjandus [34]
Rapsiõli	C16:0	3,8	5,5	3,5	4,3	4,5
	C18:0	0,9	1,9	1,5	1,6	2,2
	C18:1	64,4	62,3	58,1	59,0	64,1
	C18:2	22,1	19,4	22,4	22,6	19,8
	C18:3	8,8	10,9	14,5	12,5	9,5

Tabelist 6 on näha, et nii HAPE kui ka TMTFTH derivatiseerimiste tulemused on võrreldavad kirjanduse väärtustega. Analüüsides MS ja FID detektoriga saadud tulemusi, on saadud lähemad väärtused enamasti FID-iga. Kuid et kindlalt väita, et FID on parem detektor õli analüüsis, oli vaja teha veel kordusanalüüse. Rapsiõli analüüs näitas, et loodud kvantitatiivne arvutusmudel sobib õli analüüsiks, mistõttu otsustati edasi minna linaseemneõli koostise ja

derivatiseerimisefektiivsuste leidmisega, et kindlaks teha, milline derivatiseerimismeetod on sobivaim õlivärvi sideaine kvantitatiivses analüüsis.

#### 4.1.3. Värske linaseemneõli kvantitatiivne analüüs

Järgmisena analüüsiti värsket selitatud linaseemneõli. Proovide ettevalmistused ja analüüs viidi läbi rapsiõliga väljatöötatud kvantitatiivse mudeliga. Joonisel 7 on toodud TMTFTH meetodiga saadud derivatiseeritud värske linaseemneõli kromatogramm (teised kromatogrammide Lisas 4). Väljatöötatud derivatiseerimismetoodikatega tehti linaseemneõli rasvhappelise koostise määramisel iga suuruse leidmiseks kolm korduskatset (keskmistatud tulemused Tabelis 7 ja 8). Lisas 5 on toodud kõikide korduskatsete tulemused.



Joonis 7. TMTFTH derivatiseeritud värske linaseemneõli kromatogramm ja retentsiooniaegadele vastavad rasvhapped. Piik märkega C18:3 isomeer on linoleenhape isomeer.

Värskele linaseemneõlile leiti sarnaselt rapsiõli kvantitatiivse analüüsiga (alapeatükk 4.1.2.) rasvhapete keskmistatud sisaldused mmol/100 g õli kohta (Tabel 7) kui ka vastava rasvhappe kogus 100 g kõikide määratud rasvhapete suhtes (Tabel 8). Tabel 7 näitab, et linaseemneõlis saadi kõige suuremad rasvhapete sisaldused TMTFTH derivatiseerimisega. BSTFA ja HAPE meetodid olid GC-MS analüüsi korral samaväärsed. Meetoditele arvutati ka kvantitatiivsed P/S ehk palmit- ja steariinhappe suhted. Kirjandusest leiti, et linaseemneõli korral on poolkvantitatiivselt leitud P/S suhted jäänud vahemikku 1,6 +/- 0,3 [6]. Ka käesolevas töös jäid kõigi meetodite korral P/S suhe värske linaseemneõli analüüsis mainitud vahemikku (täpsemalt 1,57 kuni 1,81). Võrreldes detektorite tulemusi on näha, et BSTFA ja TMTFTH puhul saadi suuremad tulemused GC-FID meetodil.

Tabel 7. Värske linaseemneõli kvantitatiivsed tulemused. Rasvhappe sisaldus **mmol**/100 g õli kohta ja P/S väärtused (ühikuta)

Proov	Rasvhape	BSTFA GC-MS	BSTFA GC-FID	HAPE GC-MS	HAPE GC-FID	TMTFTH GC-MS	TMTFTH GC-FID
Värske Linaseemne- õli	C16:0	15,1	15,3	15,4	14,4	18,3	18,2
	C18:0	9,0	9,5	8,5	8,6	10,1	10,9
	C18:1	-	-	52,0	51,6	56,2	57,8
	C18:2	-	-	46,9	46,1	55,4	55,9
	C18:3	-	-	190,3	189,9	229	260,6
	P/S	1,67	1,62	1,81	1,69	1,81	1,66

Linaseemneõli korral on tulemuste võrdlemine kirjanduslikega komplitseeritum. Olenevalt linaseemneõli päritolust ja töötlemisest varieeruvad linaseemneõlis rasvhapete sisaldused rohkem kui rapsiõlis, mistõttu saame kvantitatiivse analüüsi tulemusi võrrelda rasvhapete sisalduste vahemikega ja kinnitada korduskatsetega. Võrdlus kirjanduse andmetega on toodud Tabelis 8. Saadud rasvhapete sisalduste väärtused jäid HAPE ja TMTFTH derivatiseerimiste korral kirjanduslike andmete vahemikku, välja arvatud linoleenhappe ehk C18:3 vähene erinevus. Nagu eelnevalt mainitud, siis ei pruugi kõrvalekalle olla põhjustatud meetodika ebasobilikkusest, vaid võib olla põhjustatud kasutatud linaseemneõli sordist. Lisaks ei ole kirjanduses toodud rasvhappe sisaldused leitud kvantitatiivsel meetodil ja kasutades ühte kindlat derivatiseerimismetoodikat, mis võib põhjustada taaskord rasvhapete protsendilise sisalduse varieeruvuse.

Tabel 8. Värske linaseemneõli kvantitatiivsed tulemused. Rasvhappe sisaldus **g**/100 g kõikide määratud rasvhapete suhtes.

Proov	Rasvhapped	GC-MS HAPE	GC-FID HAPE	GC-MS TMTFTH	GC-FID TMTFTH	Kirjandus [6]
Värske linaseemne- õli	C16:0	4,5	4,4	4,6	4,2	4-10
	C18:0	2,8	2,8	2,8	2,8	2-8
	C18:1	16,9	17,0	15,5	14,6	10-24
	C18:2	15,1	14,9	15,1	14,0	12-19
	C18:3	60,7	60,9	62,1	64,6	48-60

Värske linaseemneõli analüüsis saadi suurimad rasvhappe sisaldused TMTFTH derivatiseerimismetoodiga (Tabel 7). Et välja selgitada, kas saadud tulemus on tõene või mingil põhjusel kõrgendatud, otsustati leida kasutatud derivatiseerimismetoodikate efektiivsused. Selleks viidi läbi triõlide derivatiseerimine, et näha, mitu protsenti proovis olnud seotud rasvhapetest sai määratud vastava meetodikaga. Derivatiseerimiseefektiivsused on toodud Tabelis 9. Tulemustest on näha, et HAPE ja BSTFA derivatiseerimistega oli derivatiseerimiseefektiivsus madalam kui TMTFTH korral. BSTFA derivatiseerimise korral on üheks tõenäoliseks põhjuseks see, et lisaks etüleeritud vormile tekivad vabade rasvhapete derivatiseerimisel ka C16:0 ja C18:0 rasvhapetele vastavad trimetüülsilüülitud derivaadid

(Joonis 12 Lisas 1). Kvalitatiivselt vaadeldes oli näha, et neid oli väga vähesel määral proovis, ning nende sisaldust ei olnud võimalik määrata, sest neid ei leitud FAEEs segus.

Tabel 9. Derivatiseerimiseefektiivsused (triölide proov). Derivatiseerimisel saadud rasvhappe sisaldus proovis olnud tegelikust rasvhappe sisaldusest (%).

Proov	Rasvhapped	GC-MS BSTFA	GC-FID BSTFA	GC-MS HAPE	GC-FID HAPE	GC-MS TMTFTH	GC-FID TMTFTH
Triölide segu	C16:0	69,8	71,3	82,2	83,8	99,4	99,7
	C18:1	-	-	60,2	60,5	82,2	87,1

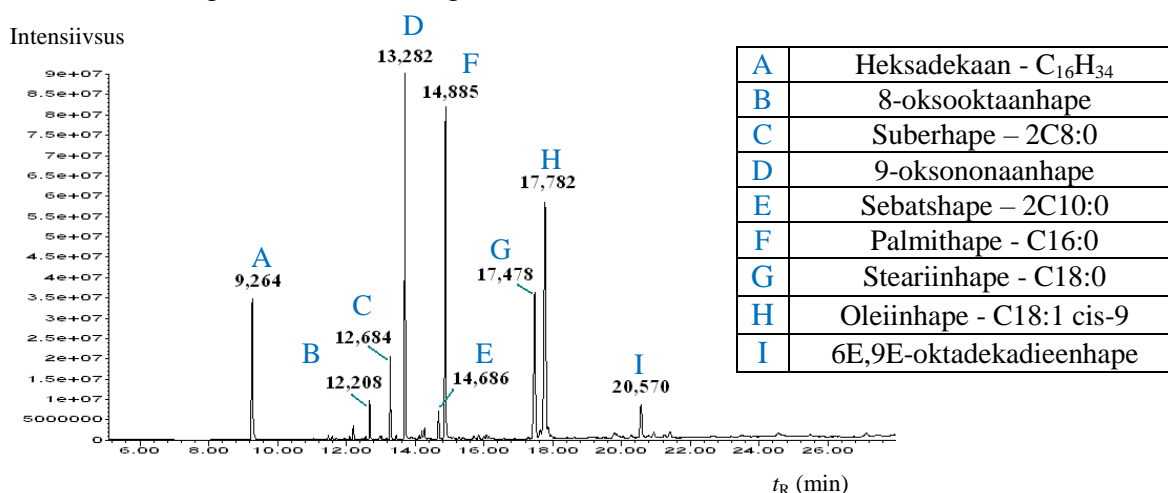
Happekatalüütilise metüleerimise madalam efektiivsus võib olla põhjustatud sellest, et osa analüüti läheb pikas ja mitme-etapilises prooviettevalmistusest kaduma. Lisaks leiti kirjandusest, et arvatavasti ei ole metüleerimine töös kasutatud madala temperatuuri (70 °C) juures täielik. Kõrgemate temperatuuride korral on aga soodustatud linoolhappe *cis*- vormist *trans*-i tekkimine, mis mõjutaks linoolhappe sisaldust proovis. [27] Kõige suurem derivatiseerimiseefektiivsus oli TMTFTH reagentil, kuid ka selle korral erineb derivatiseerimiseefektiivsus – C16:0 ehk palmihappe korral on efektiivsus peaaegu 100%, kuid C18:1 ehk oleiinhappe korral madalam. Võrreldes MS ja FID detektoreid on kõrgemad efektiivsused saadud GC-FID analüüsidel, mistõttu võiks värske õli kvantitatiivse analüüsi läbiviimisel eelistada FID detektoriga saadud signaale.

#### 4.1.4. Kuivanud linaseemneõli kvantitatiivne analüüs

Järgmiseks uuriti Petri tassil peaaegu 16 kuud vananenud linaseemneõli. Kuivanud linaseemneõli kvantitatiivset analüüsi sooviti läbi viia samamoodi, nagu seda tehti värske linaseemneõliga (vt peatükk 4.1.3.), kuid vananenud õlil ilmnisid lahustuvuse probleemid. Värske vedel linaseemneõli lahustub mitmetes solventides (tolueen, DCM, atsetoon), kuid leiti, et kuivanud õli ei lahustu nii hästi tolueenis, millega tehti värske õli emalahused.

Seetõttu testiti esmalt erinevaid lahusteid (DCM, benseen, metanool, tolueen, etanool, kloroform, lakibensiin ehk *white spirit*, tärpentin, isopropanool, etüülatsetaat ja atsetoon) ning nende segusid. Kõige rohkem lahustus kuivanud linaseemneõli DCM ja tolueeni (1:1 vahekorras) segus. Et välja selgitada, millises olekus kuivanud prooviga on võimalik teha kvantitatiivset analüüsi, derivatiseerida nii osaliselt lahustunud kui ka tahke õli. Analüüsides HAPE-ga tulemusi saadi, et derivatiseerides osaliselt lahustunud kuiva õli lahust saadi C16:0 sisalduseks 0,4 g 100 g rasvhapete kohta, kuid tahke proovi korral 1,9 g 100 g rasvhapete kohta. Kuna analüüsitav proov oli peaaegu aasta ja viis kuud vana, siis saab järeldada, et polümeriseerumine on olnud nii ulatuslik, et suur osa proovi ei lahustu. Seetõttu otsustati edaspidi kasutada kuivanud linaseemneõli kvantitatiivses analüüsis otse tahket proovi.

Kvantitatiivses analüüsis tahke proovi kasutamine nõuab kõigepealt selle kaalumist. Viiekohalisel kaalul on soovitatav minimaalne kaalutav kogus 10 mg. Seetõttu modifitseeriti derivatiseerimiste eeskirju, sest eelnevalt lahuse kujul oli derivatiseeritava õli kogus vahemikus 0,3-0,8 mg. Suurendati kasutatud reagentide ja solventide koguseid ning muudeti kontsentratsioone. Seetõttu oli viimases etapis vaja teha ka lisalahjendusi. BSTFA derivatiseerimises tehti veel üks lisa muudatus: pärast kuivanud õli kaalumist ja lahustite lisamist pandi reaktsioonisegu ultraheli vanni 30 minutiks, nagu TMTFTH ja HAPE derivatiseerimistes. Kogu vananenud proov saadi „lahustatud” kõigi kolme derivatiseerimismetoodikaga - kuivanud linaseemneõli solventides ei lahustunud aga lahustused selle derivatiseerimisproduktid. Seetõttu oli oluline, et reagente oleks piisavalt, et kogu proov saaks derivatiseeritud. Lisaks leiti, et BSTFA ja TMTFTH korral oli vajalik tolueni ja DCM segu lisamine, mis soodustas produktide lahustumist. Joonisel 8 on toodud vananenud linaseemneõli kromatogramm, mille korral derivatiseerimismeetodiks oli HAPE (teiste meetoditega saadud kromatogrammid olid sarnased, mistõttu toodud Lisas 4).



Joonis 8. Happedakatalüütiliselt metüleeritud (HAPE) peaaegu 16 kuud kuivanud linaseemneõli kromatogramm ja retentsiooniaegadele vastavad rasvhapped (tabelis derivatiseerimata vorm).

Võrreldes vananenud linaseemneõli (Joonis 8) kromatogrammi värske linaseemneõli omaga (Joonis 7) on näha, et proovis on komponente juurde tulnud, kui ka kadunud. Kirjandusest on teada, et õli kuivamine toimub küllastumata rasvhappe jääkide polümeeriseerumisel ja oksüdeerumisel, mistõttu on põhjendatud, miks kromatogrammil ei ole enam C18:2 ehk linoolhappe ja C18:3 ehk linoleenhappe piike. Lisaks on juurde tulnud laguproduktid, milleks on peamiselt dikarboksüülhapped (suberhape 2C8:0, aselahape 2C9:0, sebatshape 2C10:0) ja aldehüüdid. Lisas 2 on toodud kõikide identifitseeritud ühendite massispektrid ja derivatiseeritud variandi struktuurivalemid. Laguprodukte analüüsiti täpsemalt kvalitatiivses vanandamisseerias (peatükk 4.2.).

Tabelis 10 on toodud kuivanud linaseemneõli kvantitatiivse analüüsi kolme korduskatse keskmistatud tulemused. Korduskatsetes kasutatud peaaegu 16 kuud kuivanud linaseemneõli pandi enne kvantitatiivse analüüsi tegemist lämmastiku keskkonda ja sügavkülma, et takistada õli edasist vananemist. Kirjanduse võrdlusandmeid ei ole toodud, sest käesolevas töös tehtud täiskvantitatiivne sideaine analüüs on uudne meie töögrupis väljatöötatud meetodika ja puuduvad võrdlevad andmed. Samuti ei ole analüüsitud samades tingimustes ja sama kaua kuivanud linaseemneõli. Proovidest C18:2 ja C18:3 rasvhappeid ei leitud, millest saab järeldada, et õli ei ole värske. Kuna oleiinhappe ehk C18:1 sisaldus on üpris suur, siis saab väita, et tegemist ei ole väga vana prooviga (võrreldes reaalseste proovidega, mille kvantitatiivne analüüs on toodud peatükis 4.4.). Kvantitatiivne P/S suhte väärtus on taaskord vahemikus 1,6 +/- 0,3 [6] ning väärtuse varieeruvus on väike.

Tabel 10. Kuivanud linaseemneõli kvantitatiivsed analüüsi tulemused. Rasvhappe sisaldus **mmol**/100 g proovi kohta ja P/S väärtus (ühikuta). Number „0” tähendab, et kvalitatiivselt ei olnud piik kromatogrammil määratav.

Proov	Rasvhape	BSTFA GC-MS	BSTFA GC-FID	HAPE GC-MS	HAPE GC-FID	TMTFTH GC-MS	TMTFTH GC-FID
Kuivanud linaseemne- õli	C16:0	10,3	11	16,3	15,9	15,7	15,1
	C18:0	5,6	5,9	8,5	8,7	8,4	8,3
	C18:1	-	-	14,4	14,1	17,4	17,4
	C18:2	0	0	0	0	0	0
	C18:3	0	0	0	0	0	0
	P/S	1,82	1,87	1,91	1,82	1,89	1,81

Suurimad rasvhapete sisaldused saadi TMTFTH derivatiseerimisega. Kuna selle meetodi derivatiseerimiseefektiivsus on kõige parem, siis on see eelistatuim meetod õlis rasvhapete määramiseks. Kuigi HAPE ja BSTFA olid samaväärsed rapsiõli ja värske linaseemneõli analüüsis, on kuivanud õli korral märgata erinevust – BSTFA-ga saadi madalamad sisaldused kui HAPE derivatiseerimisel. Tõenäoliselt põhjenduseks lisaks madalale derivatiseerimiseefektiivsusele võib olla lahustuvuse vähenemine õli kuivamisel. BSTFA prooviettevalmistuses võis osa õli jääda lahustumata, kuigi pärast derivatiseerimisreaktsiooni toimumist tundus proovilahust vaadeldes, et derivatiseerimisproduktid on lahustunud. Võrreldes MS ja FID detektori tulemusi leiti, et vananenud õlisideaine analüüsis ei ole märgata ühe eelist teise ees. Üleüldiseks kvantitatiivse analüüsi puudujäägiks on proovi suurus (vähemalt 10 mg), mis on vajalik, et analüüsi määramatus ei oleks liialt suur. Seetõttu on aga suur reagenti ning proovi kulu, mis on eriti probleemiks kultuuriväärtuste korral. Kvantitatiivse analüüsi tulemusena oli näha, et värske ja kuivanud linaseemneõli erinevad

lisaks füüsikalistele omadustele suuresti ka rasvhappelise koostise osas. Seetõttu otsustati läbi viia ka kvalitatiivne analüüs, et uurida täpsemalt õlisideaine koostise muutumist ajas.

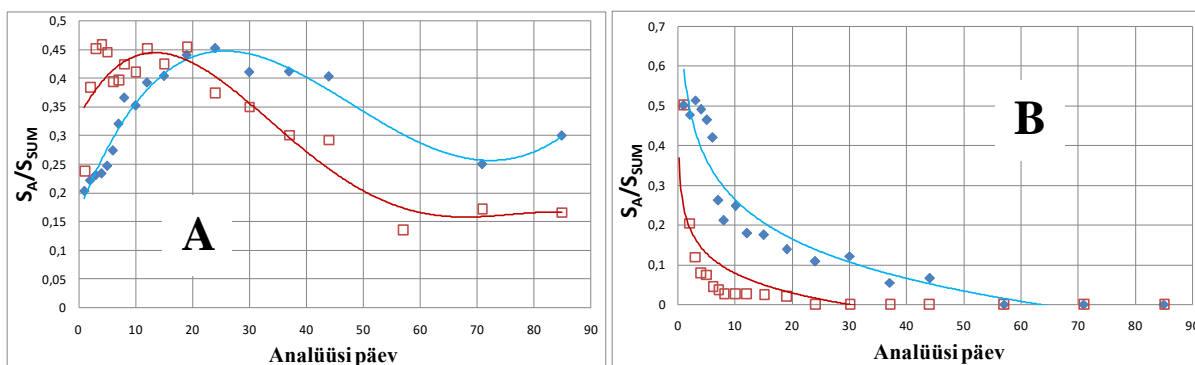
## **4.2. Linaseemneõli vananemise uurimine**

Linaseemneõli kvalitatiivses analüüsis sooviti uurida, kui kiiresti vähenevad rasvhapete sisaldused proovis ja millised produktid tekivad nende lagunemisel. Lisaks analüüsiti, millist mõju avaldab kuumutamine õlile ja kas GC-MS-iga on võimalik tuvastada erinevaid laguprodukte. Neile küsimustele vastuse saamiseks viidi läbi linaseemneõli vanandamisseeria. Uuringus kasutati kolme derivatiseerimisreagenti, et võrrelda nende sobilikkust kvalitatiivse analüüsi teostamisel.

### **4.2.1. Linaseemneõli vanandamisseeria tulemused**

Kirjanduse põhjal on teada, et õli keemilise koostisega toimuvad kõige suuremad muutused kuivamise esimese nädala jooksul. Linaseemneõli proove visuaalselt vaadeldes oli näha, et paari päeva möödudes hakkas 70 °C juures kuumutatud õli moodustama kuivanud kihi ja teisel eksperimendi nädalal oli märgata selle kolletumist. Toatemperatuuril seisnud linaseemneõli moodustas kuivanud kihi viiendal eksperimendi nädalal ja kolletumine esines alles kahe kuu möödudes. Muutust oli näha ka õli kromatogrammidele, mille piikidele vastavad ühendid identifitseeriti massispektrite abil (massispektrid toodud Lisas 2). Iga päevaga vähenesid õlis kaksiksidemeid sisaldavate rasvhapete (oleiin-, linool- ja linoleenhappe) sisaldused ning suurenes laguproduktide (peamiselt asela-, sebats-, suber- ja 9-oksononaanhappe) hulk.

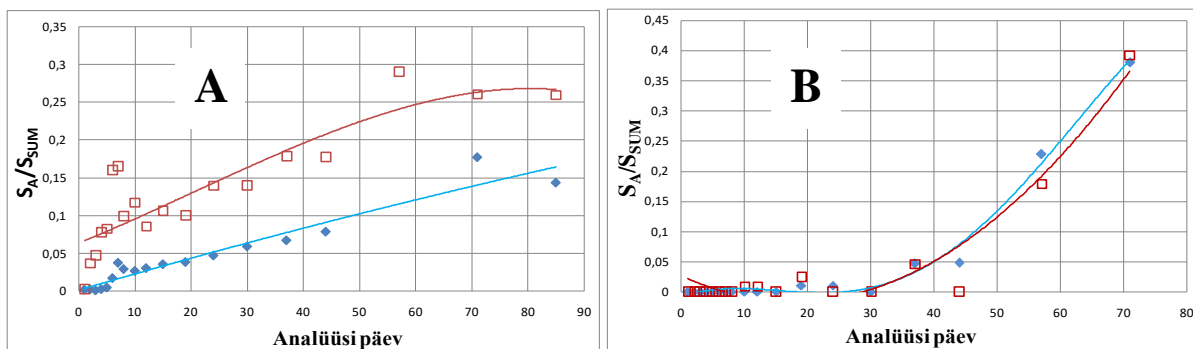
Vanandamisseeria mõõtmiste tulemusi on parim kujutatada graafikul, et oleks võimalik analüüsida algses proovis olnud rasvhapete ja laguproduktide sisalduste muutusi. Linaseemneõli vananedes selle lahustuvus aga vähenes, mistõttu muutus analüüsitava lahuse kontsentratsioon katseseeria vältel. Seetõttu leiti graafiku koostamisel, kui suure osa moodustab rasvhape pindala ( $S_A$ ) kõikide identifitseeritud piikide summaarsest pindalast ( $S_{SUM}$ ). Kuna linaseemneõli kuivab kiiresti seetõttu, et selles leidub palju küllastumata rasvhappe jääke, siis vaadeldi esmalt nende rasvhapete (oleiin-, linool- ja linoleenhappe) sisalduste muutusi ajas (Joonis 9). Kõigi kolme derivatiseerimisreagentiga saadi küllastumata rasvhapete analüüsimisel sarnased tulemused, mistõttu on teised graafikud toodud Lisas 7.



Joonis 9. **A** - Oleiinhappe C18:1 sisalduse muutus (TMTFTH) **B** – Linoleenhappe C18:3 sisalduse muutus (BSTFA). Sinine (♦) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.

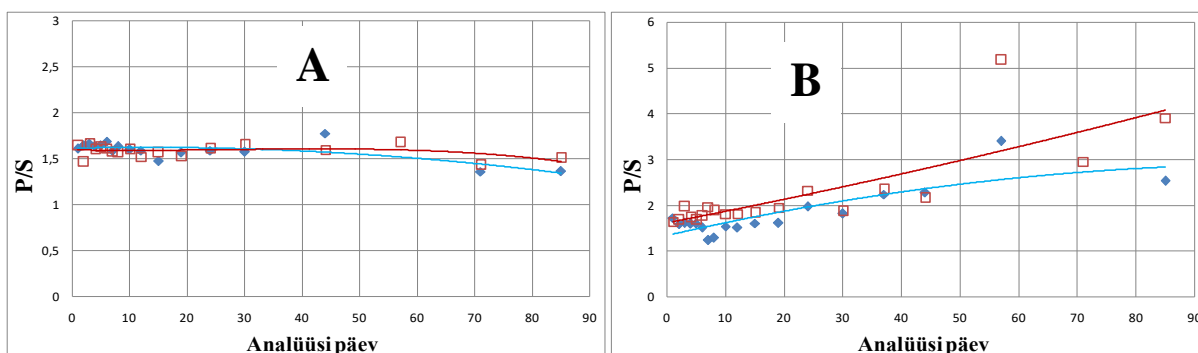
Joonisel 9 toodud graafikutel ja Lisas 6 toodud tabelis on näha, et küllastumata rasvhapete sisaldused vähenevad kiiremini kuivatusahjus olevas proovis. Linoolhappe (C18:2) korral on graafik (Lisa 7) sarnane linoleenhappe (C18:3) sisalduse muutusega (Joonis 9B), kuid rasvhappe sisalduse vähenemine ei ole nii kiire. Analüüsides aga oleiinhappe graafikut (Joonis 9A) on näha, et alguses suureneb oleiinhappe sisaldus. See efekt on tõenäoliselt näiline ning põhjustatud teiste küllastumata rasvhapete üleüldise summaarse hulga vähenemisest. Kuna küllastumata rasvhapete graafikud on kõigi kolme derivatiseerimismeetodi korral sarnased, siis saab järeldada, et C18:1, C18:2 ja C18:3 rasvhapete sisalduste muutumiste analüüsimisel on kõik kolm derivatiseerimisreagenti samavõrd sobivad.

Samaaegselt küllastumata ühendite vähenemisega tekkisid proovi laguproduktid. Enamasti olid nendeks ühenditeks dikarboksüülhapped (aselahape 2C9:0, sebatshape 2C10:0, suberhape 2C8:0 ja 9-oksononaanhape), mis tuvastati nii TMTFTH kui ka HAPE derivatiseerimisega. BSTFA derivatiseerimisega tuvastati nendest neljast ainult 9-oksononaanhape ja aselahape. Suberhape identifitseeriti alles kuivatusahju 75. päevaproovis. Kõik proovides identifitseeritud ühendid on toodud Lisas 6. Peamiseks linaseemneõli vananemise laguproduktiks kõikide meetodite korral oli aselahape, mille sisalduse muutuse graafikud TMTFTH ja HAPE puhul olid sarnased (Joonis 10A, HAPE graafik Lisas 7), kuid BSTFA puhul erinev (Joonis 10B). Kirjanduse [6] andmetel on teada, et mainitud laguproduktid tekivad linaseemneõli vananemisel ning et aselahape tekib juba esimestel päevadel. Seetõttu ei sobi BSTFA laguproduktide analüüsiks, sest nagu on näha Jooniselt 10B, oli aselahape identifitseeritav alles 40. päeva läheduses. Lisas 6 on näha teised laguproduktid, mida BSTFA-ga ei määratud või määrati hiljem võrreldes teiste derivatiseerimismeetoditega.



Joonis 10. Aselahappe 2C9:0 sisalduse muutus. **A** - TMTFH. **B** –BSTFA. Sinine (◆) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.

Õli kuivades tõusis oodatust kiiremini esile lahustuvuse probleem. Vanandamisseries 57. päeval olid kromatogrammidel õli komponentide piigid madalad, milles kahtlustati vananenud õli halvenenud lahustuvust DCM ja tolueni segus. Seetõttu otsustati muuta väljatõetatud meetodikat ja edasiste derivatiseerimiste käigus kasutada tahket proovi, et õli komponentide suhted oleksid määratavad. Kvalitatiivses analüüsi eesmärgiks oli uurida analüütide sisalduste muutusi, mistõttu sobis analüüsiks ligi 2 mg kaaluv proov. Vanandamisseries poolkvantitatiivselt leitud P/S suhted on toodud Joonisel 11. HAPE ja TMTFTH derivatiseerimistel saadi sarnased graafikud (Joonis 11A, TMTFTH graafik Lisas 7), kus P/S suhe on üpris stabiilne. BSTFA korral (Joonis 11B) aga kasvas P/S väärtus aja möödudes isegi üle 2, mistõttu ei ole vanandamisseries põhjal BSTFA derivatiseerimine sobilik õli tüübi määramiseks poolkvantitatiivse P/S suhte järgi. P/S väärtuse kõrvalekalle BSTFA meetodi korral võib olla põhjustatud meetodi madalast derivatiseerimiseefektiivsusest.



Joonis 11. P/S väärtuse muutus. **A** – HAPE. **B** – BSTFA. Sinine (◆) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.

Vanandamisseries tulemustest saab järeldada, et kvalitatiivseks analüüsiks sobivad TMTFTH ja HAPE derivatiseerimised, sest nendega identifitseeriti kõik peamised laguproduktid ning poolkvantitatiivne P/S väärtus oli ajas stabiilne. Kuigi aselahape oli proovis juba esimestel päevadel, tuvastati BSTFA-ga see ühend alles kuu aega hiljem, mistõttu ei ole BSTFA sobilik

derivatiseerimismeetod selle dihappe määramiseks esimestel nädalatel. Lisaks ei identifitseeritud BSTFA-ga mõnda laguprodukti üldse (näiteks sebatshapet), mistõttu ei ole see meetod sobilik õli kvalitatiivseks analüüsiks. Lisaks raskendab BSTFA kromatogrammide interpreteerimist rasvhapete kahe vormi (etüleeritud ja trimetüülsilüülitud) esinemine.

Analüüsides tabelit Lisas 6 on näha, et kõige usaldusväärsemate derivatiseerimismeetoditega (TMTFTH ja HAPE) identifitseeriti esimesel vanandamiseeria nädalal mõlemas linaseemneõli proovis nii küllastunud rasvhapped, kui ka laguprodukte (peamiselt aselahape ja 9-oksononaanhape). Teisest nädalast kuni seeria lõpuni identifitseeriti ka teistsugused laguproduktid (näiteks 8-oksooktaanhape, pimeliinhape jt). Peamistest linaseemneõli rasvhapetest jäid proovidesse steariin-, palmit- ja oleiinhape. Esimese analüüsikuu lõpus ei olnud kuumutatud proovist enam identifitseeritavad linool- ega linoleenhape.

### 4.3. Derivatiseerimismeetodite kokkuvõtlik võrdlus

Tabel 11. Derivatiseerimismetoodikate võrdlus.

Aspekt	TMTFTH ehk Meth- Prep II	Happekatalüütiline	NaOEt + BSTFA
<b>Kasutus õlivärvide analüüsiks</b>	· Uudne	· Kasutatud minimaalselt	· Laialdane
<b>Kvalitatiivne analüüs</b>	· Küllastumata rasvhapete hulga iseloomustamiseks · Laguproduktide kvalitatiivseks määramiseks	· Küllastumata rasvhapete hulga iseloomustamiseks · Laguproduktide kvalitatiivseks määramiseks	· Küllastumata rasvhapete hulga iseloomustamiseks · Võimalik iseloomustada seotud ja vabade rasvhapete hulka · Kromatogrammide interpreteerimist raskendavad rasvhappe esinemine kahes derivatiseeritud vormis
<b>Kvantitatiivne analüüs</b>	· Kõige suurema derivatiseerimis-efektiivsusega · Liialt suur proovi kogus (vähemalt 10 mg) · Probleemiks vananenud õli halb lahustuvus	· Keskmise derivatiseerimis-efektiivsusega · Liialt suur proovi kogus (vähemalt 10 mg) · Probleemiks vananenud õli halb lahustuvus	· Madala derivatiseerimis-efektiivsusega · Liialt suur proovi kogus (vähemalt 10 mg) · Probleemiks vananenud õli halb lahustuvus
<b>Prooviettevalmistus</b>	· Ühe-etapiline derivatiseerimine	· Ühe-etapiline derivatiseerimine · Ekstraheerimine · Proovi ülekandmine · Aurutamine	· Kahe-etapiline derivatiseerimine · Proovi ülekandmine · Lahustite kokku aurutamine
<b>Keskmine katse ajakulu</b>	· 1 h	· 7 h	· 4 h
<b>Reagendi hind</b>	· Kallis	· Odav	· Keskmine
<b>Eelistatavim kasutus</b>	· Kvalitatiivne analüüs · Kvantitatiivne analüüs	· Kvalitatiivne analüüs · Poolkvantitatiivne (P/S) analüüs	· Seotud ja vabade rasvhapete analüüs

Tabelis 11 on toodud kasutatud derivatiseerimismetoodikate eelised ja puudused. Magistritöö tulemusena leiti, et kõige paremini sobib nii kvantitatiivseks kui ka kvalitatiivseks analüüsiks TMTFTH derivatiseerimismeetod. Meetodi puuduseks on aga kvantitatiivses analüüsis suur reagenti kulu, kus proovi kogus peab olema vähemalt 10 mg. Kuigi TMTFTH reagent on kallis võrreldes teiste derivatiseerimisreagentidega, on sellega prooviettevalmistus lihtsam, kiirem ja analüüsi läbiviimiseks on vaja vähem teisi töövahendeid (viaalid, solvendid jne). Samuti on TMTFTH derivatiseerimiseefektiivsus kõrgem kui teistel meetoditel, mistõttu (lähtudes uuringu tulemustest) on see kõige sobilikum meetod õlisideaine analüüsimiseks. Happedakatalüütiline metüleerimine on reagenti hinna järgi odav meetod ja sobilik kvalitatiivseks analüüsiks, sest kromatogrammidel olid identifitseeritavad samad ühendid, mis TMTFTH metüleerimises. Samuti on see sobilik meetod poolkvantitatiivseks (P/S) analüüsiks. Samas kui võrrelda TMTFTH meetodiga, siis on happedakatalüütiline metüleerimine palju aeganõudvam ja töömahukam. Uuringute käigus tuli välja, et kolmest derivatiseerimismeetodist BSTFA langeks valikus kõige viimaseks, sest selle abil ei olnud võimalik identifitseerida kõiki vananenud linaseemneõlis olnud laguprodukte.

GC-MS ja GC-FID tulemuste võrdluses osutus värske linaseemneõli korral paremaks analüüs GC-FID meetodiga. Vananenud õli korral oli tulemused MS ja FID detektorite signaale kasutades samaväärsed. Kuna õlivärvide sideainete analüüsi mudel on mõeldud vananenud õlile, siis on sobivaks analüüsimeetodiks GC-MS, sest selle seadmega on võimalik läbi viia ka ühendite identifitseerimine.

Magistritöö käigus tuli esile mitmeid probleeme, mis raskendavad õlivärvide GC analüüsi. Alustuseks tuli leida ja optimeerida sarnaste derivatiseeritud rasvhapete efektiivseks eraldamiseks sobiv kolonn (olukorda raskendas see, et sooviti analüüsida nii värsket vedelat kui ka kuivanud ja raskesti lahustuvat õli). Õli kvantitatiivse analüüsi korral on vaja kasutada kalibreerimislahuseid, kus on sees analüüsitavad ühendid. BSTFA korral oli kalibreerimislahustes ainult kaks analüüsitavat ühendit, mistõttu ei olnud võimalik leida teiste rasvhapete sisaldusi. Kalibreerimislahuste kasutamine nõuab aga teatavat eelnevat informatsiooni proovi koostise kohta, samuti mitmete erinevate komponentide segude puhul võib tekkida probleeme (näiteks õli ja proteiini sideainete segu ehk õli-tempera värv). Seetõttu on vajalik eelnev sideaine liigi tuvastamine, mida on võimalik näiteks läbi viia spektroskoopiliste analüüsidega (ATR-FT-IR, RAMAN jt). Kromatogrammide analüüsil identifitseeriti laguproduktid massispektrite põhjal, millele pakkus tõenäoliseima

struktuuri. Analüüsitavates värviproovides võib leida aga keerukamaid ühendeid, mida programm ei pruugi õigesti tuvastada või millele vastav massispekter andmebaasist puudub.

Käesoleva töö käigus töötati välja võimalikult palju probleeme arvesse võttes sobivad meetodid õlisideaine analüüsiks. Kirjanduse andmetel on siiani kasutatud õli tüübi määramiseks P/S suhet, mis on poolkvantitatiivne väärtus. Selle jaoks leitakse kromatogrammilt kahe rasvhappe (palmit- ja steariinhappe) piikide pindalade jagatis. Poolkvantitatiivne analüüs on ka põhjuseks, miks kirjanduses P/S suhte väärtus sama õli korral on väga varieeruv – väärtuse leidmiseks on kasutatud erinevaid derivatiseerimisreagente ning ei ole arvestatud, et rasvhapped mõjutavad kromatogrammil piikide pindalaid erineval määral. Seetõttu on käesolevas töös kvantitatiivse mudeli kaudu leitud P/S suhted täpsemad ning on paremini kasutatavad õli tüübi määramisel. Triõlide segu derivatiseerimisel aga leiti (Tabel 9), et C16:0 ja C18:1 rasvhapete korral olid TMTFTH ja HAPE derivatiseerimiseefektiivsused erinevad. Seetõttu on edasiseks plaaniks loodud kvantitatiivset mudelit veelgi täiustada, sest kaasates uuringutesse ka teised õlid (moonioõli ja pähkliõli) tuleks derivatiseerimiseefektiivsusi eriti jälgida ja neid arvutustes arvesse võtta. Käesolevas töös saadud kvantitatiivse P/S suhte abil on võimalik sama derivatiseerimismetoodika korral teha kindlaks reaalses proovis kasutatud sideaine. Läbiviidud kvalitatiivse ja kvantitatiivse analüüsi tulemustest järeldati, et reaalse proovi analüüsamiseks sobivad kõige paremini TMTFTH ja happekatalüütiline metüleerimine, mille tulemused on järgmises alapeatükis.

#### **4.4. Reaalsete proovide analüüs**

Reaalseteks proovideks olid tumeroheline värv tundmatu kunstniku maalilt ja valge värv Karja krutsifiksilt (Lisas 8 on toodud objektide fotod kuhu on märgitud proovivõtukohtad). Kõigepealt teostati analüüsid ATR-FT-IR spektroskoopilise meetodiga. Saadud spektrite (Lisa 9 ja Lisa 10) interpreteerimise tulemusena saab ainult öelda, et mõlemas värviproovis leidis estri-tüüpi ainet (nende spektrite põhjal ei saa täpselt tuvastada õli sideainet). Sideaine tüübi täpsemaks identifitseerimiseks kasutati väljatöötatud GC-MS ja GC-FID meetodeid.

Tumerohelise värvi analüüsiks kasutati TMTFTH ja HAPE derivatiseerimismetoodikaid. Valge värviproovi kogus ei olnud piisav kahe kvantitatiivse analüüsi tegemiseks, mistõttu viidi derivatiseerimine läbi ainult TMTFTH metoodikaga (eelnevad uuringud on näidanud selle sobilikust). Kvalitatiivse analüüsi GC-MS tulemusi interpreteerides (kromatogrammid Lisas 11) selgus, et mõlemad proovid sisaldasid peamiselt järgmisi laguprodukte:

pimeliinhape, suberhape, aselahape, sebatshape, palmithape, steariinhape ja oleiinhape. Lisaks oli valge värvi proovis 9-oksononaanhape. Nagu selgus linaseemneõli vanandamisseries, siis on identifitseeritud ühendid vananenud õli komponendid. Seetõttu saab järeldada, et mõlemas proovis oli sideaineks kasutatud õli. Proovidest polüküllastumata rasvhappeid (linool- ja linoleenhapet) ei identifitseeritud, millest saab järeldada, et tegemist oli vananenud õliga.

Kvantitatiivses analüüsis leiti palmit-, steariin- ja oleiinhappe sisaldused mmol/100 g proovi kohta. Saadud tulemused on toodud Tabelis 12. Krutsifiksi valge värvi kvantitatiivse P/S suhte väärtuseks leiti GC-MS meetodil 1,35 ja GC-FID meetodil 1,3. Peale linaseemneõli on kirjanduse andmetel madal P/S suhte (poolkvantitatiivne) väärtus veel kastoorõlil (P/S väärtuseks on 1 +/- 0,1). Kastoorõlis on aga ligikaudu 90% 9Z-hüdroksüoktadetseenhapet [6], kuid seda ühendit proovist ei leitud, mistõttu võib järeldada, et krutsifiksi värvi proovis oli õlsideaineks linaseemneõli. Maali tumerohelise värvi P/S suhe oli suurem kui 2, millest saab järeldada, et tegemist ei olnud puhta linaseemneõliga, vaid tõenäoliselt on proovis õlide segu. TMTFTH derivatiseerimismeetodiga leiti, et maali proovis oli oleiinhape (C18:1) sisaldus suurem kui krutsifiksi proovis. Vanandamisseries tulemustest saab järeldada, et aja möödudes oleiinhappe osakaal õlis väheneb. Teades, et maal pärineb 20. sajandist saab järeldada, et ülemaaling krutsifiksil on vanem ning tehtud enne 20. sajandit või selle alguse poole. Reaalsete värvi proovide analüüs näitas, et nii TMTFTH kui ka happekatalüütiline metüleerimine olid sobivad derivatiseerimismetoodikad sideaine komponentide analüüsimiseks. Kuna TMTFTH derivatiseerimisefektiivsus on kõrgem, siis on see meetodika kvantitatiivses analüüsis usaldusväärsem.

Tabel 12. Reaalsete proovide kvantitatiivse analüüsi tulemused. Arvutatud rasvhappe sisaldus **mmol**/100 g proovi kohta ja P/S väärtused (ühikuta).

Rasvhape	Tundmatu kunstniku maal				Krutsifiks	
	GC-MS TMTFTH	GC-FID TMTFTH	GC-MS HAPE	GC-FID HAPE	GC-MS TMTFTH	GC-FID TMTFTH
C16:0	2,8	2,3	2,6	2,5	2,1	1,9
C18:0	1,2	0,9	1,1	1,1	1,5	1,5
C18:1	0,7	0,4	0,3	0,3	0,04	0,06
P/S	2,34	2,53	2,29	2,22	1,35	1,30

## 5. KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli töötada välja meetodikad õlisideainete kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks analüüsiks GC-MS meetodiga.

Magistritöö eksperimentaalses osas töötati välja derivatiseerimismetoodikad nii värskete kui ka kuivanud õlile. Derivatiseerimiseks valiti kolm meetodit – uudne TMTFTH ehk Meth-Prep II reagentiga metüleerimine, laialt levinud NaOEt koos BSTFA derivatiseerimisega ning arheoloogide seas levinud happekatalüütiline metüleerimine. Derivatiseeritud proove analüüsiti GC-MS või GC-FID meetodiga.

Kvalitatiivses analüüsis identifitseeriti linaseemneõli komponendid ja laguproduktid, mis tekivad õli vananedes. Samuti viidi läbi õli kolmekuune vanandamisserie, mille tulemusena saadi informatsiooni, kuidas muutuvad komponentide sisaldused õli kuivades. Jälgiti nii toatemperatuuril kui ka kuivatusahjus hoitud proovi koostise muutust. Vanandamisserie tulemustest järeldati, et kvalitatiivseks õlisideaine analüüsiks on sobivaimad TMTFTH ja happekatalüütiline metüleerimine.

Kvantitatiivses analüüsis leiti väljatöötatud sisestandardi meetodiga värskes ja vananenud linaseemneõlis peamiste rasvhapete sisaldused. Saadud tulemustest arvatati kvantitatiivsed P/S (palmit- ja steariinhappe) suhte väärtused, mida rakendati reaalse proovi analüüsis. Käesoleva tööga leiti, et TMTFTH ja happekatalüütiline metüleerimised sobivad õli tüübi tuvastamiseks ühekomponentsete õlivärvide korral. Kõigile kolmele meetodikale arvatati derivatiseerimiseefektiivsused, mille väärtus näitab, kui suur osa analüüdist vastava meetodiga on võimalik määrata. Kvantitatiivse analüüsi sooritamiseks on sobivaim TMTFTH derivatiseerimine, sest selle meetodika derivatiseerimiseefektiivsus oli suurim. Arvestades reagenti derivatiseerimiseefektiivsuseid erinevate rasvhapete määramisel oleks võimalik õli sisalduse kvantiseerimine viia veelgi täpsemaks kui seda siiani on tehtud.

Tuginedes kvalitatiivse ja kvantitatiivse analüüsi tulemustele, on võimalik järeldada, et sobivaimateks meetoditeks on TMTFTH või happekatalüütiline metüleerimine. Seetõttu kasutati neid meetodeid reaalsete värviproovide analüüsis, kus saadi informatsiooni õlivärvi sideaine kohta.

Leiti, et efektiivseim meetod õlivärvide sideaine analüüsiks on TMTFTH derivatiseerimine koos GC-MS-iga. Sel viisil on võimalik identifitseerida proovis olevad ühendid ning määrata kvantitatiivselt peamiste sisaldused.

## 6. SUMMARY

Eliise Tammekivi

### **Determination of binder in oil paints using GC-MS method**

The aim of this thesis was to develop methodologies for the qualitative and quantitative analyses of oil binder using GC-MS method.

The practical part of this thesis involved the development of derivatization methods for fresh and aged linseed oil. Three methods were chosen – novel TMTFTH aka Meth-Prep II derivatization, widely used NaOEt combined with BSTFA derivatization and acid-catalyzed methylation, which is used by archaeologists. The derivated samples were analysed by GC-MS or GC-FID methods.

The components and degradation products of linseed oil were identified in qualitative analysis. Also, experimental ageing sequence of linseed oil was conducted to determine how the content of these compounds changes over time. The oil samples were used - one was held at room temperature and the other in an oven. Results showed, that the best derivatization methods for qualitative analysis are TMTFTH and acid-catalyzed methylations.

The contents of main fatty acid in fresh and aged linseed oil were determined with quantitative method together with internal standard. From these results the quantitative P/S (palmitic and stearic acid) ratios were calculated. The quantitative analysis showed that TMTFTH and acid-catalyzed methylations are suitable for determination of the oil and the contents of fatty acids in it. Also, the efficiency of the derivatization was calculated for all of the used derivatization methods. This value gives information about how much of the analyte is quantifiable with the corresponding method. The best derivatization method for quantitative analysis is TMTFTH, because it has the highest derivatization efficiency.

The three derivatization methods were compared based on the qualitative and quantitative analyzes. TMTFTH and acid-catalyzed methylations are the most suitable methods for oil binder analysis, depending on the resources and preferences. Therefore both developed routine methods were applied for the analysis of real paint samples.

The results of this thesis showed, that the most effective method for the analysis of oil binders in paints is GC-MS method with TMTFTH derivatization. This approach makes the identification of degradation products and the quantification of the main fatty acids possible.

## 7. KASUTATUD KIRJANDUS

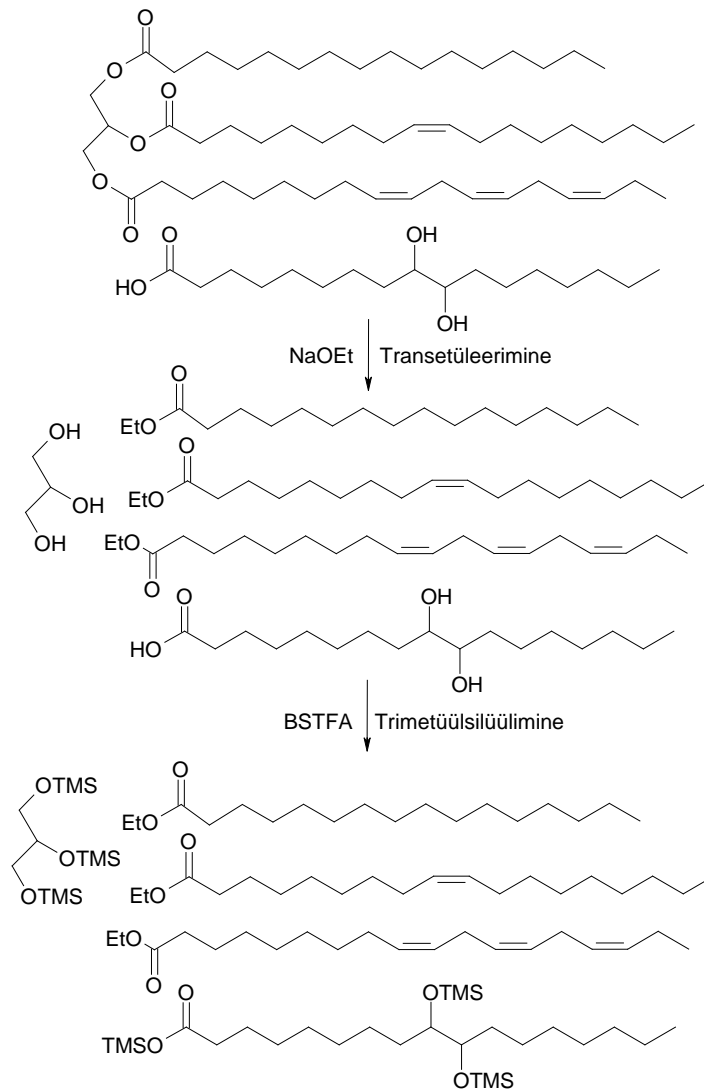
1. van den Berg, J. D. J. Analytical Chemical Studies on Traditional Linseed Oil Paints. PhD thesis. **2002**.
2. Colombini, M. P.; Modugno, F. *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*.
3. Colombini, M. P.; Andreotti, A.; Bonaduce, I.; Modugno, F.; Ribechini, E. Analytical Strategies for Characterizing Organic Paint Media Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (6), 715–727.
4. Gettens, R. J.; Stout, G. L. *Painting Materials. A Short Encyclopaedia*, 2nd ed.; Dover Publications, Inc: New York, USA, 1966.
5. Stoye, D.; Marwald, B.; Plehn, W. Paints and Coatings, 1. Introduction. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
6. Izzo, F. C. 20th Century Artists' Oil Paints: A Chemical-Physical Survey. **2010**.
7. van den Berg, K. J.; Burnstock, A.; de Keijzer, M.; Krueger, J.; Learner, T.; de Tagle, A.; Heydenreich, G. *Issues in Contemporary Oil Paint*; Springer: Switzerland, 2014.
8. Blaško, J.; Kubinec, R.; Husová, B.; Příkryl, P.; Pacáková, V.; Štulík, K.; Hradilová, J. Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Oils and Oil Binders in Paintings. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (6–7), 1067–1073.
9. Mills, J. S.; White, R. *The Organic Chemistry of Museum Objects*, 2nd ed.; Elsevier Science Ltd: Oxford, 1994.
10. Cyberlipid - Minor Vegetal Oils <http://www.cyberlipid.org/glycer/glyc0053.htm> (viimati uuendatud 20.02.2017)
11. Cappitelli, F.; Learner, T.; Chiantore, O. An Initial Assessment of Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography/Mass Spectrometry for the Identification of Oils from Dried Paint Films. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2002**, *63* (2), 339–348.
12. Thomas, A.; Matthäus, B.; Fiebig, H.-J. Fats and Fatty Oils. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
13. Edwards, H. G. M.; Vandenabeele, P. *Analytical Archaeometry. Selected Topics*; CPI Group (UK) Ltd: Croydon, 2012.
14. Manzano, E.; Rodriguez-Simón, L. R.; Navas, N.; Checa-Moreno, R.; Romero-Gámez, M.; Capitan-Vallvey, L. F. Study of the GC–MS Determination of the Palmitic–stearic Acid Ratio for the Characterisation of Drying Oil in Painting: La Encarnación by Alonso Cano as a Case Study. *Talanta* **2011**, *84* (4), 1148–1154.

15. Rella, R.; Sturaro, A.; Parvoli, G.; Ferrara, D.; Casellato, U. Identification of Binding Media in Paintings. *Chromatographia* **2006**, *63* (11–12), 629–631.
16. Zovi, O.; Lecamp, L.; Loutelier-Bourhis, C.; Lange, C. M.; Bunel, C. Stand Reaction of Linseed Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 616–626.
17. Reeves, T.; Popelka-Filcoff, R. S.; Lenehan, C. E. Towards Identification of Traditional European and Indigenous Australian Paint Binders Using Pyrolysis Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *803*, 194–203.
18. McNair, H. M.; Miller, J. M. *Basic Gas Chromatography. Techniques in Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, USA, 1998.
19. van den Berg, J. D. J.; van den Berg, K. J.; Boon, J. J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Oil Paint Samples Using a Two-Step Derivatisation Method and on-Column GC/MS. *Prog. Org. Coat.* **2001**, *41* (1–3), 143–155.
20. Young, K. E.; Quinn, S. M.; Trumble, S. J. Comparing Gas Chromatographic Techniques Used in Fatty Acid Profiling of Northern Fur Seals (*Callorhinus ursinus*) and Steller Seal Lions (*Eumetopias jubatus*) from Lovushki Island Complex, Russia. *Int. J. Appl. Sci. Technol.* **2012**, *2* (9), 11–21.
21. Stern, B.; Heron, C.; Serpico, M.; Bourriau, J. A Comparison of Methods for Establishing Fatty Acid Concentration Gradients Across Potsherds: A Case Study Using Late Bronze Age Canaanite Amphorae\*. *Archaeometry* **2000**, *42* (2), 399–414.
22. Piccirillo, A.; Scalarone, D.; Chiantore, O. Comparison between off-line and on-line Derivatisation Methods in the Characterisation of Siccative Oils in Paint Media. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2005**, *74* (1–2), 33–38.
23. Cartoni, G.; Russo, M. V.; Francesca Spinelli; Talarico, F. Characterisation of Fatty Acids in Drying Oils Used in Paintings on Canvas by GC and GC-MS Analysis. *Soc. Chim. Ital.* **2001**, *91* (1), 719–726.
24. Sutherland, K. Derivatisation Using m-(trifluoromethyl)phenyltrimethylammonium hydroxide of Organic Materials in Artworks for Analysis by Gas Chromatography–mass Spectrometry: Unusual Reaction Products with Alcohols. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149* (1), 30–37.
25. Lazzari, M.; Chiantore, O. Drying and Oxidative Degradation of Linseed Oil. *Polym. Degrad. Stab.* **1999**, *65* (2), 303–313.
26. Papakosta, V.; Smittenberg, R. H.; Gibbs, K.; Jordan, P.; Isaksson, S. Extraction and Derivatization of Absorbed Lipid Residues from Very Small and Very Old Samples of Ceramic Potsherds for Molecular Analysis by Gas Chromatography–mass

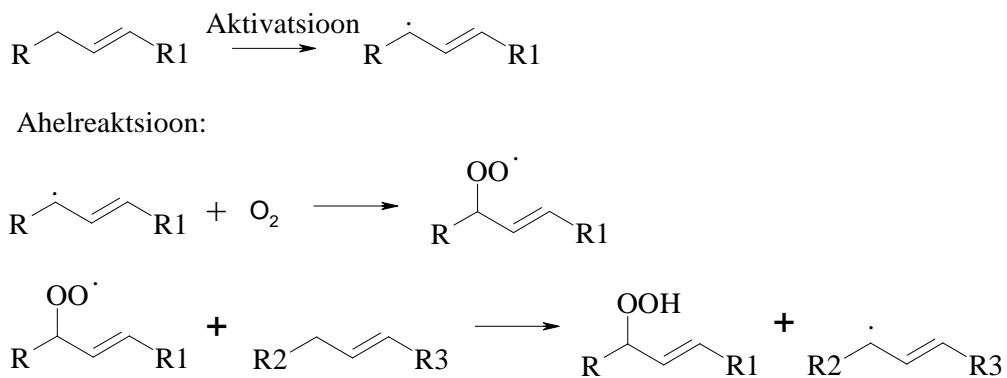
- Spectrometry (GC–MS) and Single Compound Stable Carbon Isotope Analysis by Gas Chromatography–combustion–isotope Ratio Mass Spectrometry (GC–C–IRMS). *Microchem. J.* **2015**, *123*, 196–200.
27. Aldai, N.; Murray, B. E.; Najera, A. I.; Troy, D. J.; Osoro, K. Derivatization of Fatty Acids and Its Application for Conjugated Linoleic Acid Studies in Ruminant Meat Lipids. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, No. 85, 1073–1083.
  28. Vunder - Clarified Linseed Oil L&B <https://vunder.ee/en/product/clarified-linseed-oil-lb/> (viimati uuendatud 07.05.2017)
  29. *Handbook of Chemistry and Physics*, 76th ed.; CRC Press: New York, USA, 1995.
  30. Agilent Technologies - Capillary DB-225ms <http://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/db-225ms> (viimati uuendatud 04.04.2017)
  31. Craig, O. E.; Saul, H.; Lucquin, A.; Nishida, Y.; Taché, K.; Clarke, L.; Thompson, A.; Altoft, D. T.; Uchiyama, J.; Ajimoto, M.; Gibbs, K.; Isaksson, S.; Heron, C. P.; Jordan, P. Earliest Evidence for the Use of Pottery. *Nature* **2013**, *496* (7445), 351–354.
  32. del Rio, J. C.; McKinney, D. E.; Knicker, H.; Nanny, M. A.; Minard, R. D.; Hatcher, P. G. Structural Characterization of Bio- and Geo-Macromolecules by off-Line Thermochemolysis with Tetramethylammonium Hydroxide. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823* (1–2), 433–448.
  33. Kofford, J. C.; Manandhar, E.; Logue, B. A. Quantitative Hands-on Gas Chromatography Undergraduate Analytical Laboratory Exercise. *J. Lab. Chem. Educ.* **2015**, *3* (1), 12–17.
  34. Oil, Canola. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18 (2015)

## 8. LISAD

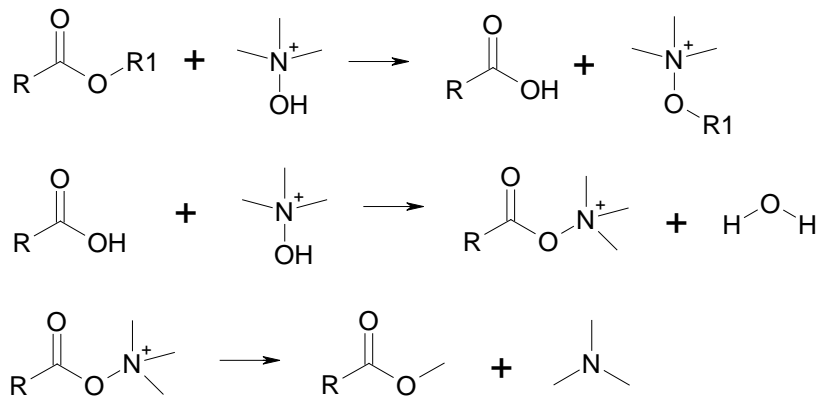
## LISA 1 – Reaktsiooniskeemid ja struktuurivalemid



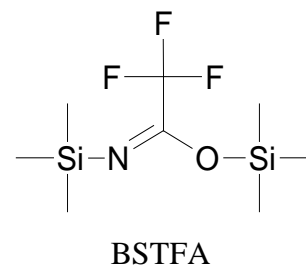
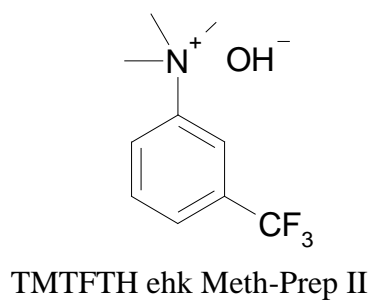
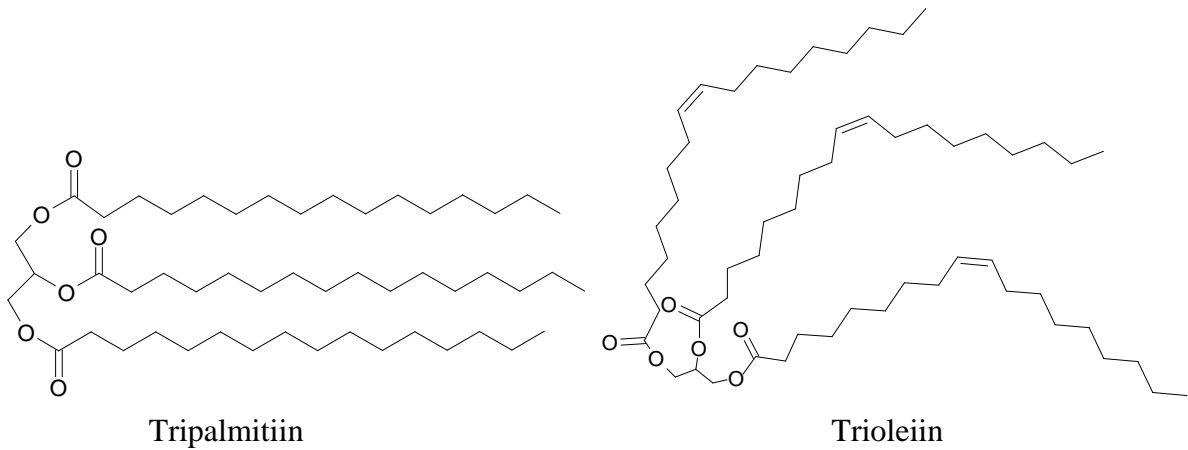
Joonis 12. Triglytseriidi ja vabade rasvhapete derivatiseerimine reaktsioonil naatriumetanolaadi ja BSTFA-ga [19].



Joonis 13. Õli oksüdeerumine. Küllastumata rasvhappe jäägi ahelreaktsioon [12]

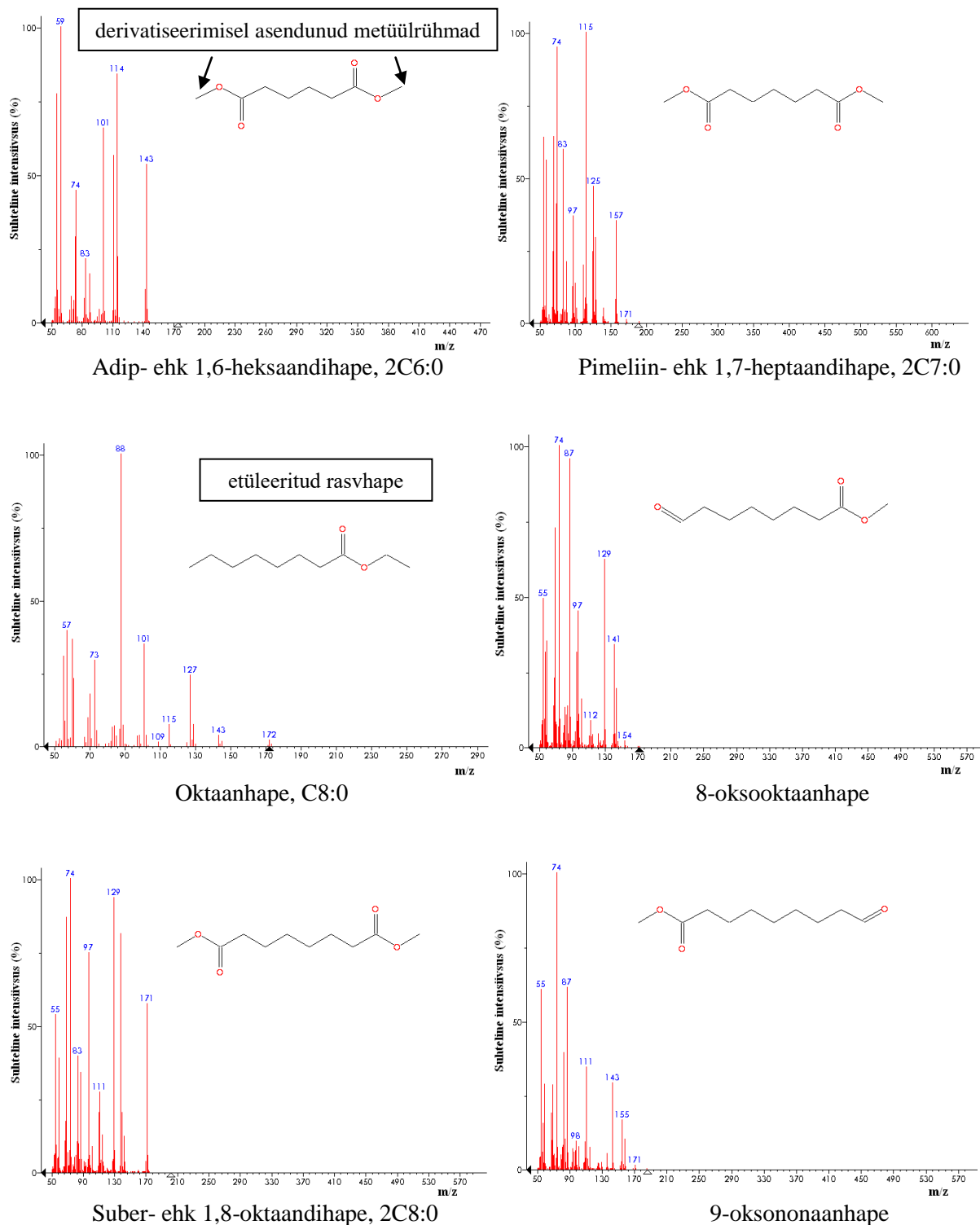


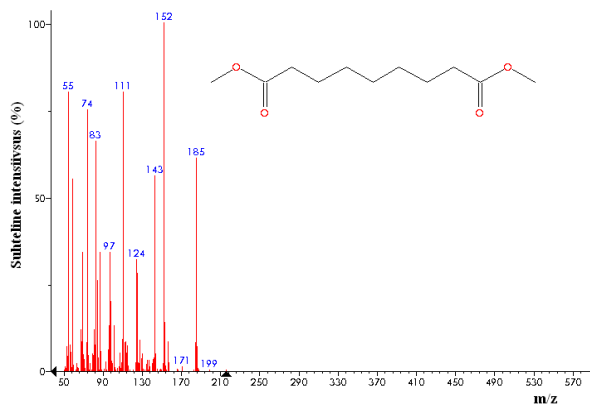
Joonis 14. Seotud rasvhappe metüleerimine TMAH derivatiseerimisreagentiga [6]



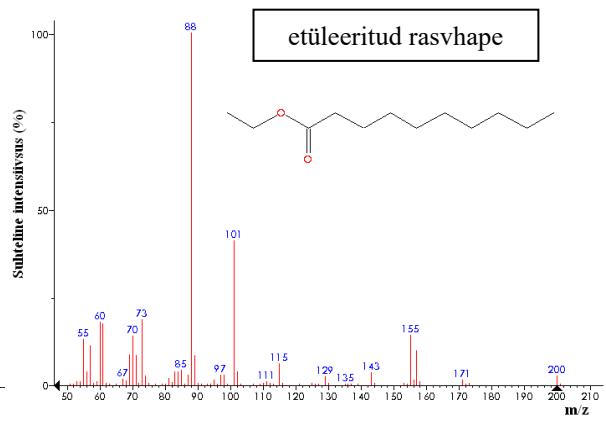
## LISA 2 -Õlides või kalibreerimislahustes tuvastatud ühendite massispektrid ja struktuurivalemid süsinikuahela pikendamise järjekorras

Jooniste alla on toodud ühendite derivatiseerimata vormi nimetus ja kasutatud lühend.

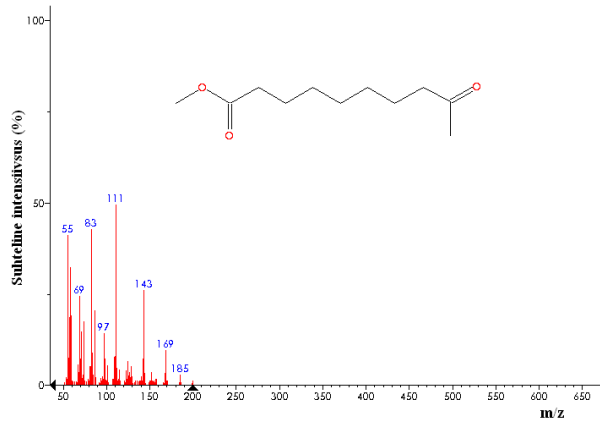




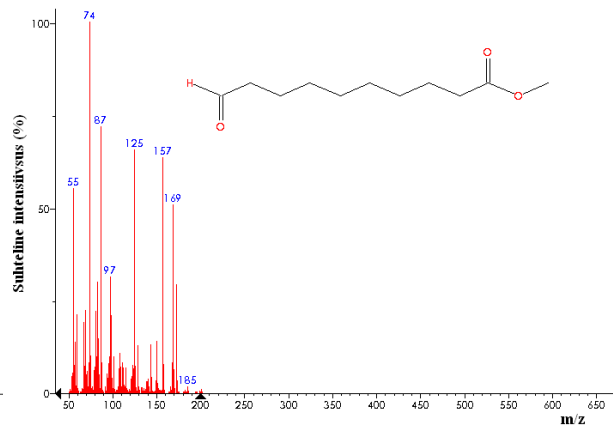
Asela- ehk 1,9-nonaandihape, 2C9:0



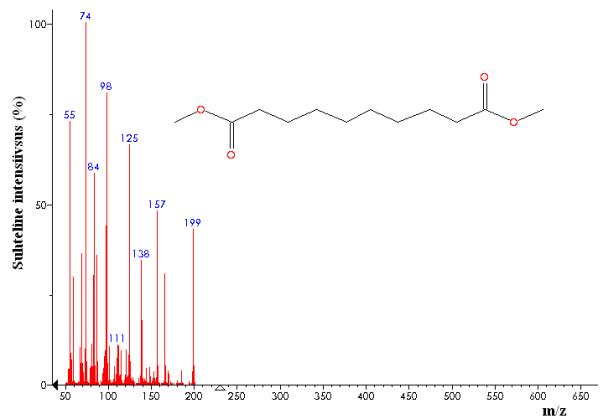
Kapriin- ehk dekaanhape, C10:0



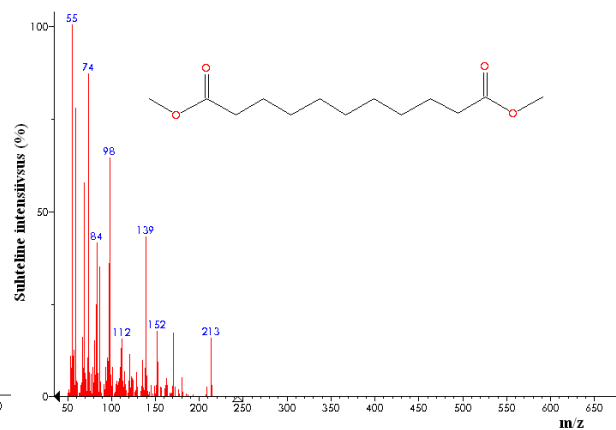
9-oksodekaanhape



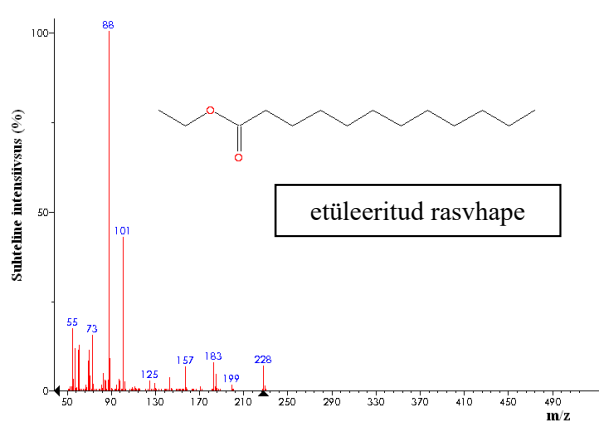
10-oksodekaanhape



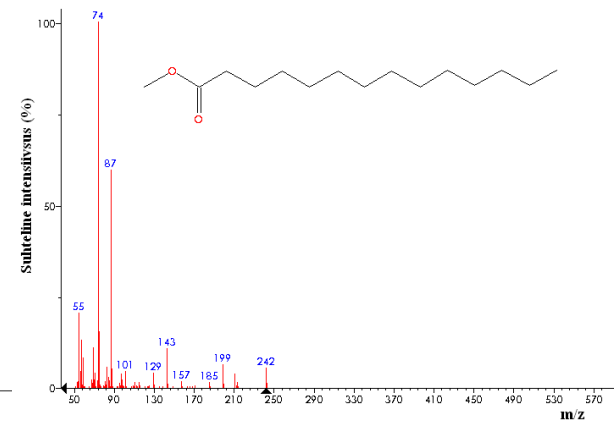
Sebats- ehk 1,10-dekaandihape, 2C10:0



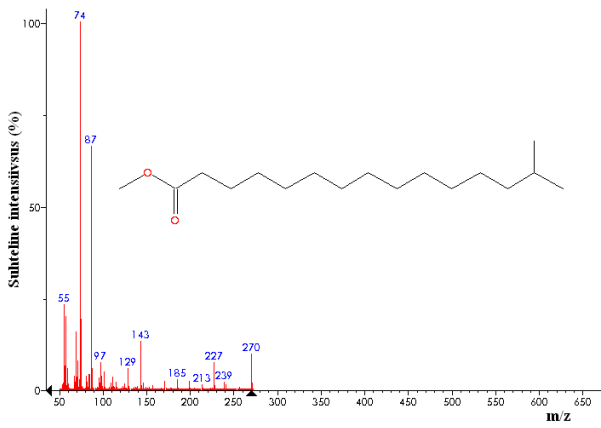
1,11-undekaandihape, 2C11:0



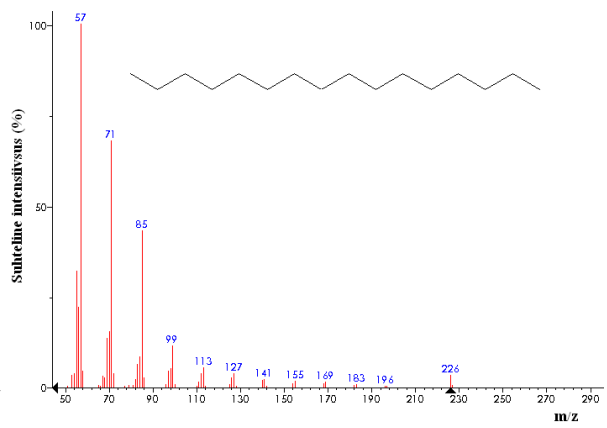
Lauriin- ehk dodekaanhape, C12:0



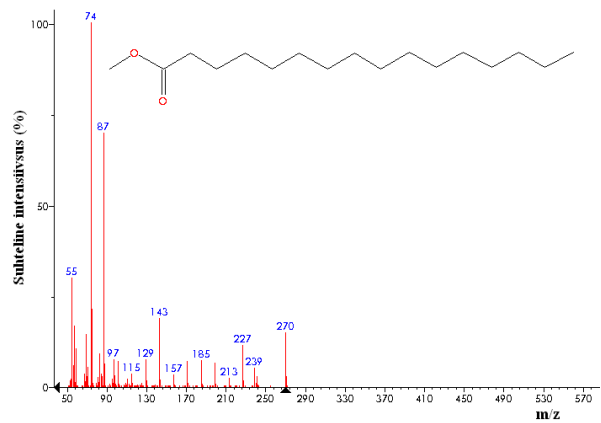
Müristiin- ehk tetradekaanhape, C14:0



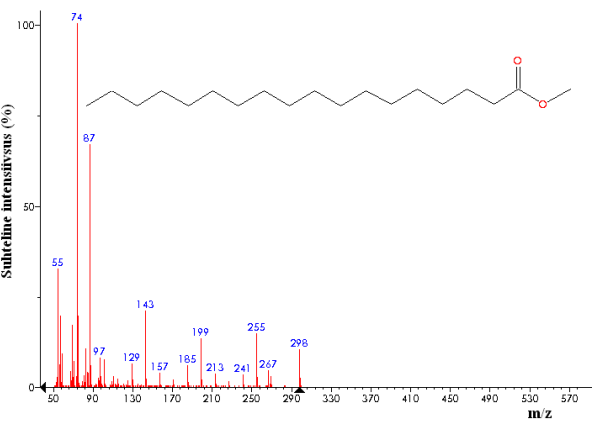
14-metüülpentadekaanhape



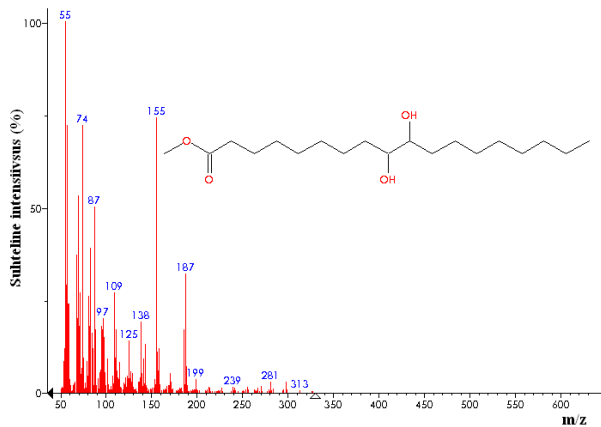
Heksadekaan, C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>



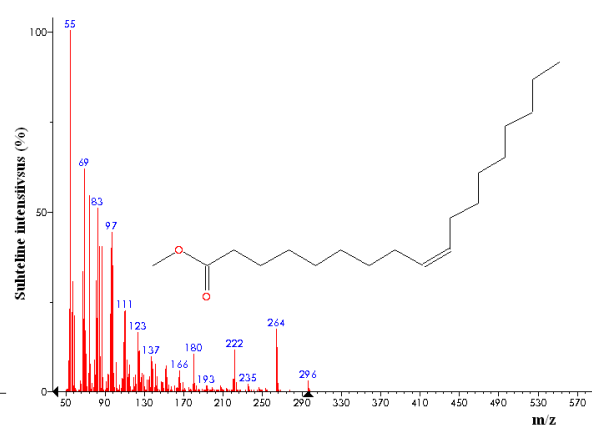
Palmit- ehk heksadekaanhape, C16:0



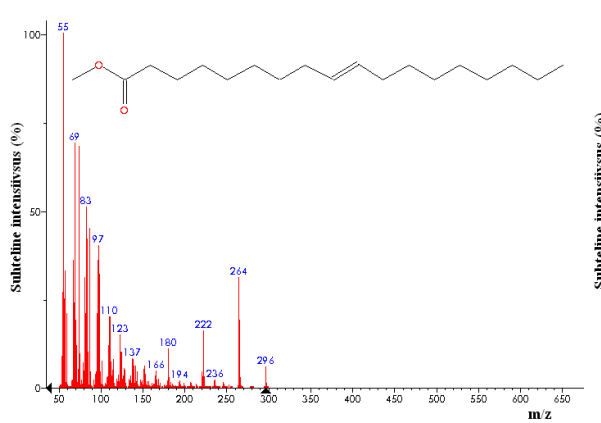
Steariin- ehk oktadekaanhape, C18:0



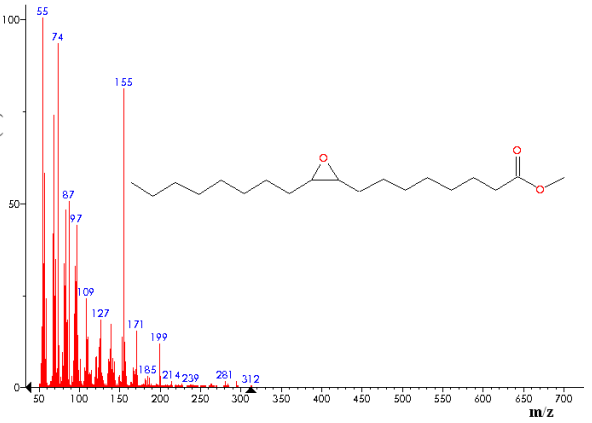
9,10-dihüdroksüoktadekaanhape



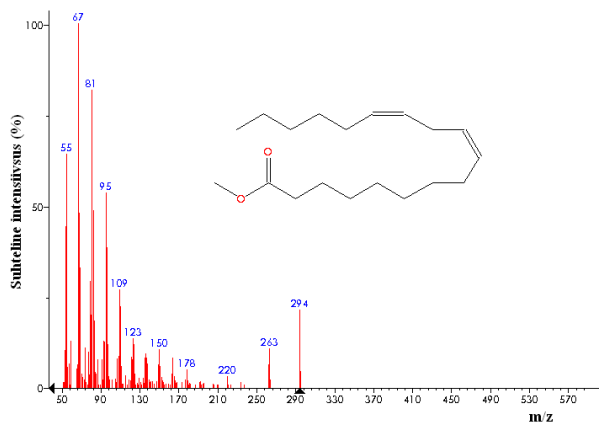
Oleiin- ehk 9Z-oktadetseenhape, C18:1



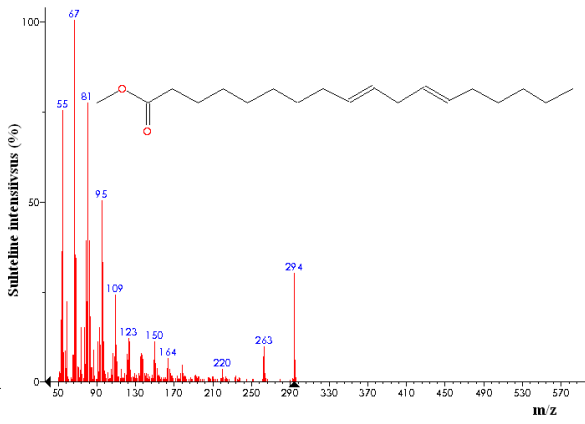
9E-oktadetseenhape, C18:1



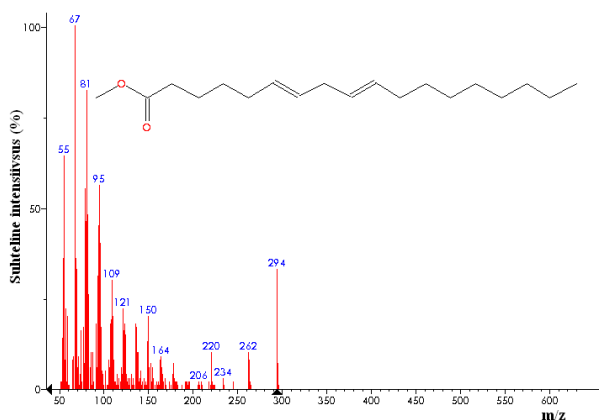
9,10-epoksüoktadekaanhape



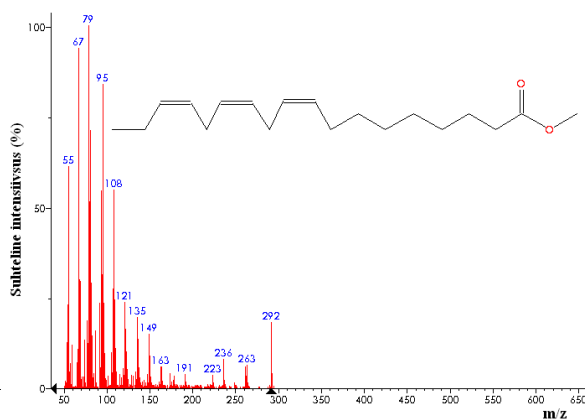
Linool- ehk 9Z,12Z-oktadekadienhape, C18:2



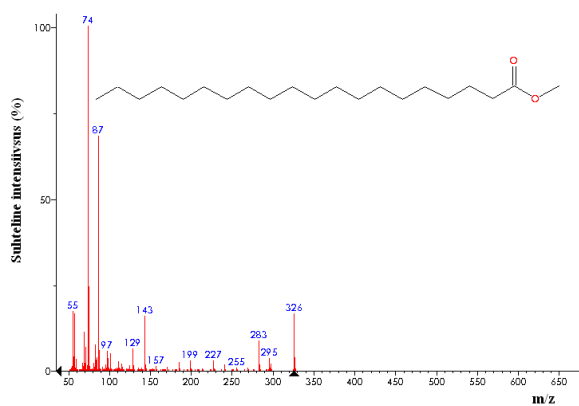
9E,12E-oktadekadienhape, C18:2



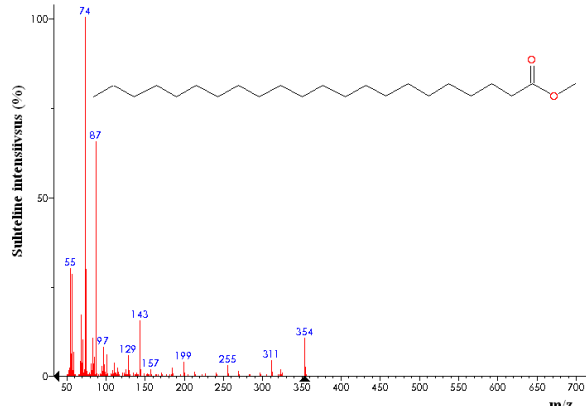
6E,9E-oktadekadienhape, C18:2



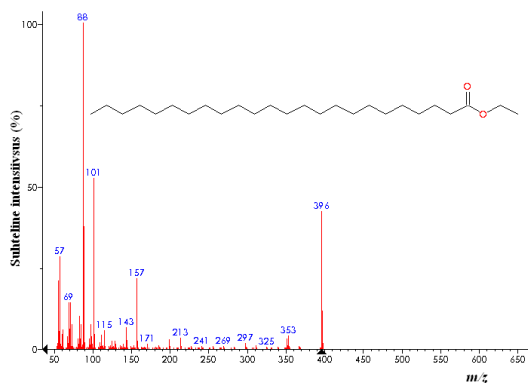
Linoleen- ehk 9Z,12Z,15Z-oktadekatrienhape, C18:3



Arahiin- ehk eikosaanhape, C20:0



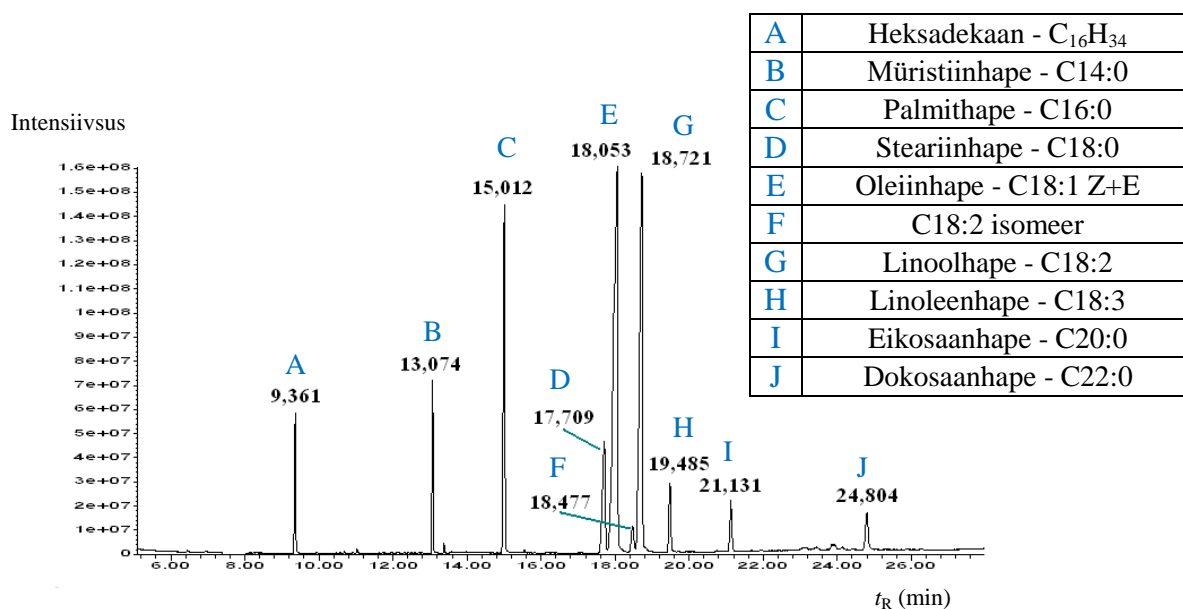
Beheen- ehk dokosaanhape, C22:0



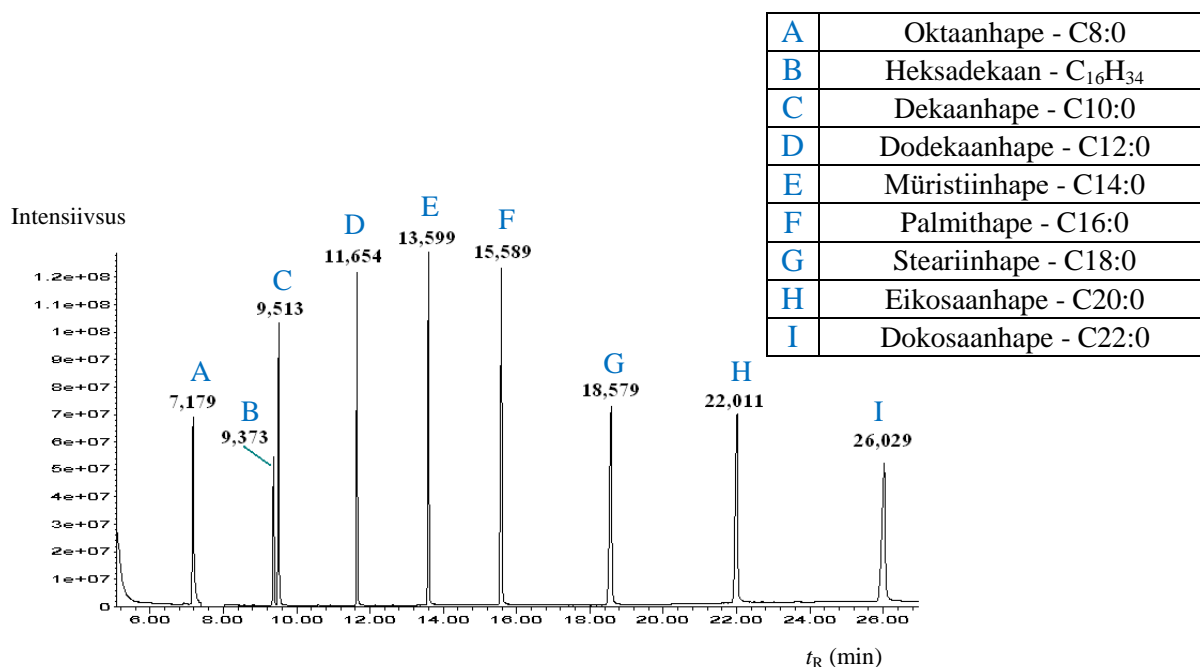
Tetrakosaanhape, C24:0

### LISA 3 - FAME ja FAEES kalibreerimissegude interpreteeritud GC-MS kromatogrammid

Kromatogrammil tabelis on toodud rasvhapete lühendid ja nimetused, mis vastavad identifitseeritud ühendite derivatiseerimata vormile.



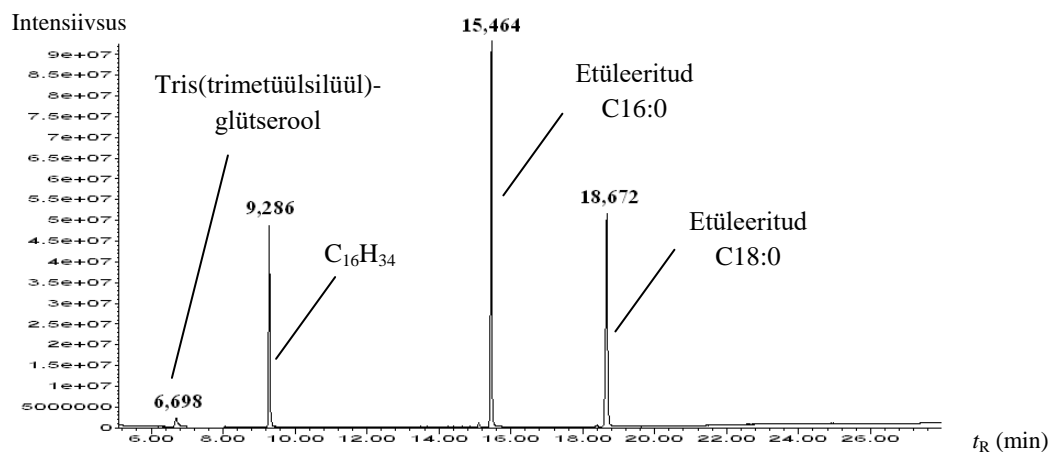
Joonis 15. Kõige suurema kontsentratsiooniga FAME kalibreerimislahuse kromatogramm ja retentsiooniaegadele vastavad metüleeritud rasvhapped. C18:2 isomeer on 9E,12E-oktadekadienhape.



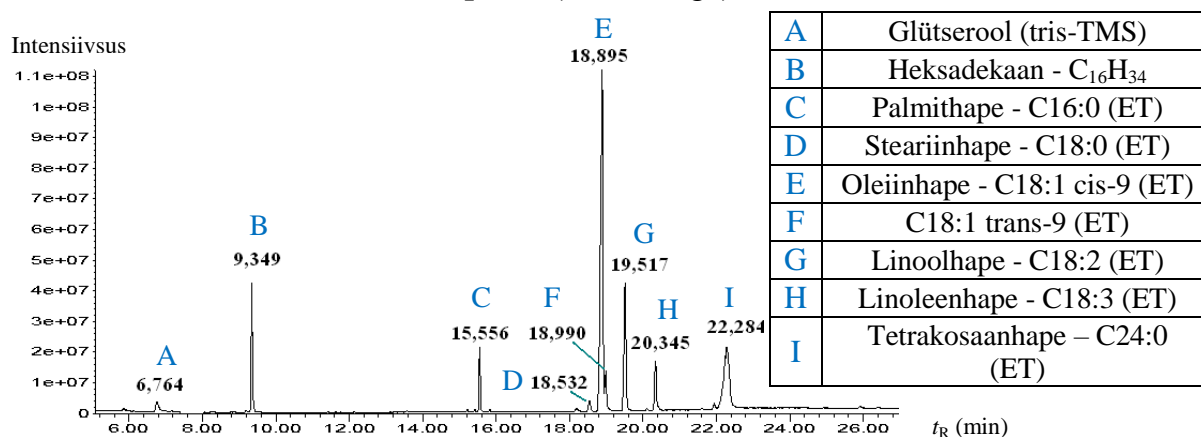
Joonis 16. Kõige suurema kontsentratsiooniga FAEES segu kromatogramm ja retentsiooniaegadele vastavad etüleeritud rasvhapped.

## LISA 4 – Derivatiseeritud ja GC-MS meetodiga analüüsitud õlide kromatogramm

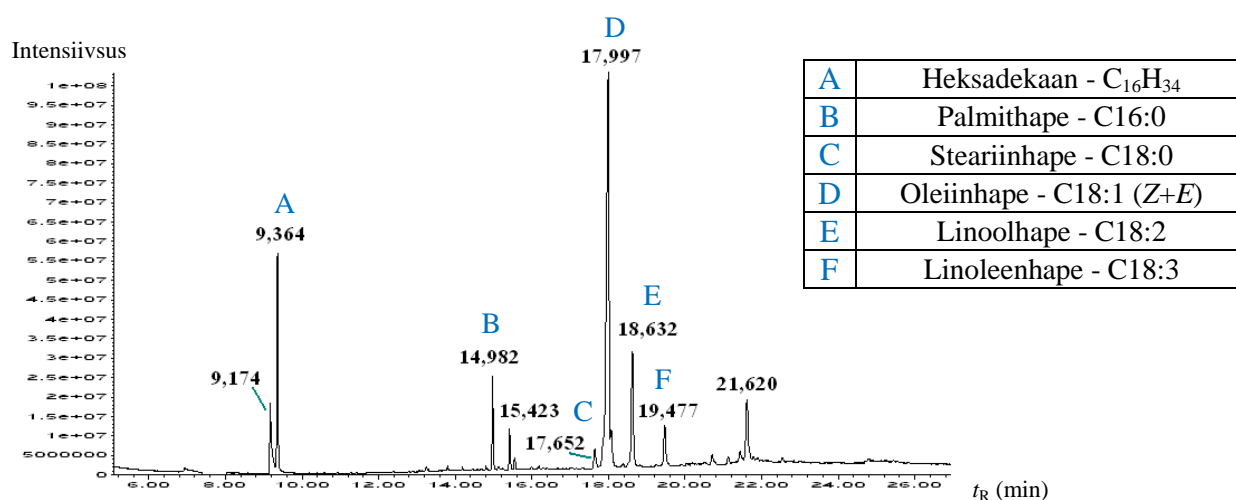
Kromatogrammide tabelites on toodud piikidele vastavate derivatiseerimata ühendite nimetused. BSTFA korral on märgitud sulgudesse, kas identifitseeriti etüleeritud (ET) või trimetüülsilüülitud (TMS) derivaat.



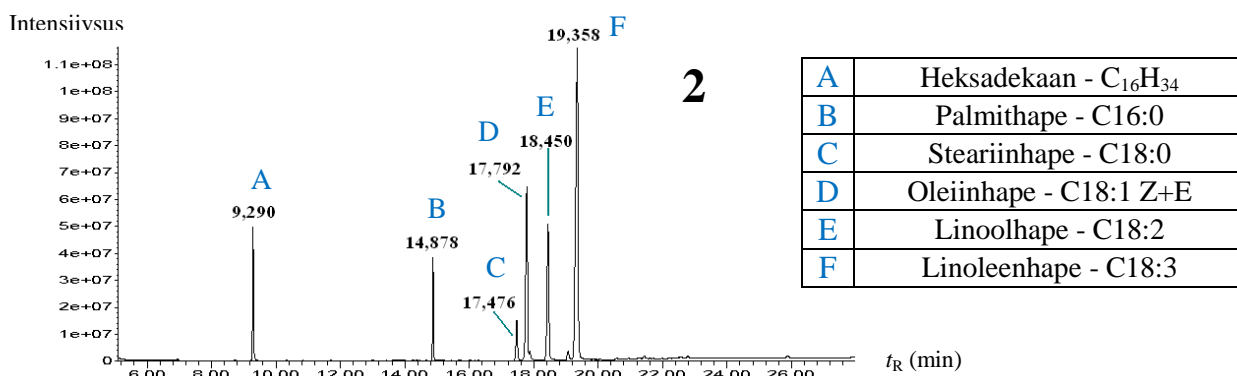
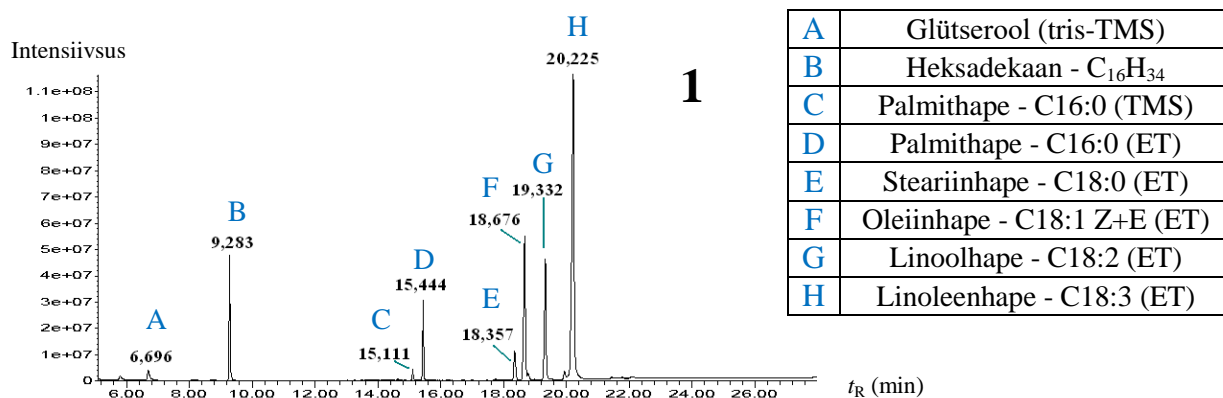
Joonis 17. Derivatiseeritud **kontrollproov** (triölide segu). BSTFA derivatiseerimine.



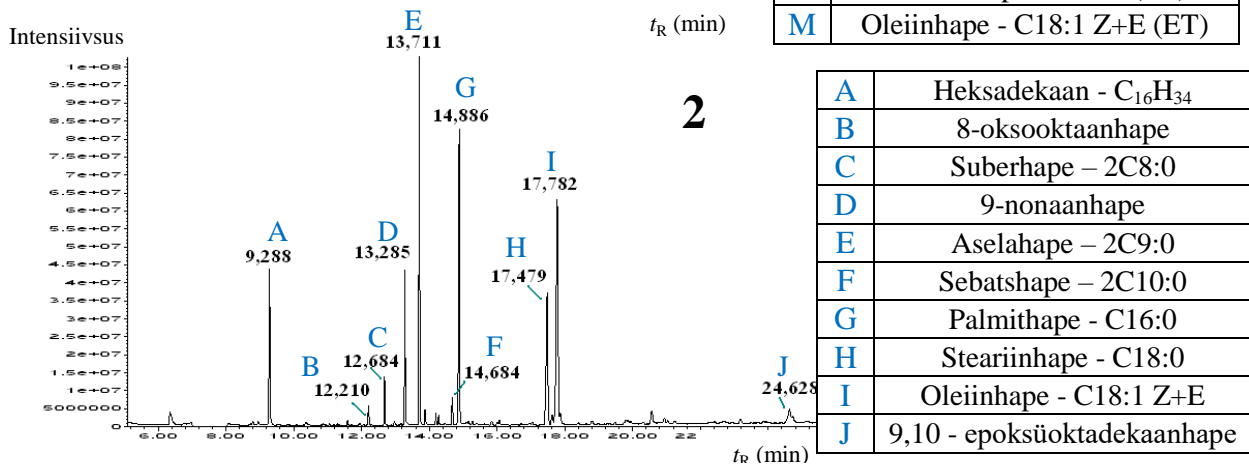
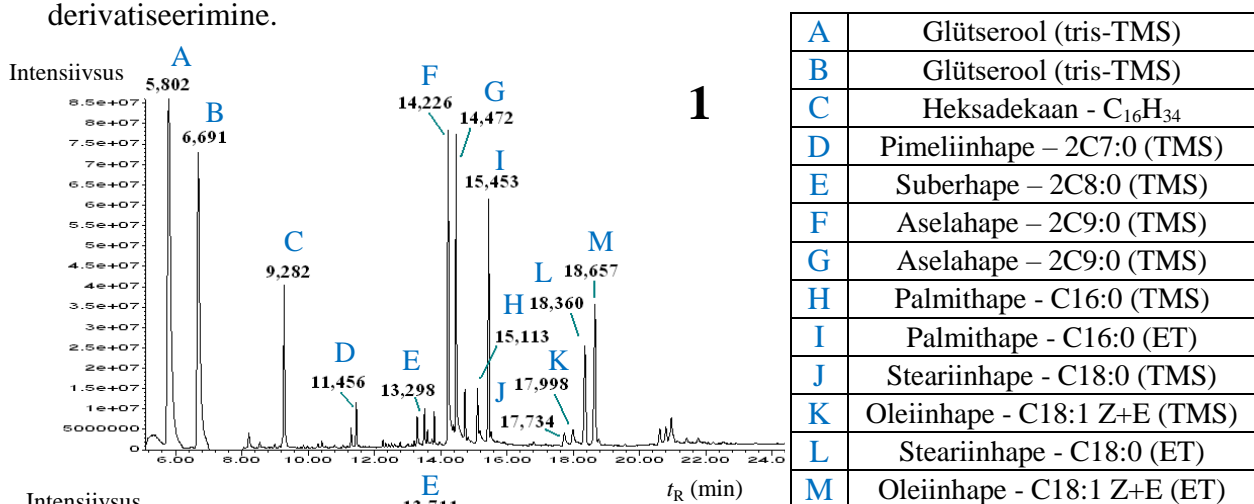
Joonis 18. Derivatiseeritud **rapsiõli**. BSTFA derivatiseerimine.



Joonis 19. Derivatiseeritud **rapsiõli**. Happekatalüütiline metüleerimine.



Joonis 20. Derivatiseeritud värske linaseemneõli. **1** – BSTFA derivatiseerimine. **2** – HAPE derivatiseerimine.



Joonis 21. Derivatiseeritud 16 kuud kuivanud linaseemneõli. **1** – BSTFA derivatiseerimine. **2** – TMTFTH derivatiseerimine. TMTFTH derivatiseerimise korral identifitseeriti ka pimeliinhappe piik, kuid see oli nii madal, et ei ole näha kromatogrammi pildi failina.

**LISA 5 -Värske ja 16 kuud kuivanud linaseemneõli kvantitatiivse analüüsi tulemused  
BSTFA, TMTFTH ja HAPE derivatiseerimistega**

Tabel 13. Derivatiseerimiseefektiivsused tripalmitiini ja trioleiini derivatiseerimistel (%). Arv GC-MS või GC-FID meetodi kohal näitab mitmenda korduskatsega oli tegemist.

Deriv. meetod	Rasvhape	1 GC-MS	2 GC-MS	3 GC-MS	4 GC-MS	1 GC-FID	2 GC-FID	3 GC-FID	4 GC-FID
BSTFA	C16:0	67,2	72,7	69,6	68,5	68,4	74,6	73,4	68,9
TMTFTH	C16:0	93,1	98,8	105,1	100,6	96,0	102,4	105,0	95,4
	C18:1	77,2	80,2	91,7	79,6	82,5	84,0	85,8	96,0
HAPE	C16:0	79,3	79,6	84,9	88,1	80,5	81,2	85,3	88,1
	C18:1	71,3	56,2	56,0	57,4	74,5	51,0	59,0	57,4

Tabel 14. Värske ja kuivanud linaseemneõli BSTFA derivatiseerimine tulemused. Arvutatud rasvhappe sisaldus **mmol/100 g** proovi kohta ja P/S väärtused (ühikuta).

Proov	Rasvhape	1 GC-MS	2 GC-MS	3 GC-MS	1 GC-FID	2 GC-FID	3 GC-FID
Värske õli	C16:0	15,3	15,2	14,8	15,3	15,5	15,2
	C18:0	8,9	9,1	9,1	9,5	9,5	9,4
	P/S	1,71	1,66	1,64	1,61	1,63	1,62
Kuiv õli	C16:0	9,7	9,9	11,2	10,7	10,5	11,8
	C18:0	5,3	5,4	6,1	5,7	5,7	6,3
	P/S	1,82	1,82	1,83	1,88	1,86	1,87

Tabel 15. Värske ja kuivanud linaseemneõli TMTFTH derivatiseerimise tulemused. Arvutatud rasvhappe sisaldus **mmol/100 g** proovi kohta ja P/S väärtused (ühikuta). Number „0” tähendab, et kvalitatiivselt ei olnud piik kromatogrammil määratav.

Proov	Rasvhape	1 GC-MS	2 GC-MS	3 GC-MS	1 GC-FID	2 GC-FID	3 GC-FID
Värske õli	C16:0	19,0	19,2	16,6	18,6	18,9	17,1
	C18:0	10,7	10,7	8,9	11,4	11,3	10,1
	C18:1	57,6	59,4	51,6	59,5	59,3	54,6
	C18:2	57,4	58,1	50,6	57,6	58,0	52,1
	C18:3	235,5	238,4	213,1	271,9	273,9	236,0
	P/S	1,77	1,79	1,86	1,64	1,66	1,68
Kuiv õli	C16:0	16,1	15,9	15,2	15,4	15,3	14,6
	C18:0	8,6	8,4	8,1	8,5	8,5	8,0
	C18:1	17,8	17,4	17,0	17,7	17,6	16,9
	C18:2	0	0	0	0	0	0
	C18:3	0	0	0	0	0	0
	P/S	1,87	1,89	1,91	1,81	1,81	1,82

Tabel 16. Värske ja kuivanud linaseemneõli HAPE derivatiseerimise tulemused. Arvutatud rasvhappe sisaldus **mmol**/100 g proovi kohta ja P/S väärtused (ühikuta). Number „0” tähendab, et kvalitatiivselt ei olnud piik kromatogrammil määratav.

Proov	Rasvhape	1	2	3	1	2	3
		GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-FID	GC-FID	GC-FID
Värske õli	C16:0	16,0	16,8	13,3	14,0	14,4	14,8
	C18:0	9,5	8,6	7,5	8,7	7,5	9,5
	C18:1	51,8	55,1	49,1	46,7	51,6	56,6
	C18:2	50,8	41,1	48,8	43,7	39,1	55,6
	C18:3	206,5	170,0	194,4	194,3	153,1	222,3
	P/S	1,68	1,96	1,80	1,61	1,91	1,56
Kuiv õli	C16:0	16,2	16,1	16,5	15,9	15,7	16,0
	C18:0	8,5	8,5	8,5	8,8	8,6	8,7
	C18:1	14,1	13,6	15,6	13,6	13,0	15,6
	C18:2	0	0	0	0	0	0
	C18:3	0	0	0	0	0	0
	P/S	1,90	1,91	1,93	1,81	1,82	1,83

Tabel 17. Värske linaseemneõli TMTFTH derivatiseerimise tulemused. Arvutatud rasvhappe sisaldus **g**/100 g kõikide kvantitatiivselt määratud rasvhapete suhtes.

Proov	Rasvhape	1	2	3	1	2	3	Kirjandus [6]
		GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-FID	GC-FID	GC-FID	
Värske õli	C16:0	4,6	4,6	4,5	4,1	4,1	4,3	4-10
	C18:0	2,9	2,8	2,7	2,8	2,8	2,8	2-8
	C18:1	15,4	15,6	15,4	14,4	14,3	15,0	10-24
	C18:2	15,2	15,2	15,0	13,9	13,9	14,2	12-19
	C18:3	61,9	61,8	62,5	64,9	65,0	63,8	48-60
	P/S	1,59	1,64	1,67	1,46	1,46	1,54	

Tabel 18. Värske linaseemneõli HAPE derivatiseerimise tulemused. Arvutatud rasvhappe sisaldus **g**/100 g kõikide kvantitatiivselt määratud rasvhapete suhtes.

Proov	Rasvhape	1	2	3	1	2	3	Kirjandus [6]
		GC-MS	GC-MS	GC-MS	GC-FID	GC-FID	GC-FID	
Värske õli	C16:0	4,4	5,3	3,9	4,2	5,0	3,8	4-10
	C18:0	2,9	3,0	2,4	2,9	2,9	2,7	2-8
	C18:1	15,7	19,2	15,9	15,4	19,7	16,0	20-14
	C18:2	15,3	14,2	15,7	14,3	14,8	15,6	12-19
	C18:3	61,7	58,3	62,1	63,1	57,6	61,9	48-60
	P/S	1,52	1,77	1,63	1,45	1,93	1,41	

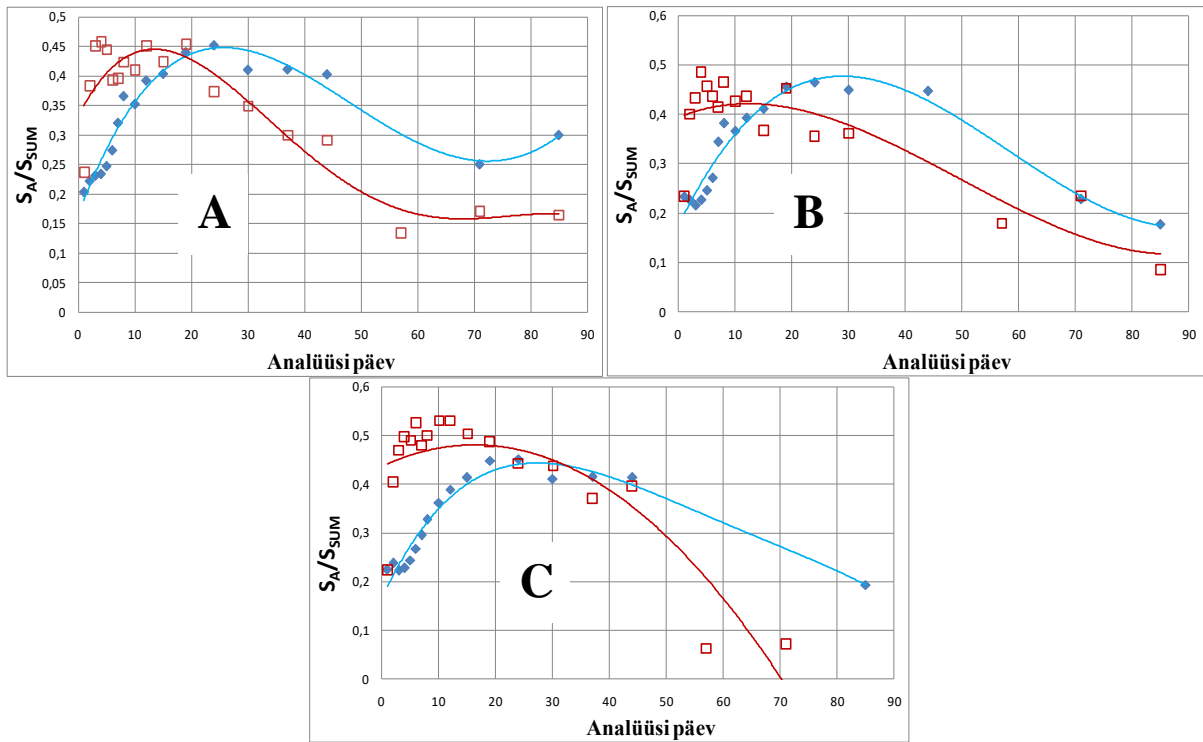
## LISA 6 – Vanandamisseriesia. Linaseemneõlis olevate ühendite identifitseerimine

Tabelis 19 on toodud kolme derivatiseerimismetoodikaga identifitseeritud ühendid. Arv(või arvude vahemik) näitab päeva, millest alates (mille jooksul) ühend proovis määrati. Tulemused on toodud nii toatemperatuuril hoitud kui ka 70 °C juures kuumutatud linaseemneõlile.

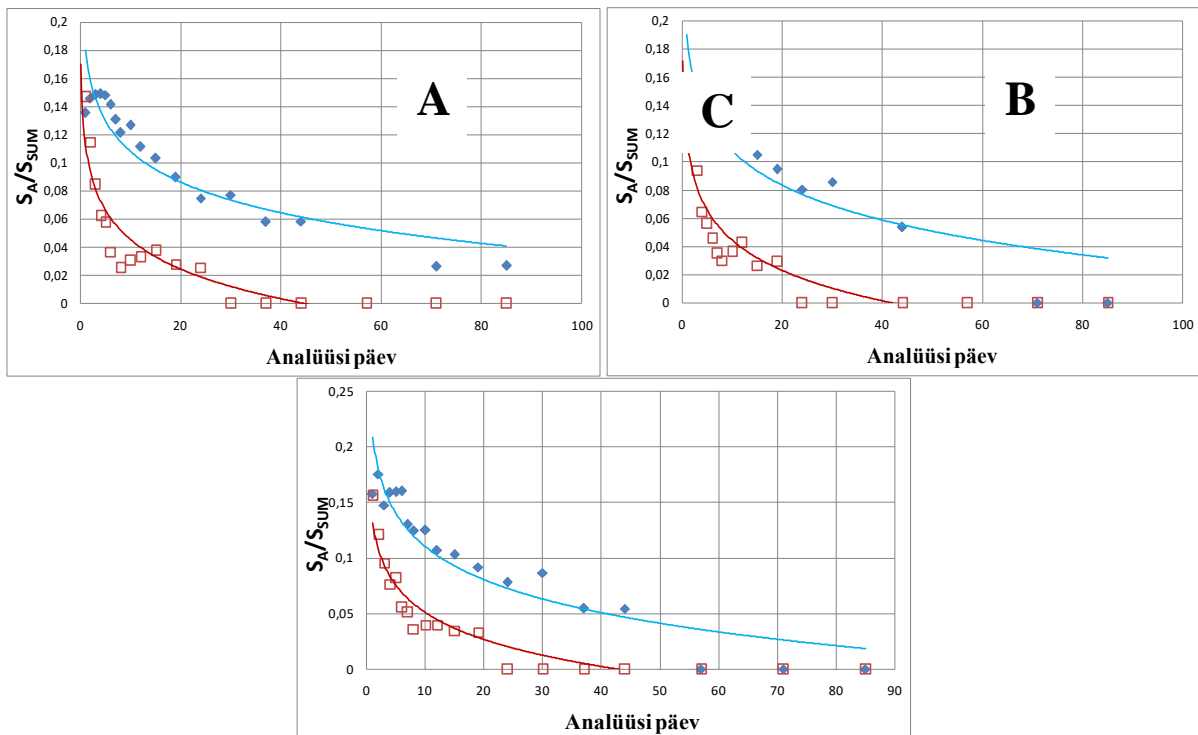
Tabel 19. Linaseemneõli vanandamisseriesias identifitseeritud ühendid.

Ühend	Derivatiseerimismeetod ja proov					
	TMTFTH 20°C	TMTFTH 70°C	HAPE 20°C	HAPE 70°C	BSTFA 20°C	BSTFA 70°C
<i>Adiphape</i> 1,6-heksaandihape	-	71	-	-	-	-
<i>Pimeliinhape</i> 1,7-heptaandihape	71	57	71	57	-	-
8-oksooktaanhape	30	10	12	12	-	-
<i>Suberhape</i> 1,8-oktaandihape	30	4	44	3	-	71
<i>Müristiinhape</i> tetradekaanhape	37	71	71	71	-	-
9-oksononaanhape	1	1	5	12	2-57	2-19
<i>Aselahape</i> 1,9-nonaandihape	1	1	1	1	19	10
9-oksodekaanhape	71	71	71	57	-	-
10-oksodekaanhape	71	85	12	-	-	-
<i>Sebatshape</i> 1,10-dekaandihape	44	10	44	3	-	-
14-metüülpentadekaanhape	-	-	-	-	71	57
<i>Palmithape</i> heksadekaanhape	1	1	1	1	1	1
1,11-undekaandihape	-	71	71	57	-	-
<i>Steariinhape</i> oktadekaanhape	1	1	1	1	1	1
<i>Oleiinhape (Z+E)</i> 9-oktadetseenhape	1	1	1	1	1	1
<i>Linoalhape</i> 9Z, 12Z-oktadekadienhape	1	1-19	1-44	1-19	1-44	1-19
9,10-dihüdrosüoktadekaanhape	-	71	-	-	-	-
<i>Linoleenhape</i> 9Z, 12Z, 15Z-oktadekatrienhape	1	1 – 19	1-44	1-19	1-44	1-19
6E,9E-oktadekadienhape	71	10	71	10	-	-
9,10-epoksüoktadekaanhape	37	8	-	-	-	-

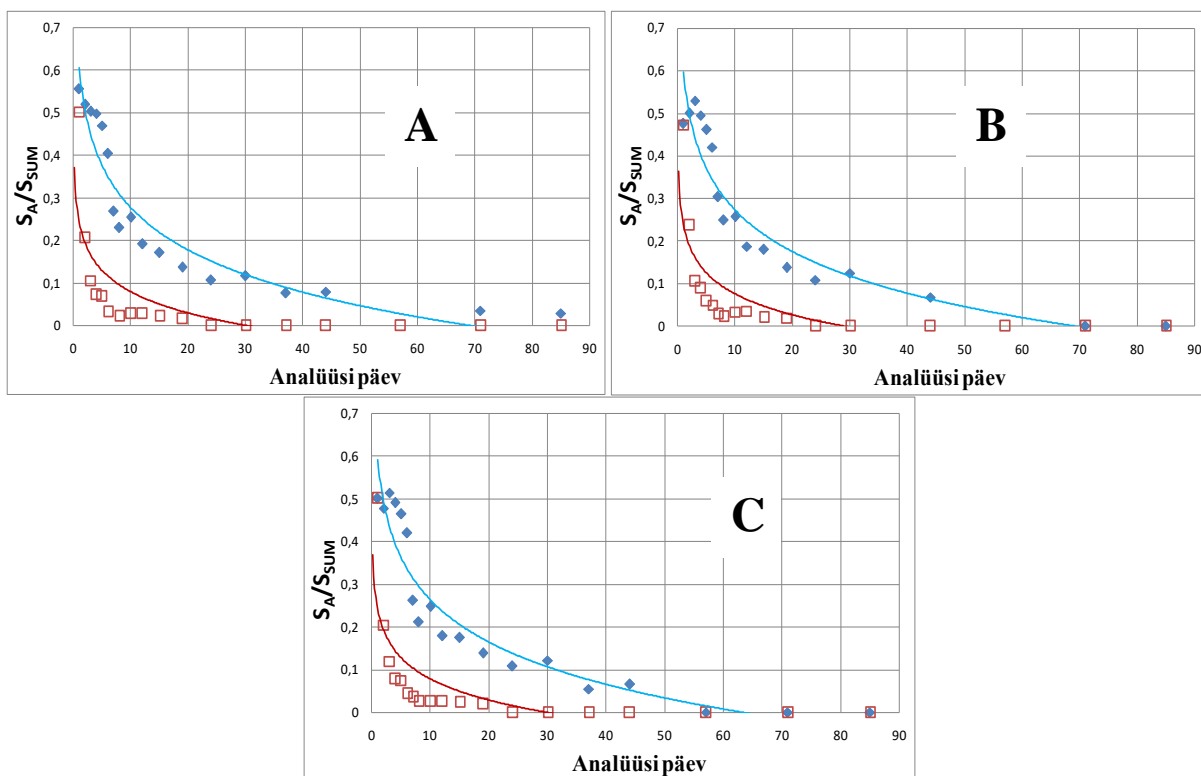
**LISA 7 - Vanandamisest tuletatud tulemuste. Rasvhapete sisalduste muutused erinevatel päevadel derivatiseeritud ja analüüsitud linaseemneõlis**



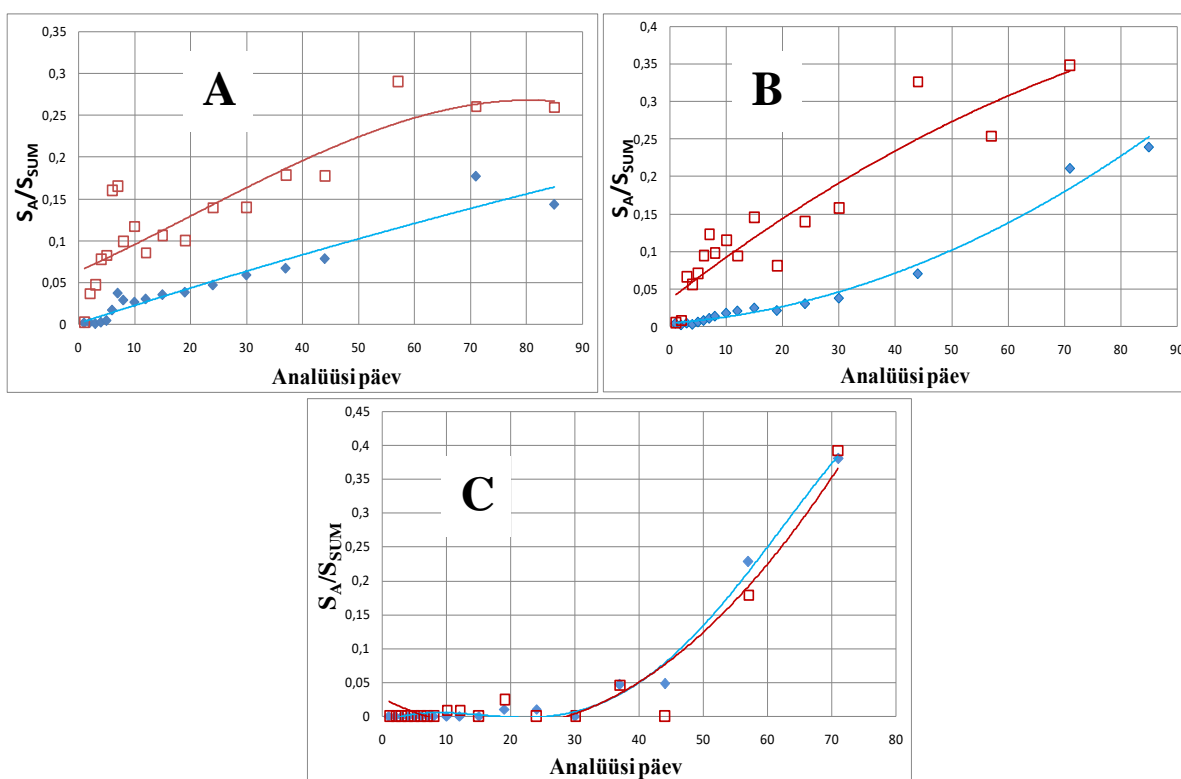
Joonis 22. Oleiinhappe C18:1 sisalduse muutus õli vananemise käigus. A – TMTFTH derivatiseerimine. B – HAPE derivatiseerimine. C – BSTFA derivatiseerimine. Sinine (♦) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.



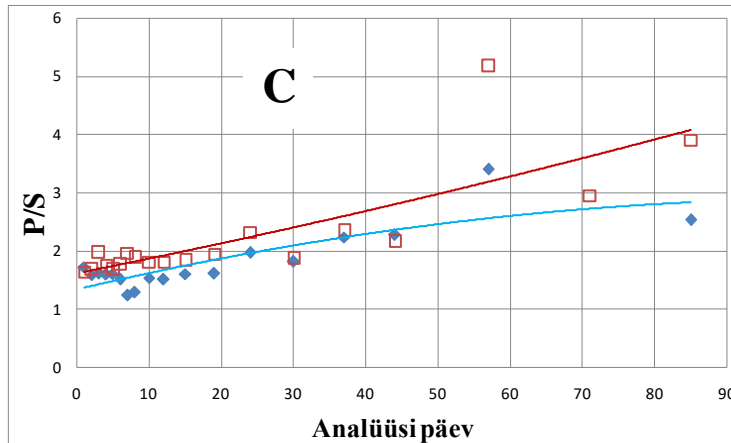
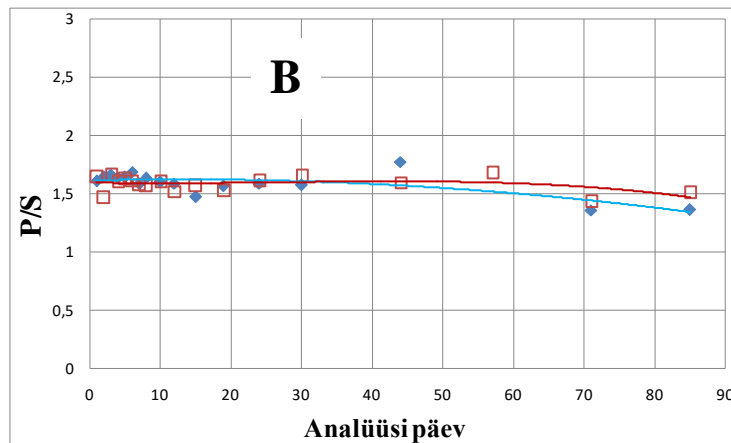
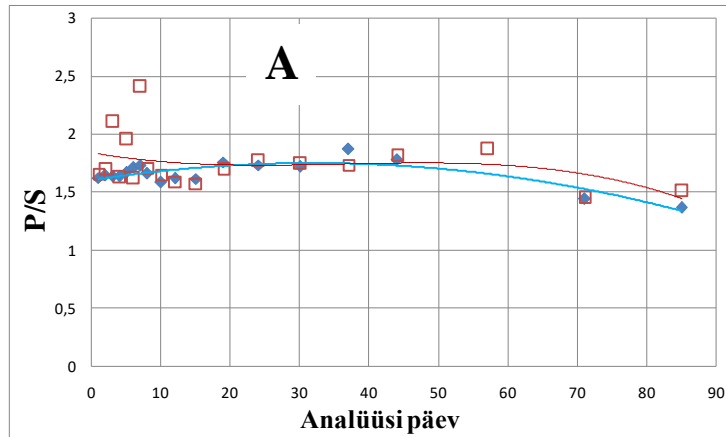
Joonis 23. Linoolhappe C18:2 sisalduse muutus õli vananemise käigus. A – TMTFTH derivatiseerimine. B – HAPE derivatiseerimine. C – BSTFA derivatiseerimine. Sinine (♦) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.



Joonis 24. **Linoleenhappe C18:3** sisalduse muutus õli vananemise käigus. **A** – TMTFTH derivatiseerimine. **B** – HAPE derivatiseerimine. **C** – BSTFA derivatiseerimine. Sinine (♦) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.



Joonis 25. **Aselahappe 2C9:0** sisalduse muutus õli vananemise käigus. **A** – TMTFTH derivatiseerimine. **B** – HAPE derivatiseerimine. **C** – BSTFA derivatiseerimine. Sinine (♦) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.



Joonis 26. **P/S** suhte väärtuse muutus õli vananemise käigus. **A** – **TMTFTH** derivatiseerimine. **B** – **HAPE** derivatiseerimine. **C** – **BSTFA** derivatiseerimine. Sinine (♦) kujutab toatemperatuuril olnud ja punane (□) 70 °C juures kuumutatud proovi tulemusi.

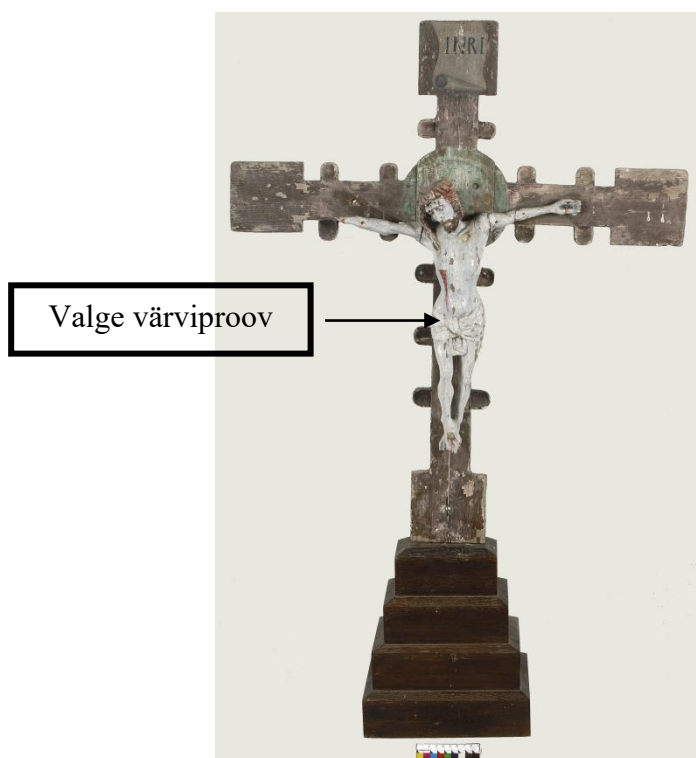
## LISA 8- Reaalsete proovide analüüs. Fotod analüüsitavatest objektidest

Nooltega on märgitud proovivõtukohtad.

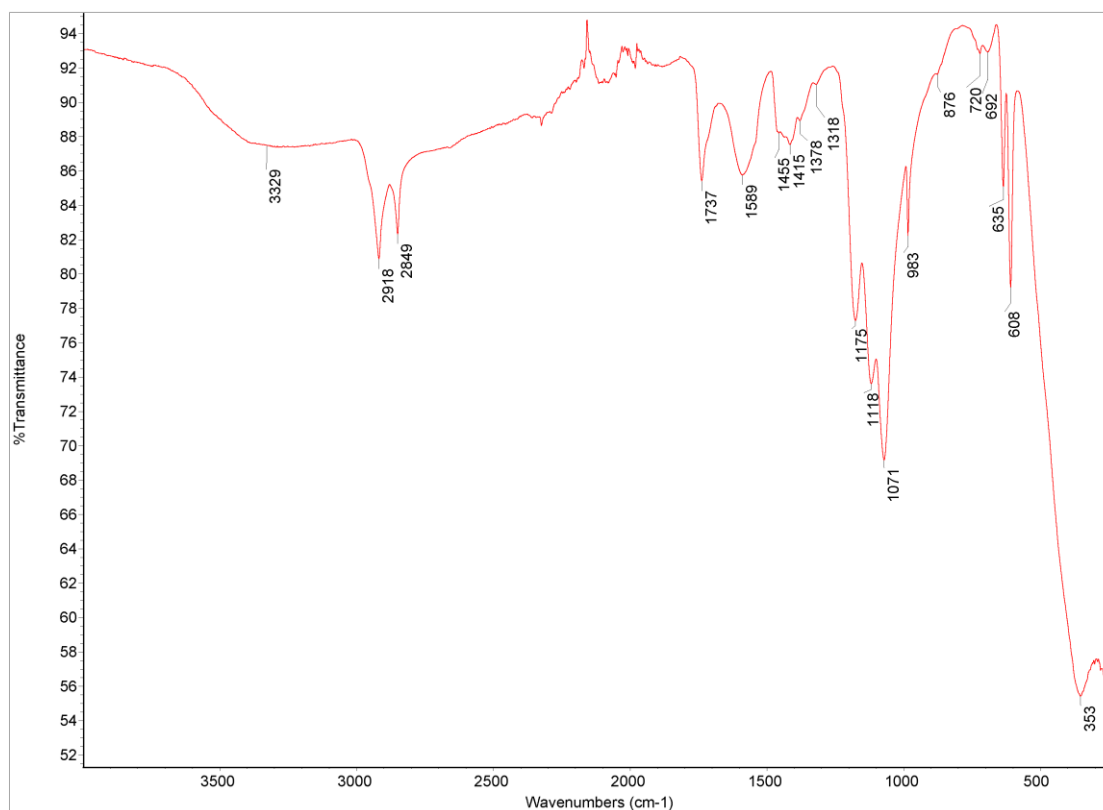
### Tundmatu autori maal



### Karja Katariina kiriku krutsifiks



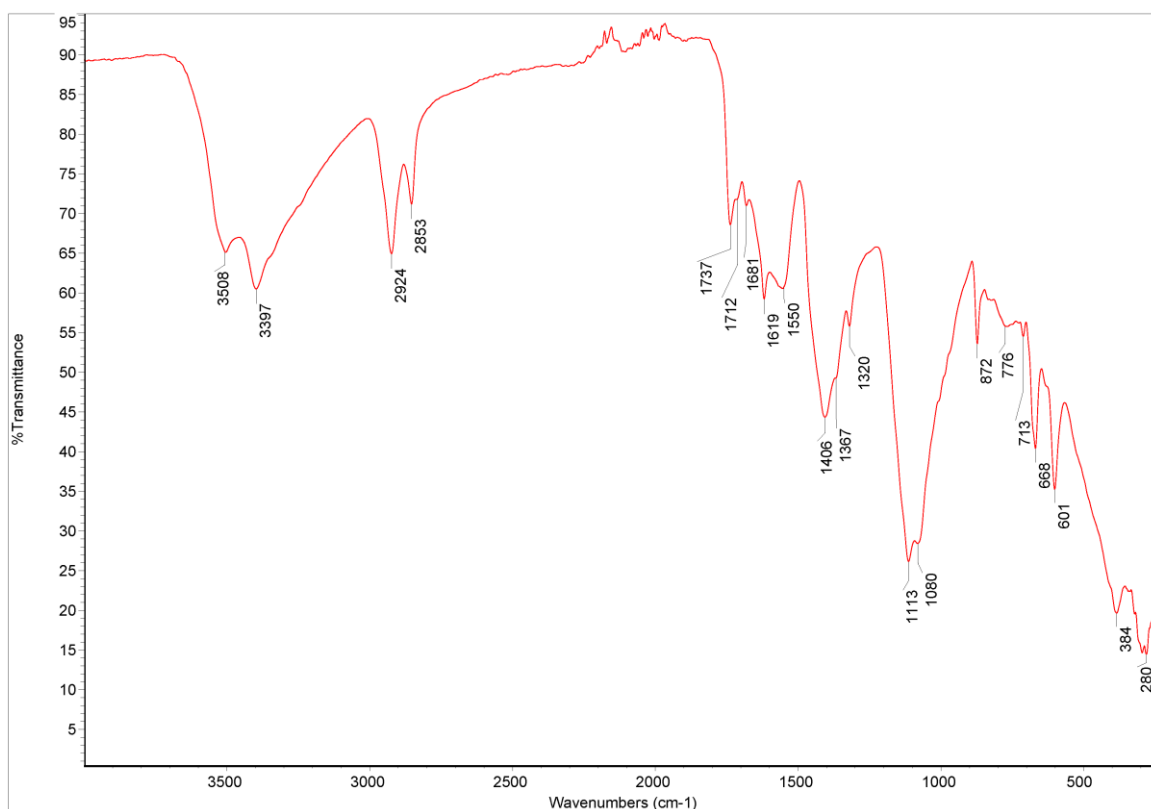
## LISA 9 - Reaalsete proovide analüüs. Maali tumerohelise värvi ATR-FT-IR spekter ja interpreteeringu tulemused



Lainearvud (cm <sup>-1</sup> )	Võnkumiste assigneering
3329	O-H valetsvõnkumine
2918, 2849	CH <sub>2</sub> fragmendi C-H asümmeetriline ja sümmeetriline valentsvõnkumine
1737	C=O valentsvõnkumine (ester)
1589	karboksülaadi asümmeetriline valentsvõnkumine
1455, 1415, 1378	C-H deformatsioonvõnkumised
1175, 1118, 1071, 983	Baariumsulfaadi SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> iooni S-O valentsvõnkumised
720	CH <sub>2</sub> rocking deformatsioonvõnkumine
625 608	Baariumsulfaadi SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> iooni S-O deformatsioonvõnkumised
353	Koobalrohelsele iseloomulikud neeldumised

Spektri interpreteerimise tulemusena leiti, et tumerohelises värviproovis oli täiteaineks BaSO<sub>4</sub>, pigmentiks koobalroheline CoO·nZnO (see on tehtud kindlaks varasemate pigmentiüuringute käigus) ja sideaineks estri-tüüpi aine. Sinisega on märgitud võnkumised, mille põhjal oletati, et proovis võib olla õli.

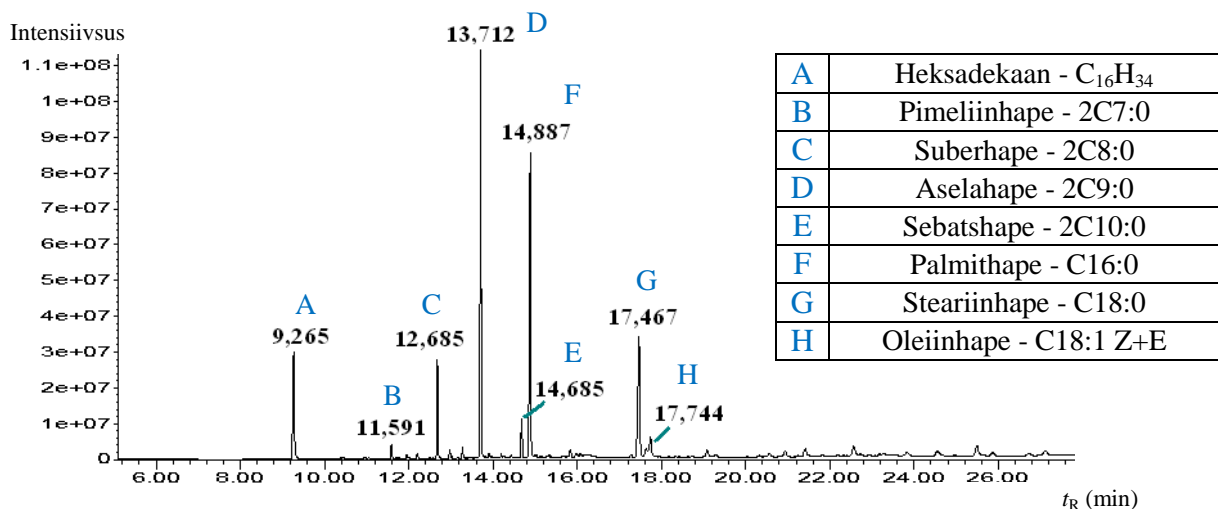
## LISA 10. Reaalsete proovide analüüs. Krutsifiksi valge värvi ATR-FT-IR spekter



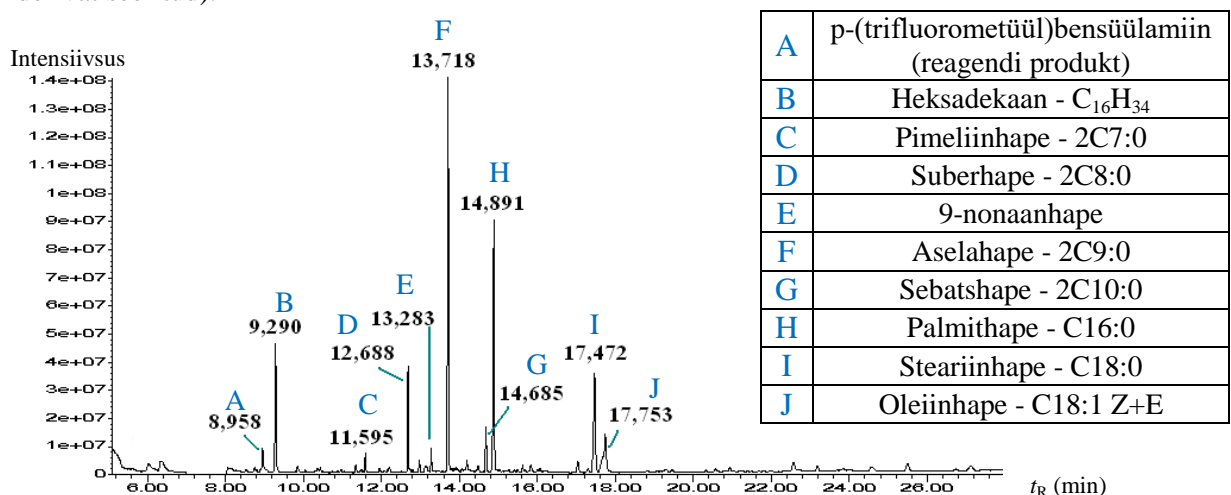
Lainearvud (cm <sup>-1</sup> )	Võnkumiste assigneering
3508, 3397	Kipsi O-H valentsvõnkumised
2924, 2853	CH <sub>2</sub> fragmendi C-H asümmeetriline ja sümmeetriline valentsvõnkumine
1737	C=O valentsvõnkumine (ester)
1712	C=O valentsvõnkumine (karbonüülrühm)
1681, 1619	Kipsi O-H deformatsioonvõnkumised
1550	karboksülaadi asümmeetriline valentsvõnkumine
1406	Kaltsiumkarbonaadi CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> iooni C-O valentsvõnkumine
1367, 1320	C-H deformatsioonvõnkumised
1200-1000	Kipsi SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> iooni S-O valentsvõnkumised
872	Kriidi CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> iooni C-O <i>out-of-plane</i> deformatsioonvõnkumine
713	Kriidi CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> iooni C-O <i>in-plane</i> deformatsioonvõnkumine
668, 601	Kipsi SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> iooni S-O deformatsioonvõnkumised
384	Tsinkvalge Zn-O neeldumine
280	Arvatavasti kipsile kuuluv neeldumine (interpreteeriti võrreldes referentspektriga)

Spektri interpreteerimise tulemusena leiti, et krutsifiksi valgesvärvi proovis oli täiteaineks kips (CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) ja kriit (CaCO<sub>3</sub>), pigmentiks tsinkvalge (ZnO) ja sideaineks estri-tüüpi aine. Sinisega on märgitud võnkumised, mille põhjal oletati, et proovis võib olla õli.

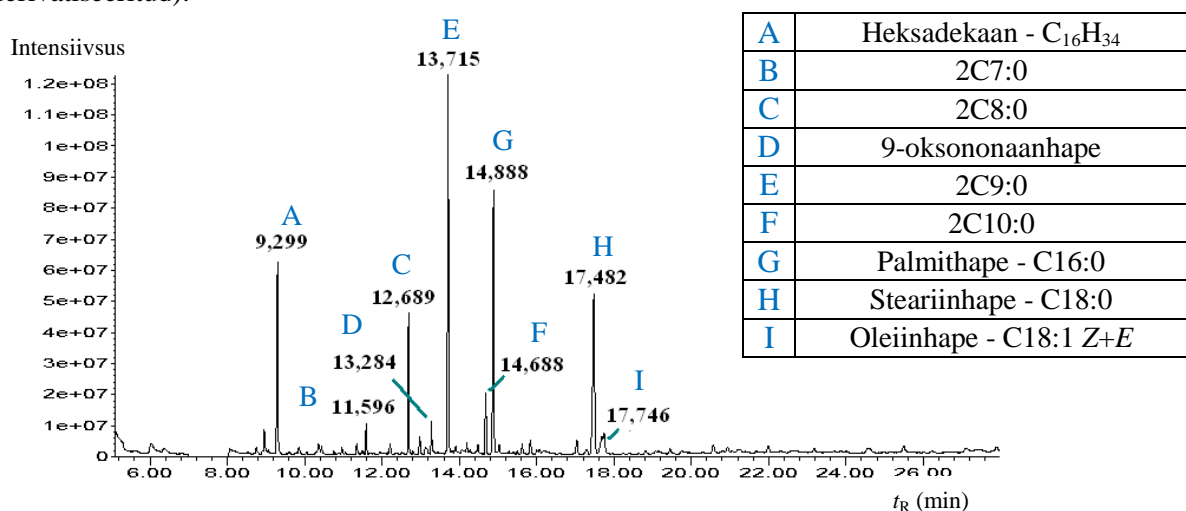
## LISA 11 - Reaalsete proovide analüüs. Maali tumerohelise värvi ja krutsifiksi valge värvi interpreteeritud kromatogrammid



Joonis 27. Tundmatult maalilt võetud tumerohelise värviproovi kromatogramm (HAPE derivatiseeritud).



Joonis 28. Tundmatult maalilt võetud tumerohelise värviproovi kromatogramm (TMTFTH derivatiseeritud).



Joonis 29. Karja krutsifiksi valge värviproovi kromatogramm (derivatiseeritud TMTFTH meetodil).

## INFOLEHT

### Õlivärvides sideaine määramine GC-MS meetodil

Käesolevas magistritöös töötati välja meetodikad õlivärvi sideaine analüüsimiseks GC-MS-iga. Proovi derivatiseerimiseks kasutati kolme meetodit (TMTFTH, NaOEt koos BSTFA-ga, happekatalüütiline metüleerimine), millele leiti derivatiseerimiseefektiivsused. Kvalitatiivses analüüsis viidi läbi linaseemneõli vanandamisseeria, kus leiti sobivaim derivatiseerimisreagent õli komponentide identifitseerimiseks nii värskes kui ka vananenud õlis. Töötati välja kvantitatiivse analüüsimeetodika õli peamiste rasvhapete sisalduste määramiseks ning loodi rutiinmeetod õlivärvide sideaine määramiseks. Meetodikaid kasutati reaalse värviproovide analüüsis. Käesolevas töös välja töötatud meetodikaid on tulevikus võimalik rakendada ka teiste traditsiooniliste õlide analüüsiks.

Märksõnad: õlivärv, sideaine, GC-MS, TMTFTH, BSTFA, happekatalüütiline metüleerimine

### Determination of binder in oil paints using GC-MS method

In this Master's thesis GC-MS methodology for the determination of binders in oil paints was developed. Three derivatization methods (TMTFTH, NaOEt with BSTFA, acid-catalysed methylation) were analysed and the efficiency of the derivatization was calculated. Experimental ageing sequence of linseed oil was conducted for the qualitative analysis. The best derivatization method for the identification of both fresh and aged oil components was determined. In quantitative analysis, methodology for the quantitative determination of fatty acids in oils was developed. From those results routine method was evolved for the analysis of binders in oil paint. The most efficient method was applied to real paint samples. The developed method can be modified and applied to the determination of other traditional oil binders.

Keywords: oil paint, binder, GC-MS, TMTFTH, BSTFA, acid-catalyzed methylation

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Eliise Tammekivi,

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

Õlivärvides sideaine määramine GC-MS meetodil,

mille juhendajateks on Signe Vahur ja Ott Kekišev.

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 **31.05.2020** 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, **22.05.2017**