TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Peep Põdder

NORMAALFAASKROMATOGRAAFIA JA MASSISPEKTROMEETRIA HÜBRIIDSÜSTEEMI KASUTATAVUSE HINDAMINE MÄNNIVAIGULISTE MATERJALIDE ANALÜÜSIMISEKS

Magistritöö keemias (30 EAP)

Juhendajad: teadur Anu Teearu-Ojakäär, PhD
teadur Signe Vahur, PhD

Tartu 2021

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID 3
1 SISSEJUHATUS 4
2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE 6
2.1 Männivaigulised materjalid 6
2.2 Männivaiguliste materjalide analüüsimine 7
2.3 Pöördfaas- ning normaalfaas-vedelikkromatograafia 8
2.4 Kõrglahutusega massispektromeetria (HR-MS) 10
2.5 HPLC ja FT-ICR-MS-i ühendamine 11
3 EKSPERIMENTAALNE OSA 12
3.1 Metoodika arenduseks kasutatavad materjalid ja kemikaalid 12
3.2 HPLC analüüs 12
3.2.1 Analüüsid RP-HPLC-ga 12
3.2.2 NP-HPLC metoodika arendus 13
3.3 Analüüsid FT-ICR-MS-iga 15
3.3.1 ESI-FT-ICR-MS mõõtmismetoodika väljatöötamine 15
3.4 NP-HPLC ning ESI-FT-ICR-MS instrumentide ühendamine 16
4 TULEMUSED JA ARUTELU 18
4.1 Analüüsid RP-HPLC-ga 18
4.2 NP-HPLC metoodika arendus 18
4.3 Referentsproovide analüüsimine ESI(+)-FT-ICR-MS-ga 21
4.4 Referentsproovide analüüsimine NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS-ga 25
4.5 Arheoloogilise proovi analüüsimine NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS meetodiga 29
4.6 Järeldused NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi võimekuse kohta männivaiguliste materjalide analüüsimisel 32
5 KOKKUVÕTE 34
6 SUMMARY 35
7 KASUTATUD KIRJANDUS 36
8 LISAD 40

KASUTATUD LÜHENDID

APCI *(Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)* - atmosfäärirõhuline keemiline ionisatsioon

DAD - Dioodrividetektor

DCM – Diklorometaan

ESI – Elektropihustusionisatsioon

EtOAc – Etüülatsetaat

FT-ICR-MS (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) – Fourier' teisendusega ioontsüklotronresonants-massispektromeetria

GC-MS – Gaasikromatograafia-massispektromeetria

Hex – Heksaan

HPLC – Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

HR-MS – Kõrglahutusega massispektromeetria

IPA – Isopropanool

MeCN – Atsetonitriil

MeOH – Metanool

MS – massispektromeetria

NP *(normal phase)* – normaalfaas

RP *(reversed phase)* – pöördfaas

IR – Infrapunaspektroskoopia

m/z – massi-laengu suhe

ppm (*parts per million*) – miljondik osa

t_R - retentsiooniaeg

Tol – Tolueen

UV-Vis – Ultraviolettkiirgus ja nähtav valgus

ω_c – Ringliikumise sagedus

1 SISSEJUHATUS

Erinevaid looduslikke materjale (vaigud, tõrvad, vahad, õlid, rasvad jne) on läbi ajaloo kasutatud nii kunstis kui ka tarbekasutuses. Vaigulistest materjalidest on varasematel aegadel Põhja-Euroopa aladel valdavalt kasutatud männivaigulisi materjale. Männivaiguliste materjalide alla liigituvad männivaik, männipuidust ja/või männivaigust töötlemise teel saadud kampol ning männitõrv.

Täpsem vaigulise materjali koostise kindlakstegemine võimaldab saada väärtuslikku informatsiooni kultuuriväärtuslike ja arheoloogiliste objektide valmistamismeetodite, päritolu, vanuse ning kasutamise kohta. Lisaks võimaldab materjali koostise teadmine sellist objekti paremini konserveerida või restaureerida.

Männivaiguliste materjalide analüüsimine on küllaltki keeruline, sest need koosnevad paljudest sarnase koostisega (nii struktuurilt kui brutovalemilt) orgaanilistest komponentidest. Selliste ühendite omavaheline eristamine on tihtipeale problemaatiline, kuid hädavajalik, saamaks informatsiooni materjali kohta. Lisaks sellele sõltub männivaigulise materjali koostis ka selle töötlemisprotsessidest ja materjali vananemisest (sõltub keskkonnast ning kui kaua on vananemine aset leidnud). Viimaks on arheoloogiliste ja kultuuriväärtuslike materjalide analüüsimisel tihtipeale probleemiks ka proovide väike kogus. Nende probleemide ning protsesside koosluse tõttu pole siiani täpselt teada paljude männivaiguliste materjalide kõik koostiskomponendid.

Seetõttu peab keerukate materjalide analüüsimiseks valima meetodid, mis võimaldavad töötada väikeste proovikogustega ning samas annavad korraga palju informatsiooni materjalide koostise kohta. Üks väga võimekas instrument, mis vastab nendele nõudmistele, on Fourier' teisendusega ioontsüklotronresonants massispektromeeter (FT-ICR-MS). FT-ICR-MS on hea tundlikkuse, kõrge lahutusvõime ning massitäpsusega. Need eelised lihtsustavad oluliselt komponentide tuvastamist.

Männivaiguliste materjalide koostise analüüsimisel võib ainult FT-ICR-MS-ist siiski väheks jääda, sest sellega on võimalik eristada vaid erineva massi ja laengu (*m/z*) suhtega piike. See võib tekitada olukorra, kus sama brutovalemit omavad, kuid erineva struktuuriga ühendid, annavad kattuvaid piike (omavad sama ioonvalemit ehk *m/z* väärtust) ning ühe piigi jaoks võib seega olla mitu võimalikku vastet. Seeläbi seistakse taas silmitsi komponentide tuvastamise probleemiga. Seetõttu oleks mõistlik esmalt lahutada komponendid kromatograafilise meetodi abil ning seejärel analüüsida neid FT-ICR-MS-iga.

Tänapäeval on üks populaarsemaid meetodeid segude komponentideks eraldamiseks pöördfaas (*reversed phase* - RP)-kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC). Männivaiguliste materjalide puhul on aga probleemiks nende vähene lahustuvus tüüpilistes RP-HPLC solventides (näiteks metanool ja vesi) ning nende komponentide tugevad interaktsioonid pöördfaaskolonniga. Küll aga on võimalik selle probleemi lahendamiseks rakendada vähe kasutatud normaalfaas-vedelikkromatograafiat (NP-HPLC). NP-HPLC võimaldab kasutada vähem polaarseid solvente, mis sobivad paremini männivaiguliste proovide lahustamiseks. See võimaldab analüüsida proovis sisalduvaid komponente, mis RP-HPLC puhul jäävad proovi lahustumatusse osasse.

NP-HPLC ning FT-ICR-MS instrumentide ühendamine võimaldab lahutada komponente ajaliselt ja vaadelda eraldi igale kromatograafilise piigile vastavat massispektrit. Selliste massispektrite interperteerimine on oluliselt lihtsam, sest igas massispektris esineb vähem üksteist segavaid piike (võrreldes vaid FT-ICR-MS-iga mõõdetud spektriga), mis võimaldab omakorda täpsemat interperteerimist. Samuti on võimalus, et paremini tõuseb esile mõni oluline komponent, mis vaid FT-ICR-MS-iga mõõdetud spektris jääb teiste komponentide piikide varju.

Käesoleva töö eesmärgiks on kombineerida NP-HPLC ja ESI(+)-FT-ICR-MS süsteemiks, mis võimaldab analüüsida keerulise koostisega männivaigulisi materjale. Eesmärgi täitmiseks oli vaja:

1) töötada välja NP-HPLC mõõtmismetoodikad erinevate männivaiguliste materjalide analüüsimiseks;
2) töötada välja lahendus NP-HPLC ühendamiseks ESI-FT-ICR-MS-iga;
3) testida ühendatud NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi referentsproovidel (abietiinhape, hele kampol, männivaik, männitõrv) ja leida neile sobivad parameetrite komplektid;
4) rakendada NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi arheoloogilise proovi analüüsimiseks.

2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Männivaigulised materjalid

Arheoloogilised leiud tõendavad, et looduslikku männivaiku ning -tõrva on kasutatud aastatuhandeid nii igapäevaste tarbeesemete kui ka kunstiobjektide valmistamisel. Männivaik ja sellest toodetud kampol on leidnud kasutust näiteks liimide, värvide ning sideainete koostisosana. Männitõrva on aga läbi aegade kasutatud materjalide veekindluse tagamiseks ning samuti rahvameditsiinis antiseptikuna. [1]

Männivaik on õlides ja orgaanilistes solventides lahustuv lenduvate ning mitte lenduvate terpenoidide ja sekundaarsete fenoolsete ühendite segu, mis eritub männipuu pinnal või selle sisemuses. Peamine viis männivaigu saamiseks on lõigata ära osa puu tüve korbast (surnud taimerakkudest koosnev kattekude) ehk teisisõnu lõigata puu tüve pinnale sisselõige (karr) ning koguda sellest vaiku. Sellist protsessi nimetatakse vaigutamiseks. Kampol on männivaigust valmistatud materjal, mida saadakse männivaigu destilleerimise käigus (eraldub tärpentiin). Männitõrv on männipuidu või -vaigu kontrollitud temperatuuril ning vähese õhu ligipääsuga põletamise (pürolüüsi) saadus.

Männivaik, kampol ning männitõrv on keemiliselt keerukad ning muutuvad aja jooksul oksüdeerumis- ning polümerisatsiooni protsesside tõttu. Antud materjalide koostise uurimisel on väljakutseks märkimisväärselt suur varieeruvus nende päritolus ning vanuses. [1-3] Peamiselt leiduvad männivaigu ja sellest valmistatud materjalide koostises diterpenoidid (va tärpentin, mis koosneb peamiselt monoterpenoididest). Terpenoidid on keemiliste protsesside käigus muundunud terpeenid, mis omakorda on moodustunud isopreeni (C_5H_8) molekulidest. Diterpenoidid koosnevad neljast isopreeni molekulist. Lisaks sisaldavad enamik värskeid vaike sh männivaik ka lenduvaid mono- ja/või seskviterpenoide (moodustunud vastavalt kahest ja kolmest isopreeni ühikust), mis aja jooksul või töötlemise käigus vaigust eralduvad. [1,4]

Kui nüüd veidi täpsemalt kirjeldada, siis kirjanduse põhjal männivaik koosneb keskmiselt 25% ulatuses lenduvatest monoterpenoididest (näiteks α-pineen) ning 75% ulatuses mittelenduvatest diterpenoidididest. Viimased omavad männivaigus abietaani algstruktuuri (Lisa 1, Joonis 1). Värske männivaigu mittelenduvas osas leidub peamiselt konjugeeritud kaksiksidemetega abietiinhape ja pimaarhape ning nende erinevad derivaadid (Lisa 1). [3-5] Kampol koosneb peaaegu täielikult abietiinhappe struktuuriga ühenditest. [4, 6]

Männitõrv on omadustelt ning koostiselt üsnagi sarnane männivaigule, kuid see on kleepuvam ning üldiselt ka suurema tihedusega. Männitõrv sisaldab samuti diterpenoide, kuid lisaks ka erinevaid pürolüüsi produkte nagu näiteks aromaatseid süsivesinikke, samuti fenoolseid

ühendeid. Täpsemalt tekivad kõrgel temperatuuril kuumutamise käigus diterpenoididest erinevad madalama molekulmassiga ühendid, mis sisaldavad oluliselt rohkem aromaatseid tsükleid, lisaks toimuvad erinevad dehüdrogeenimise, demetüleerumise ja dekarboksüleerumise protsessid (Lisa 1).

Männitõrva destilleerimisprotsessi stabiilseks produktiks on reteen ning vaheproduktidena võib leiduda ka norabietatrieeni. Pürolüüsi käigus moodustuva metanooliga reageerides tekib tõrvas ka metüüldehüdroabietaat, mida peetakse üheks peamiseks männitõrva biomarkeriks (looduslikult esinev ühend, mille põhjal on võimalik tuvastada materjali). [1-2, 6-7]

Männivaiguliste materjalide vananemise käigus on abietiinhape ning selle derivaadid altid oksüdeeruma. Vananedes kasvab dehüdroabietiinhappe osakaal männivaigus ja kampolis, mis aja möödudes oksüdeerub edasi (esmalt 7-oksodehüdroabietiinhappeks ning siis 15-hüdroksü-7-oksodehüdroabietiinhappeks, vt Lisa 1). [8]

2.2 Männivaiguliste materjalide analüüsimine

Männivaigulisi materjale on analüüsitud mitmete erinevate spektroskoopiliste, kromatograafiliste ja massispektromeetrilse meetoditega. Üldisemat informatsiooni neis sisalduvate ühendite klasside kohta on võimalik saada infrapunaspektroskoopiaga (IR) ja Raman spektroskoopia abil. IR ja Raman spektroskoopia võimaldavad saada informatsiooni funktsionaalrühmade ning kindlat tüüpi sidemete võngete kohta. See võimaldab eristada erinevaid materjalide tüüpe, kuid nende tuvastamine, eriti segudes ja vananenud proovides, on keeruline. IR ja Raman spektroskoopiat on kasutatud peamiselt esmase informatsiooni saamiseks ning materjalide vanaemise jälgimiseks. [8-12]

Üks laialdaselt kasutust leidnud meetod on gaasikromatograafia koos massispektromeetriaga (GC-MS). GC-MS-iga saab lahutada, identifitseerida ning kvantiseerida terpeenide ning terpenoidide segusid, mis võimaldab leida uuritavale proovile iseloomulikke ühendeid ehk biomarkereid. Seeläbi saab tuvastada millisest allikast uuritav tõrva sisaldav või vaiguline materjal pärineb. GC-MS meetodil on eraldatud ning tuvastatud vaigulisi komponente värviproovides, liimides ning veekindlates materjalides. [13-16] Küll aga esineb GC-MS-i puhul teatavaid puuduseid. Vähesed looduslikud terpeenid/terpenoidid segud on kommertsiaalselt kättesaadavad, mis tähendab, et nende interpreteerimisel tuleb toetuda peamiselt MS-ist saadud andmetele. Samuti on problemaatiline prooviettevalmistus, mis hõlmab tavaliselt ekstraheerimist ja ka proovi derivatiseerimist. Kultuuriväärtuslikelt objektidelt pärinevad proovid on tihti ulatuslikult polümeriseerunud, tulenevalt millest on neid keeruline viia gaasifaasi isegi derivatiseerimise abil. Seetõttu on kultuuriväärtuslike proovide

analüüsimisel kasutatud palju ka pürolüüseriga GC-MS-i, kuid sellega kaasneb veelgi ulatuslikum fragmenteerumine, mis muudab komponentide tuvastamise ülimalt keeruliseks. [1,12]

Vaikude analüüsimiseks on kasutatud ka kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (HPLC) ja massispektromeetrilisi tehnikaid (nagu kõrglahutusega massispektromeetriat (HR-MS)). Alljärgnevalt kirjeldatakse neid tehnikaid veidi pikemalt.

2.3 Pöördfaas- ning normaalfaas-vedelikkromatograafia

Kromatograafia on meetod segudest komponentide eraldamiseks ja komponentide eraldamine toimub nende jaotumisel mobiilse faasi ja statsionaarse faasi vahel. HPLC puhul on mobiilseks faasiks vedelik (ehk eluent), mis liigub kõrge rõhu all (kuni 400 bar) läbi kolonni, mis on tihedalt täidetud statsionaarse faasiga (spetsiaalne aine). Proov süstitakse mobiilsesse faasi, mis kannab selle läbi kolonni kuni detektorini. Proovis sisalduvad ühendid seostuvad erineval määral statsionaarse faasiga ning jõuavad seega detektorini erinevatel aegadel. [17]

Sõltuvalt statsionaarse faasi polaarsusest saab HPLC-s kasutatavad kolonnid jaotada pöörd- ning normaalfaaskolonnideks. Tänapäeval on kasutusel ka eriotstarbelised kolonnid, näiteks ioonkromatograafia ning suuruseralduskromatograafia kolonnid.

Pöördfaas-vedelikkromatograafia (RP-HPLC) puhul on statsionaarne faas vähem polaarne kui mobiilne faas. Tüüpiliseks kolonni täiteks on näiteks C_8 või C_{18} (vastavalt oktüülsilaan ja oktadetsüülsilaan) rühmadega kaetud silikaosakesed. Mobiilse faasina on RP-HPLC-s kasutusel polaarsed solvendid, kõige tavalisemalt kombinatsioon veest ning metanoolist või atsetonitriilist. Harvemini on kasutusel ka teised orgaanilised solvendid nagu tetrahüdrofuraan. Üldiselt sobib pöördfaaskromatograafia paremini polaarsete ning neutraalsete (ehk laenguta) proovide kromatograafiliseks lahutamiseks. Tüüpilisteks proovideks on näiteks peptiidid, aminohapped ning vees lahustuvad vitamiinid. Üheks probleemiks RP-HPLC puhul võib osutuda väga mitte-polaarsete ja/või mõõdukalt hüdrofoobsete ühendite tugev seostumine statsionaarse faasiga [12]. RP-HPLC on kasutatud ka vaiguliste materjalide analüüsimisel, millega on suudetud eristada omavahel erinevaid diterpenoidseid vaike (näiteks kampol ja sandarakkvaik) ning nende oksüdatsiooni produkte vananenud lakis, looduslikke vaike sisaldavates kosmeetikatoodetes ning taruvaigu tinktuuris. [18-22] RP-HPLC kaustamisel vaikude ning eriti tõrvade analüüsimiseks on peamiseks probleemiks nende vähene lahustuvus tüüpilistes RP-HPLC solventides (vesi, metanool). Samuti seostuvad vaigulistes materjalides (eriti tõrvas) leiduvad mitte-polaarsed ühendid tugevamini pöördfaaskolonnide statsionaarse

faasiga, mis tingib pika kromatograafilise jooksu. Selliste proovide puhul oleks hoopis sobilikum kasutada normaalfaas vedelikkromatograafiat (NP-HPLC).

NP-HPLC puhul on statsionaarne faas polaarne ning mobiilne faas vähem polaarne. Mobiilse faasina on NP-HPLC-s kasutusel näiteks n-heksaan, n-heptaan, dikloрometaan, dietüüleeter, metüülatsetaat, etüülatsetaat, atsetoon, isopropanool või metanool. Tüüpiline normaalfaas-kromatograafia statsionaarne faas on silikageel, kuid on välja töötatud ka tsüano-, diool- ning aminokolonnid. Viimane on kasutusel ka käesolevas töös. Aminokolonni puhul on silikageelile seotud aminopropüül funktsionaalsed rühmad. Üldiselt on aminokolonni puhul retentsiooniajad arvestatavalt lühemad võrreldes populaarsemate silikageel-täidisega kolonnidega. Lisaks on aminokolonni võimalik kasutada ka mittevesikeskonnas pöördfaas-kromatograafias (NARP-HPLC). Samuti kannatavad uuema aja aminokolonnid vähesel määral vett, mis laiendab veelgi sellise kolonni kasutusvõimalusi. [17]

NP-HPLC peamiseks rakendusalaks tänapäeval on vees lahustumatute proovide analüüsimine (näiteks naftasaaduste jms eristamine). Lisaks sellele leiab NP-HPLC kasutust ka väga mitte-polaarsete komponentide ning mittekiraalsete isomeeride lahutamisel, milleks RP-HPLC ei ole võimeline. NP-HPLC kasutamisel RP-HPLC asemel on võimalik vältida väga mitte-polaarsete ühendite liialt tugevat seostumist statsionaarse faasiga. Seega võimaldab NP-HPLC kasutamine hoida selliste ühendite analüüsi käigus kromatograafilise jooksu aja lühema (ning kolonni puhtamana). [12,17]

NP-HPLC võiks olla ka sobiv männitõrva ja -vaigu mitte-polaarsete komponentide lahutamiseks võimaldades kasutada selliseid solvente (nt dikloрometaan, heksaan, etüülatsetaat, etüüleeter jne), mis sobivad paremini vaikude ning tõrvade lahustamiseks (eriti vananenud materjalide jaoks). Huvitaval kombel looduslike vaikude ning tõrvade uurimiseks on NP-HPLC leidnud vähe kasutust. On üksikuid uuringuid, kus NP-HPLC on rakendatud näiteks männikoores leiduvate fenoolsete ühendite tuvastamiseks ja polütsükliliste aromaatsete süsivesinike (PAH) analüüsimisel, mis sarnanevad struktuurilt ja omadustelt männitõrvas leiduvatele ühenditele (Lisa 1). [23-24]

Et saada rohkem informatsiooni proovi koostise kohta, siis vedelikkromatograafiat on tihti kasutad koos massispektromeetrilise meetoditega, näiteks kõrgefektiivne vedelikkromatograafia tandem massispektromeetria (HPLC-MS/MS) meetodina. Sellega on uuritud arheoloogilisi materjale, kus tänu eelnevale lahutusele HPLC-s suudeti tuvastada proovides sisalduv vaik ja ka täpne männipuu liik. [25]

2.4 Kõrglahutusega massispektromeetria (HR-MS)

Käesolevas töös kasutataske sellist HR-MS seadet nagu Fourier' teisendusega ioontsüklotronresonants massispektromeetrit (FT-ICR-MS) ning siin peatükis keskendutakse ainult sellele tehnikale. FT-ICR-MS instrument on väga kõrge resolutsiooni (üldiselt 100 000) ning massi-laengu (*m/z*) täpsususega (tavaliselt alla 2 ppm). Seetõttu on FT-ICR-MS-i kasutades võimalik eristada väga sarnaste *m/z* väärtustega ühendeid. Samuti on FT-ICR-MS väga kõrge tundlikkusega, võimaldades ideaaltingimustes analüüsida väga lahjasi lahuseid (mõned kümned μg/mL). Nende omaduste tõttu on FT-ICR-MS sobilik instrument vaiguliste materjalide ning neid sisaldavet arheoloogiliste proovide uurimiseks.

FT-ICR-MS-is eraldatakse erineva massi ja laengu (*m/z*) suhtega ioonid üksteises ülitugevas magnetväljas. Selleks kantakse tekitatud ioonid kõrgvaakumi all (10^{-10} mbar) olevasse ülijuhtmagnetis asuvasse mõõterakku. Ioonide detekteerimine ICR rakus põhineb nende ringorbiidilisel liikumisel magnetväljas ning nende ringliikumise sageduse ω_c mõõtmisel. ICR rakus on magnetvälja tugevus konstantne ning seega iooni ringliikumise sagedus on määratud vaid tema *m/z* suhtega. Tsüklotroonivad ioonid mööduvad perioodiliselt elektriliselt ühendatud mõõteplaatidest, mõjutades neil asuvaid vabu elektrone. Voolu muutumist ajas mõõdetakse ning rakendades saadud ajadomeeni funktsioonile Fourier'i teisendust saadakse sagedusest sõltuv intensiivsuse spekter. [26-27]

FT-ICR-MS süsteemis kasutatakse tihti välist ioonallikat (näiteks ESI või abimaatriksiga laserdesorptsioon-ionisatsioon - MALDI), et uuritavas proovis sisalduvad ühendid ioniseerida. Antud töös kasutati ESI allikat. Selle tööpõhimõte seisneb lahuse surumises läbi pinge all oleva kapillaari (näiteks roostevabast terasest süstlanõela). Kapillaarist lahkudes moodustab lahus peene udu, mille tilgad on elektriliselt laetud. Solvent aurustub järk-järgult kuumas kuivatava gaasi (tavaliselt N_2) voolus kuni moodustuvad gaasifaasis ioonid. Suur pinge (0.5 – 5 kV) kapillaaril kiirendab ioonid massianalüsaatori sisendi suunas.

Kapillaarile on võimalik rakendada nii positiivset kui ka negatiivset pinget, et saada vastavalt positiivseid või negatiivseid ioone. ESI allikas võimaldab analüüsida nii suure molekulmassiga biomolekule kui ka väikse molekulmassiga orgaanilisi ühendeid olulise fragmenteerumiseta ning seda kasutatakse tihti peptiidide, proteiinide, desoksüribonukleiinhappe (DNA), lipiidide, süsivesikute, ravimi komponentide, sünteetiliste polümeeride ning toornafta polaarsete fraktsioonide analüüsimisel. [26-28] Lisaks sellele on FT-ICR-MS-iga suudetud tuvastada erinevaid triterpenoide ning nende di- ja trimeere dammarvaigus, diterpenoide männivaigus ning vaikhappeid guajuula vaigus. [29-31]

2.5 HPLC ja FT-ICR-MS-i ühendamine

HPLC ja FT-ICR-MS-i ühendatud süsteem võimaldab analüüsida massispektreid, mis vastavad kindlatele kromatograafilistele piikidele ning eristada ühendeid, millel on sama brutovalem, kuid mis elueeruvad HPLC-s erinevatel aegadel. Kirjandust uurides selgub, et RP-HPLC on ka varem ühendatud FT-ICR-MS seadmega, kuid sellist süsteemi on minimaalselt kasutatud kultuuriväärtuslike materjalide analüüsimiseks. RP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi on näiteks kasutatud nukleosiidide, flavanoidide, fenoolhapete ning seskviterpeenide tuvastamiseks Hiina meditsiini lahustes, kuldjuure (*Rhodiola Crenulata*) keemilise koostise uurimiseks, bioloogiliste proovide attomolaarsete koguste analüüsimiseks ning proteoomika vallas keeruliste bioloogiliste maatriksite uurimiseks. [32-36]

NP-HPLC-d ja ESI-FT-ICR-MS-i on omavahel vähem ühendatud. Peamiseks probleemiks nende kahe instrumendi ühendamisel on NP-HPLC-s tüüpiliselt kasutatavad solvendid. Nende solventidega on keeruline saavutada stabiilset ESI pihustust. Seetõttu on vajalik kas NP-HPLC metoodika muutmine või abistava solvendi lisamine eluendivoolule pärast kolonnist väljumist. Selline süsteem võib osutuda mehhaaniliselt üsna keeruliseks, kuid sarnaseid süsteeme on varasemalt kasutatud toornafta ning lipiidide osonolüüsi produktide analüüsimiseks. [37-38]

3 EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1 Metoodika arenduseks kasutatavad materjalid ja kemikaalid

HPLC-ESI-FT-ICR-MS metoodikate välja töötamiseks kasutati referentsproovidena abietiinhapet (Acros Organics, 85%), heledat kampolit (Kremer Pigmente GmbH & Co. KG), männivaiku (Signe Vahur'i kogutud, Haage, Tartumaa, 2007) ning männitõrva (Eesti Rahva muuseumi konservaatori erakollektsioonist).

HPLC-s kasutati solventidena etüülatsetaati (EtOAc, Sigma-Aldrich, ≥99.8%), diklorometaani (DCM, Riedel-de-Haën, ≥99.8%), n-heksaani (Hex, Riedel-de-Haën, ≥97.0%), metanooli (MeOH, Riedel-de-Haën, ≥99.9%), isopropanooli (IPA, Sigma-Aldrich, ≥99.9%), tolueeni (Tol, Riedel-de-Haën, ≥99.9%) ja atsetonitriili (MeCN, Riedel-de-Haën, ≥99.9%). Lisaks kasutati Milli-Q vett (Milli-Q® Advantage A 10, Millipore) ja sipelghapet (HCOOH, Fluka, 98.0 – 100.0%).

3.2 HPLC analüüs

Töös kasutati dioodrividetektoriga (DAD) vedelikkromatograafi *HP 1100 Series*. Pöördfaasis kasutati kolonni ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent, 4.6 x 250 mm, täidisosakeste diameeter: 5 μm) ning normaalfaasis kolonni ZORBAX NH2 (Agilent, 4.6 x 250 mm, täidisosakeste diameeter: 5 μm). Normaalfaaskromatograafias kasutati lisaks eelkolonni ZORBAX Original NH2 (Agilent, 4.6 x 12.5 mm, täidisosakeste diameeter: 5 μm). Seadet juhiti ning andmeid töödeldi programmiga Agilent Chemstation.

3.2.1 Analüüsid RP-HPLC-ga

Kõigepealt valmistati igast referentsproovist (abietiinhappest, heledast kampolist, männivaigust ja männitõrvast) lahused. Selleks lahustati 20 mg proovi 5 mL metanoolis. Kõik proovid filtreeriti süstlafiltriga (Whatman, läbimõõt: 13 mm, poori diameeter: 0.45 μm) ning 1 mL proovi kanti kromatograafia viaali (2 mL, Agilent). Tabelis 1 on toodud kõigi nelja referentsproovi jaoks leitud kõige paremad RP-HPLC parameetrid. Metanooli ning vee vahekord RP-HPLC katsete jaoks leiti prooviga tehtud vee taluvuse testidest, mille käigus lisati metanoolis lahustatud (filtreeritud) proovile 1 μL kaupa Milli-Q vett. Katse lõpetati kui lahuses tekkis visuaalne hägu.

Kõigi RP-HPLC katsete juures töötati isokraatilistes tingimustes. Katsetati ka kõrgemaid voolukiiruseid (0.4 mL/min ning 0.6 mL/min), kuid parimad tulemused saavutati voolukiirusega 0.2 mL/min. Lainepikkuste valimiseks viidi läbi esmased katsed erinevate lainepikkustega ning tehti valik nende põhjal.

Tabel 1. RP-HPLC ning NP-HPLC parameetrid referentsproovide analüüsimise jaoks. Tabelis on toodud kõige sobilikumad eluentide protsendilised vahekorrad.

Parameeter	Proov							
	Abietiinhape		Hele kampol		Männivaik		Männitõrv	
	RP	NP	RP	NP	RP	NP	RP	NP
Solvent A	30% H_2O (0.1% HCOOH)	85% Hex	30% H_2O (0.1% HCOOH)	85% Hex	30% H_2O (0.1% HCOOH)	85% Hex	5% H_2O (0.1% HCOOH)	85% Hex
Solvent B	70% MeOH	15% EtOAc	70% MeOH	15% EtOAc	70% MeOH	15% EtOAc	95% MeOH	15% EtOAc
Voolukiirus (ml/min)	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.4
Aeg (min)	180	25	240	25	240	25	240	25
Proovi konts. (mg/mL)	4	8	4	8	4	8	4	1
Süsti ruumala (µL)	5	20	5	20	5	20	5	2
Detekteeritavad lainepikkused (nm)	200 220 254 270 300	270 290 300 420 460	200 220 254 270 300	270 290 300 420 460	200 220 254 270 300	270 290 300 420 460	200 220 254 270 300	270 290 300 420 460

Pärast iga referentsproovi analüüsimist RP-HPLC-s oli järgnevates kromatogrammides näha eelmise proovi jääkide piike. Seetõttu oli vaja kolonni puhastada. Puhastusmeetod koostati juhtprogrammis ning see koosnes kaheksast 30 min pikkusest kromatograafilisest jooksust, mille käigus voolutati süsteemi isopropanooliga. Kokku võttis RP-HPLC puhastusmeetod aega 4 tundi, kuid ka selle aja jooksul ei olnud alati võimalik eemaldada kõiki eelneva proovi jääke.

3.2.2 NP-HPLC metoodika arendus

Metoodika arendust alustati sobivate solventide leidmisest: nii referentsproovide lahustamiseks, kui NP-HPLC katsete läbi viimiseks. Esmalt katsetati proovide lahustumist erinevates solventides (Tabel 2).

Lahustumiskatsete alusel otsustati kõik proovid NP-HPLC-ga analüüsimise jaoks lahustada etüülatsetaadis. Kuigi isopropanool oli sama efektiivne lahusti kui etüülatsetaat, siis oli see liialt tugevate omadustega eluent normaalfaasis ning ei andnud NP-HPLC katsetel häid tulemusi.

Tabel 2. Vaiguliste materjalide ja tõrvade lahustuvus erinevates solventides. Legend: (+) lahustub, (/) lahustub osaliselt, (-) ei lahustu üldse.

Solvent	Abietiinhape	Hele kampol	Männivaik	Männitõrv
Diklorometaan	/	+	/	+
Etüülatsetaat	+	+	/	+
Heksaan	-	-	-	-
Tolueen	-	-	-	+
Atsetonitriil	+	+	/	/
Metanool	+	+	/	/
Isopropanool	+	+	/	+

Referentsproovide lahuste kontsentratsioonid valiti vastavalt UV-Vis neelduvuse tugevusele NP-HPLC katsetes (kõige intensiivsema piigi neelduvus vahemikus 50 – 400 mAU). Abietiinhappe, heleda kampoli ning männivaigu referentsproovide lahuste kontsentratsiooniks oli 8 mg/mL. Männitõrva referentsproovi puhul valiti kontsentratsiooniks 1 mg/mL. Kõik proovilahused viidi 10 minutiks soojenduseta ultrahelivanni (Grant). Lõpuks filtreeriti 1 mL proovi läbi süstlafiltri kromatograafia viaali.

Järgmiseks otsustati, milliste solvendisüsteemidega jätkata tööd NP-HPLC meetodite arenamisel. Iga referentsproovi jaoks töötati välja optimaalne NP-HPLC metood. Kasutati kahest komponendist koosnevat eluenti ning katsed viidi läbi isokraatiliselt. Katsetati solvendisüsteeme DCM/EtOAc (protsendilised vahekorrad 60/40 kuni 30/70), EtOAc/Hex (protsendilised vahekorrad 60/40 kuni 5/95) ja DCM/Hex (protsendilised vahekorrad 60/40 kuni 25/75). Solvendisüsteemide vahekordi muudeti sõltuvalt solvendisüsteemist 15, 10 või 5 protsendiliste sammudega. Kõik katsetatud vahekorrad iga referentsproovi jaoks on toodud Lisas 2. Kõigi proovide jaoks salvestati kogu neelduvusspekter, mida võimaldas dioodrividetektor (150-750 nm). Nendest andmetest valiti 5 detekteeritavat lainepikkust (vt Tabel 1, peatükk 3.2.1), mis ei kattunud solventide neelduvusega ning mille puhul oli näha erinevaid piike.Valitud optimaalsed eluendi koostised ning muud NP-HPLC parameetrid erinevate referentsproovide jaoks on toodud Tabelis 1.

Arheoloogilise proovi ettevalmistusel ja analüüsimisel lähtuti männitõrva referentsproovi jaoks välja töötatud metoodikast.

Pärast iga proovi mõõtmist oli ka NP-HPLC-s näha järgnevates kromatogrammides eelmise proovi jääkide piike. Kolonni puhastamiseks koostati puhastusmeetod, mille pikkus oli 2.5 tundi ning mis koosnes neljast etapist. Esimeseks etapiks oli 30 min pikkune 100% EtOAc jooks, mis oli vajalik üleminekuks tugevama solvendi - metanooli peale kuna heksaan ei segune metanooliga. Teises etapis oli kaks 30 min pikkust 100% MeOH kromatograafilist jooksu,

mille käigus toimus põhiline kolonni pesu. Kolmandas etapis voolutati kolonni uuesti 30 min 100% etüülatsetaadiga, mis oli pärast metanooliga jooksutamist vajalik üleminekuks EtOAc/Hex solvendisüsteemile. Viimases etapis jooksutati süsteemi 30 min antud hetkel kasutatud vahekorras EtOAc/Hex seguga, mille eesmärk oli kolonni konditsioneerida järgmise proovi süstiks. Kogu pesuprogrammi jooksul soojendati kolonni 35°C juures. Võrreldes RP-HPLC kolonni puhastamisega referentsproovide jääkidest oli NP-HPLC korral puhastamine kiirem. Samuti oli puhastamine tõhusam ehk esines oluliselt vähem olukordi, kus peale pesuprogrammi oli järgmise proovi kromatogramm saastatud eelneva proovi piikidega.

3.3 Analüüsid FT-ICR-MS-iga

FT-ICR-MS analüüsideks kasutati *Varian 910* FT-ICR massispektromeetrit kombineerituna *Varian* ESI allikaga. Proovi lahuste viimiseks ESI allikasse kasutati klaassüstlaid (Hamilton, 1 mL) ning süstlapumpa *GEMINI 88 Plus Dual Rate Syringe Pump*. ESI allika juhtimiseks kasutati programmi Varian MS Workstation ning FT-ICR massispektromeetri juhtimiseks ning andmete töötlemiseks kasutati programmi Varian OMEGA. FT-ICR-MS-i ülijuhtmagneti tugevus oli 7 T ning magnetit jahutati vedela lämmastiku ja heeliumiga.

3.3.1 ESI-FT-ICR-MS mõõtmismetoodika väljatöötamine

ESI-FT-ICR-MS analüüside läbi viimiseks oli vaja valmistada mõõtmislahused, mis sisaldasid lisaks proovile ka sisekalibrante ja sipelghapet (lisati proovi hapustamiseks, et aidata kaasa ioonide tekkele). Esmalt valmistati massispektrite massitelje kalibreerimiseks kalibrantide lahus metanoolis. Sisekalibrantidena kasutati 5 erineva fosfaseeni ning 1-butüül-3-metüülimidasooliumi (BMIM) katioone, mis katavad *m/z* väärtuste vahemiku 139.12297 - 916.57611 (Lisa 3). Fosfaseenide kontsentratsioon kalibrantide lahuses oli 0.125 mM ning BMIMi kontsentratsioon oli 0.604 mM.

Kõigepealt valmistati igast referentsproovist emalahus. Selleks kaaluti viaalidesse abietiinhapet, heledat kampoli ja männivaiku 20 mg ning lahustati need 2.5 mL etüülatsetaadis. Männitõrva puhul kaaluti seda 10 mg ning lahustati 10 mL etüülatsetaadis. Seejärel ESI-FT-ICR-MS mõõtmiste jaoks lahjendati igat proovi 1.5 mL Eppendorfi tuubidesse järgmiselt: a) abietiinhappe korral pipeteeriti 5 µl proovi emalahust, 2 µl kalibrantide lahust, 20 µL HCOOH ja 973 µL MeOH; b) heleda kampoli korral võeti 5 µl emalahust, 1 µl kalibrantide lahust, 20 µL HCOOH ja 974 µL MeOH; c) männivaigu korral võeti 10 µl emalahust, 1 µl kalibrantide lahust, 20 µL HCOOH ja 969 µL MeOH; d) männitõrva puhul võeti 50 µl emalahust, 1 µl kalibrantide lahust, 20 µL HCOOH ja 929 µL MeOH. Arheoloogilise proovi emalahuse tegemiseks kaaluti viaali 5 mg proovi ning lahustati see 2.5 mL etüülatsetaadis. Seejärel

pipeteeriti Eppendorfi tuubi 50 µL proovi emalahust, 1 µL kalibrantide lahust, 20 µL HCOOH ja 929 µL metanooli.

ESI-FT-ICR-MS mõõtmiste teostamiseks võeti klaassüstlasse Eppendorfi tuubist 900 µL mõõtmislahust, mis ühendati kapillaariga ESI nõela külge. Klaassüstal kinnitati süstlapumpale ning programmeeriti süstlapump voolukiirusele 50 mL/min.

Töös kasutatud ESI allika parameetrid massispektrite mõõtmiseks on toodud Tabelis 3.

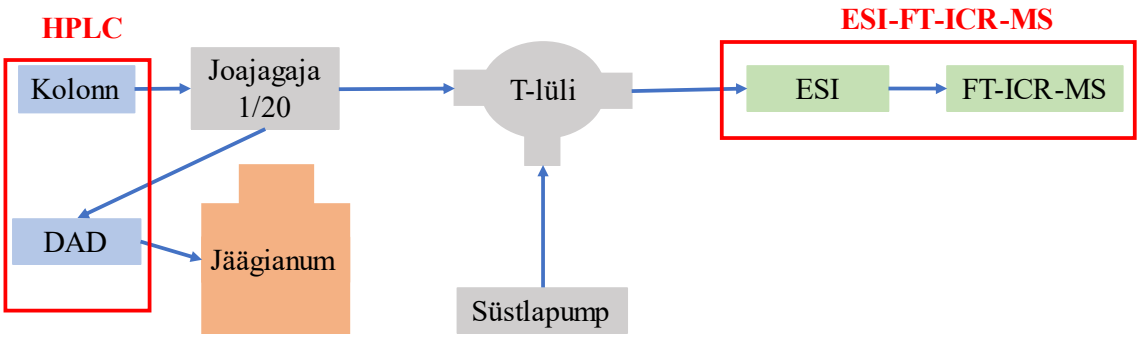
Tabel 3. ESI allika parameetrid massispektrite registreerimiseks.

ESI allika parameeter	**Vahemik**	
	FT-ICR-MS analüüs	**Ühendatud süsteemiga analüüs**
Pihustusnõela pinge (V)	2000 – 2500	4000 – 4500
Kilbi pinge (V)	250 – 300	150 – 200
Kuivatusgaasi (N_2) rõhk (psi)	10 – 15	10 – 15
Kuivatusgaasi temperatuur (°C)	250 – 300	150 – 200
Pihustusnõela diameeter (µm)	120	120

FT-ICR-MS puhul varieeriti ergastava impulsi amplituudi vahemikus 80 – 120 V ning ioonjuhi raadiosagedusliku pinge amplituud oli 180 V. Mõõtmised teostati positiivses režiimis ja mõõtevahemikuks oli *m/z* 115 – 1000.

3.4 NP-HPLC ning ESI-FT-ICR-MS instrumentide ühendamine

HPLC ja ESI-FT-ICR-MS instrumentide ühendamist on varem meie töögrupis läbi viidud. Käesolev töö on Markus Veinla poolt alustatud töö edasiarendus. Oma töös ühendas Markus Veinla RP-HPLC ja nanoESI-FT-ICR-MS-i eesmärgiga arendada hübriidsüsteemi keerukate looduslike proovide uurimiseks. Ta töötas välja ühendamise meetodi, kus proov läbis esmalt HPLC kolonni ja dioodirividetektori ning seejärel viidi järjestiku läbi 1/32 voolujagaja, manuaalselt reguleeritava voolujagaja ning ühe nõela nanoESi allikasse. Kasutades süstlapumpa juhiti teise nõela kaudu nanoESI allikasse sisekalibrantide lahus. Lisaks süsteemi ühendamisele oli tema töö oluliseks osaks FT-ICR massispektrite registreerimise kiirendamine. Töös suudeti vähendada registreerimise aega 16 sekundilt 4 sekundini säilitades spektrite kvaliteet. [39]



Joonis 1. NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi ühendamise skeem.

Käesolevas töös modifitseeriti varem väljatöötatud ühendamise metoodikat (vt Joonis 1). RP-HPLC asemel kasutati NP-HPLC ja nanoESI allika asemel ESI allikat. NP-HPLC ja ESI-FT-ICR-MS ühendamiseks kasutati roostevabast terasest kapillaare (Agilent, sisediameeter 0.17 mm) ja polüeeter-eeter ketooniga kaetud silika kapillaare (*PEEKsil*^{TM}, TRAJAN, sisediameeter 0.1 mm). Tavaline ESI allikas võimaldas kasutada suuremaid voolukiiruseid, seega polnud vajalik enam, et T-lüli (VALCO) toimiks kui manuaalselt reguleeritav voolujagaja. Mobiilse faasi voolu jagamiseks kasutati reguleeritavat voolujagajat *QuickSplit*^{TM} (1/20, maksimaalne jaotus 1/32), kus 1 osa kolonnist väljunud voolust suunati dioodrividetektorisse ja 20 osa ESI allikasse. ESI allikas oli ühe nõelaga, mistõttu lisati hapustatud sisekalibrantide lahus (valmistatud punktis 3.3.1. kirjeldatud kalibrantide lahuse lahjendamisel hapustatud metanooli, nii et kokku segati 1 µl kalibeerimislahust, 20 µl HCOOH ja 979 µl MeOH) otse eluendivoolule läbi T-lüli süstlapumba abil. Sisekalibrantide lahuse voolukiiruseks seati süstlapumba programmis 50 µL/min ja lahuse vool käivitati 7. minutil (enne seda ei esinenud kromatogrammil proovile vastavaid piike). Metanoolis lahjendatud sisekalibrantide lahuse lisamisel oli ka teine oluline eesmärk. NP-HPLC-s kasutatud EtOAc/Hex (protsendiline vahekord 15/85) solvendisüsteemiga ei olnud võimalik saavutada stabiilset pihustust ESI allikas. Kuigi metanool ning heksaan ei segune omavahel, siis metanooli lisamine eluendivoolule lahendas probleemi lahuse pihustamisega. [37-38]

Ühendatud süsteemiga mõõtmiseks tehti proovi ettevalmistus samamoodi nagu on kirjeldatud peatükis 3.2.2. Ühendatud süsteemiga mõõtmisel kasutatud ESI allika parameetrid on toodud Tabelis 3 (peatükk 3.3.1). Vähem polaarsete solventide kasutamise tõttu oli vajalik suurendada pingete erinevust kilbi ja ESI nõela vahel, et saavutada stabiilne pihustus. Samuti oli oluline madalam kuivatusgaasi temperatuur solventide kõrgema lenduvuse tõttu võrreldes metanooliga.

4 TULEMUSED JA ARUTELU

Käesoleva töö eesmärgiks on ühendada NP-HPLC ja ESI(+)-FT-ICR-MS seadmed ühtseks mõõtesüsteemiks, mis võimaldaks efektiivsemalt analüüsida keerulise koostisega männivaigulisi materjale. Järgnevates alapeatükkides on samm-sammult välja toodud kogu arendustegevus ning saadud tulemused.

4.1 Analüüsid RP-HPLC-ga

Lähtudes töögrupis varasemalt Markus Veinla poolt tehtud arendustööst viidi käesoleva töö käigus esmalt läbi katsed RP-HPLC-ga. RP-HPLC analüüsi juures kasutati referentsproovidena abietiinhapet, heledat kampolit, männivaiku ning männitõrva. Parimatel RP-HPLC tingimustel registreeritud kromatogrammid iga referentsproovi jaoks on toodud Lisas 4.

Kromatogrammidelt on näha, et RP-HPLC võimaldas saavutada kromatograafilist lahutust, kuid mitte piisavas ulatuses. Eriti tugevalt oli seda probleemi näha heleda kampoli ning männivaigu referentsproovide puhul. Lisaks sellele oli nende mõõtmiste käigus näha ka baasijoone ebastabiilsust. Peamiseks probleemiks aga antud materjalide analüüsimisel oli liialt pikk kromatograafilise jooksu aeg, mis valmistas hulgaliselt probleeme HPLC ning ESI-FT-ICR-MS instrumentide ühendamisel. Nõnda pika kromatograafilise jooksu puhul oli probleeme ESI pihustuse stabiilsuse, nõela ummistumise ning ka suure andmemahuga (3-tunnise katse andmed olid umbes 14 Gb). Samuti oli RP-HPLC analüüsi juures tülikas ajamahukas kolonni puhastamine. Päras igat proovilahuse süsti oli vaja kolonni vähemalt 4 tundi isopropanooliga puhastada, et vältida järgneva proovi saastumist eelnevaga. Kolonni puhastamise puhul valmistas kõige suuremaid probleeme männitõrva referentsproov, mille komponendid jäid statsionaarse faasi külge väga tugevalt kinni.

Lisaks ei lahustanud MeOH ega H_2O proove kuigi edukalt. Vesi oli kõige problemaatilisem männitõrva referentsproovi puhul, sest mobiilses faasis ei olnud võimalik tõsta vee osakaalu kõrgemale kui 5%. Vastasel juhul oli oht, et proov sadeneb kolonnis. Arvestades kõiki neid probleeme otsustati üle minna NP-HPLC meetodi arendamise peale. NP-HPLC-s tüüpiliselt kasutusel olevad solvendid on vähem polaarsed ning sobivad paremini männivaiguliste materjalide lahustamiseks.

4.2 NP-HPLC metoodika arendus

NP-HPLC on meetod, mida tänapäeval kasutatakse harva ning eriotstarbel. Üks peamistest põhjustest, miks kasutatada RP-HPLC asemel NP-HPLC-d, on võimalus analalüüsida materjale, mis on vees lahustumatud. NP-HPLC-d on varasemalt vähe kasutatud keerulise

koostisega looduslike materjalide analüüsimiseks ning praktiliselt ei ole kasutatud männivaiguliste materjalide uurimiseks. Käesolevas töös kasutatud aminokolonni ei ole kirjanduse andmetele samuti varem kasutatud sarnaste proovide analüüsimiseks ning seetõttu oli vaja käesoleva töö raames läbi viia süsteemne metoodika arendus.

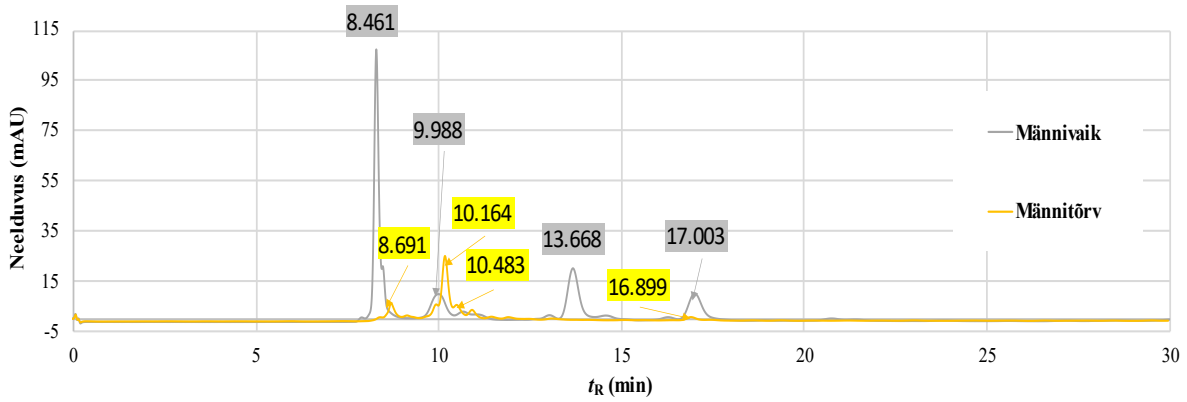
Esmalt viid läbi lahustuvuskatsed (vt Tabelit 2, peatükk 3.2.2), mille alusel valiti välja referentsproovide jaoks sobiv solvent ja solvendid, millega NP-HPLC-s edasi töötada. Solventide valikul oli tähtis nende elueerimistugevus (NP-HPLC-s on polaarsemad solvendid tugevamad) ning tugeva ja nõrga solvendi kombineerimine. Tugeva elueerimisvõimega solventideks valiti DCM ja EtOAc, millest EtOAc lahustas ka proove kõige edukamalt. Nõrgaks eluendi komponendiks valiti NP-HPLC-s tüüpiliselt kasutatav heksaan.

NP-HPLC metoodika arendamisel katsetati solvendisüsteeme DCM/EtOAc, EtOAc/Hex ja DCM/Hex (katsetatud vahekorrad on kirjeldatud peatükis 3.2.2. ja täpsem tabel on toodud Lisas 2). Iga solvendisüsteemiga metoodika arendamiseks valiti algpunktiks selline kahe solvendi protsendiline vahekord, milles proov lahustus sama hästi kui puhtas solvendis. Need vahekorrad olid iga referentsproovi ja solvendisüsteemi jaoks erinevad (nende täpsem kirjeldus on toodud Lisas 2). Seejärel vähendati tugeva solvendi osakaalu iga solvendisüsteemi ja referentsproovi puhul 15, 10 või 5 protsendiste sammudega.

Katsetuste käigus ilmnes, et solvendisüsteem DCM/EtOAc ei anna häid tulemusi ühegi referentsproovi jaoks (madal neelduvus, puudus kromatograafiline lahutus, vt Lisas 5 Jooniseid 4 - 8). Solvendisüsteemiga DCM/Hex saavutati kromatograafiline lahutus vaid männitõrva referentsproovi jaoks (vt Lisas 5 toodud Jooniseid 9 – 13). Abietiinhappe, heleda kampoli ja männivaigu referentsproovide puhul peeti algselt probleemiks proovilahuse madalat kontsentratsiooni, kuid tulemused ei paranenud ka kontsentratsiooni tõstes. Solvendisüsteemiga EtOAc/Hex saavutati hea kromatograafiline lahutus vaid kahe referentsproovi, männivaigu ning -tõrva, puhul.

Abietiinhappe ning heleda kampoli proovi puhul ei saavutatud seega rahuldavat kromatograafilist lahutust ühegi katsetatud solvendisüsteemiga. Selle põhjenduseks on ilmselt see, et mõlemad sisaldavad võrreldes männivaigu ja -tõrvaga rohkem polaarseid komponente, mille analüüsimiseks sobivad paremini pöördfaaskromatograafia tingimused. Nende materjalide komponendid suure tõenäosusega seostusid tugevamalt aminokolonniga ning väljusid sellest alles pesuprogrammi käigus. Kuna abietiinhappe ning heleda kampoli referentsproovide tulemused osutusid katsetatud solvendisüsteemidega kehvaks jäeti need referentsproovid edasise arutluse alt välja.

Edasi testiti rohkem erinevaid EtOAc/Hex solvendisüsteemi vahekordi männivaigu ja -tõrva referentsproovide jaoks, et leida kummagi proovi jaoks parim meetod (vt Lisas 2 toodud tabelit ja Lisas 5 Jooniseid 14 – 18). Selle tulemusel leiti, et parima lahutuse männivaigu puhul annab EtOAc/Hex vahekorraga 15/85 ja tõrva jaoks on sobivaim EtOAc/Hex vahekord 5/95. Männitõrvaga saavutati hea lahutus ka EtOAc/Hex vahekorras 15/85, mis andis hea võimaluse neid kahte proovi omavahel võrrelda. Joonisel 2 on toodud antud solvendisüsteemi EtOAc/Hex protsendilise vahekorraga 15/85 saadud männitõrva ning männivaigu referentsproovide kromatogrammid. Esitamiseks on valitud lainepikkusel 290 nm registreeritud kromatogramm. Selline valik tehti lähtuvalt piikide neelduvusest; teistel UV lainepikkustel oli neeldumine madalam ning ei detekteeritud kõiki piike, mis esinesid 290 nm juures. Kuigi neelduvust mõõdeti ka nähtava valguse lainepikkustel leiti, et ükski proov neil ei neelanud.



Joonis 2. Männivaigu ja männitõrva referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid solvendisüsteemis EtOAc/Hex vahekorras 15/85 ja lainepikkusel 290 nm.

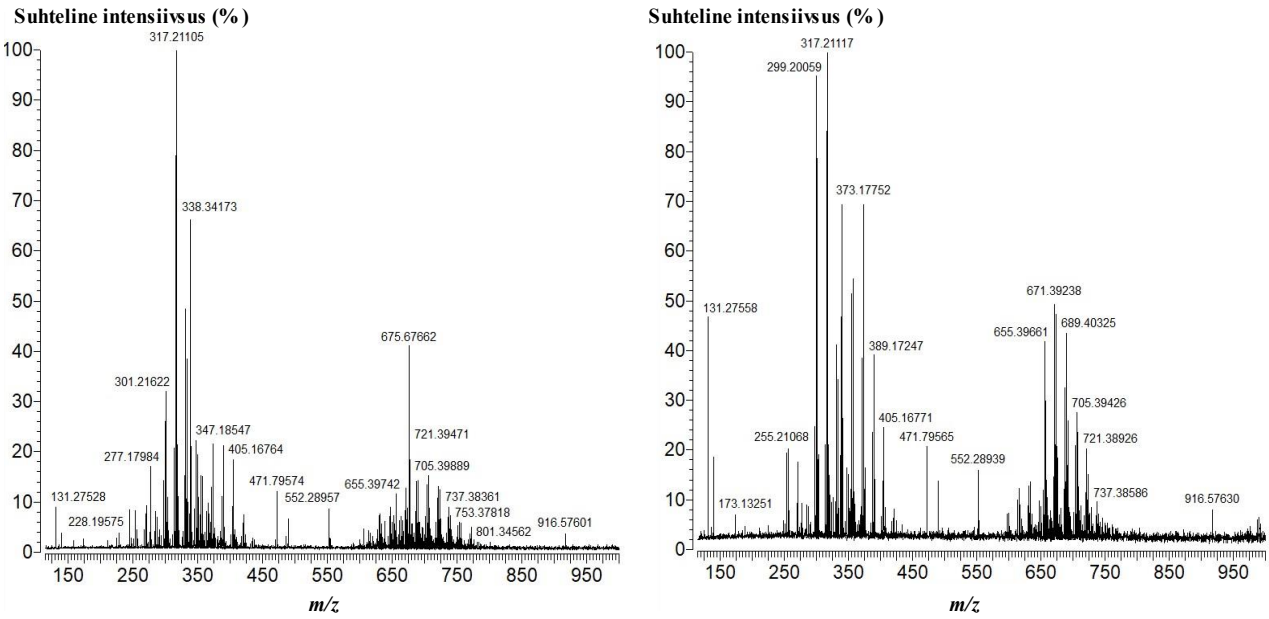
Nagu Jooniselt 2 näha, siis männitõrva ning männivaigu referentsproovide puhul ei saanud ajaliselt kattuvaks lugeda ühtegi kromatograafilist piiki. Männivaigul esineb neli kromatograafiliselt lahutatud piiki retentsiooniaegadel 8.461 min, 9.988 min, 13.668 min ja 17.003 min. Männitõrva referentsproovi puhul on näha, et 10 minuti läheduses on lähestikku koos mitu piiki, mis ei ole täielikult kromatograafiliselt lahutatud. Selline kromatograafiline lahutus loeti siiski rahuldavaks, kuna see võimaldas eristada omavahel männivaigu ja männitõrva referentsproove.Võrreldes RP-HPLC-ga oli NP-HPLC sobilikum männivaigu ning männitõrva referentsproovide analüüsimiseks. See on põhjendatav vaadates männivaigu ning männitõrva koostist. Männitõrv (ning vähemal määral ka männivaik) sisaldab arvestatavalt rohkem mitte-polaarseid ühendeid kui abietiinhappe referentsproov ja hele kampol. RP-HPLC puhul jäävad väga mitte-polaarsed ühendid kolonni kinni samas kui NP-HPLC on sobilik just selliste ühendite kromatograafiliseks lahutamiseks. Lisaks mitte-polaarsete ühendite

kromatograafilisele lahutamisel osutus NP-HPLC puhul oluliseks eeliseks ka kromatograafilise jooksu pikkus, mis võrreldes pöördfaasiga oli umbes 3-6 korda lühem. Lisaks sellele osutus NP-HPLC puhul ka kolonni puhastamine pärast proovide süstimist vähem tülikaks tänu efektiivsele mitmeetapilisele puhastusele.

4.3 Referentsproovide analüüsimine ESI(+)-FT-ICR-MS-iga

Järgmise sammuna registreeriti kõigi referentsproovide massispektrid ESI-FT-ICR-MS-iga positiivses režiimis. Nende mõõtmiste põhjal oli hiljem võimalik võrrelda ESI(+)-FT-ICR-MS-iga detekteeritud ning ühendatud süsteemiga mõõdetud tulemusi. Kuigi allpool kirjeldatud NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga ei analüüsitud abietiinhappe ning heleda kampoli referentsproove, siis registreeriti nende massispektrid antud etapis. Selle eesmärgiks oli kasutada neid kui võrdlusspektreid, mis aitavad kaasa männivaigu, männitõrva ning hiljem arheoloogilise proovi massispektrite interperteerimisel.

Abietiinhappe massispektris leidus 347 (vt Joonist 3), heleda kampoli massispektris 155 (vt Joonist 3), männivaigu massispektris 216 (vt Joonist 4) ning männitõrva massispektris vaid 52 piiki (vt Joonist 4). Iga proovi puhul valiti interpreteerimiseks välja kõige intensiivsemad piigid (relatiivne intensiivsus üle 10%). Kuna heleda kampoli, männivaigu ja männitõrva proovide puhul on tegemist männivaiguliste materjalidega (abietiinhape on üks põhilistest komponentidest kõigis neis), siis paljud piigid nende massispektrites kattusid. Ühtekokku interperteeriti referentsproovide massispektrites 86 piiki ning nende interperteerimiste tulemused on toodud Lisas 6 Tabelis 3.

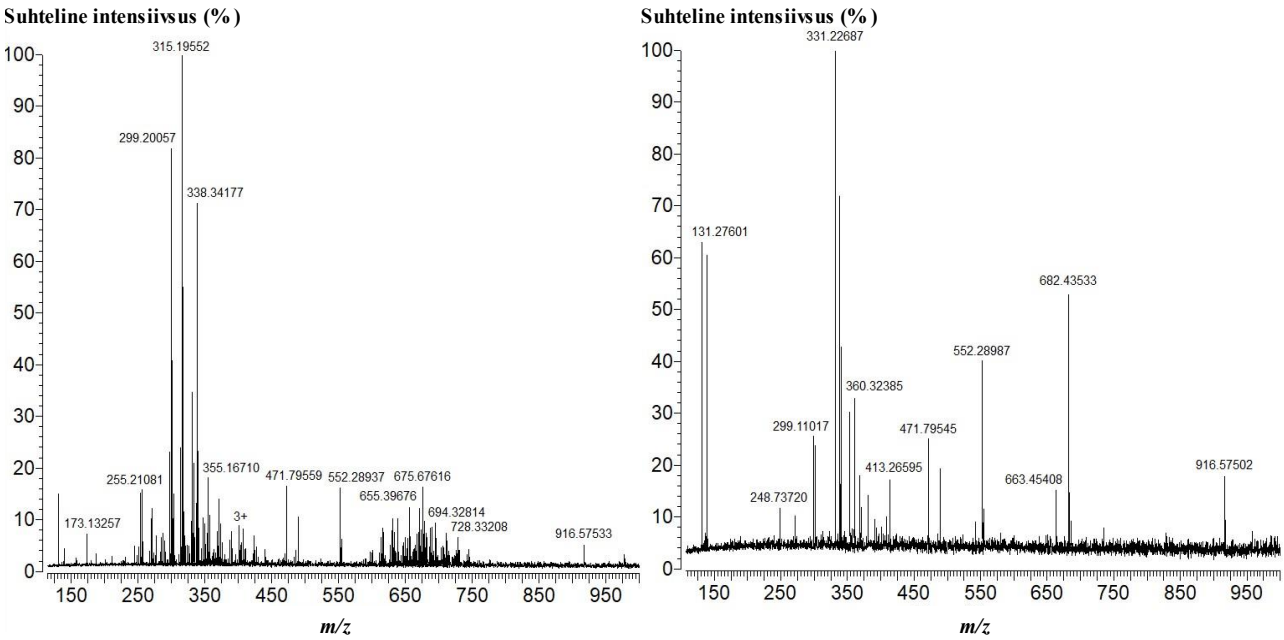


Joonis 3. Abietiinhappe (vasakul) ja heleda kampoli (paremal) referentsproovide ESI(+)-FT-ICR-MS spektrid.

Abietiinhappe referentsproovi massispektris (Joonis 3) kuulub kõige intensiivsem piik *m/z* väärtusel 317.21105 protoneeritud 15-hüdroksüdehüdroabietiinhappele $[C_{20}H_{28}O_3+H]^+$, mis on abietiinhappe vananemisprodukt. Teistest intensiivsetest piikidest esimeses klastris on olulised abietiinhappe olemasolu ning vananemist kinnitavad piigid, mis vastavad dehüdroabietiinhappele ($[C_{20}H_{28}O_2+H]^+$, *m/z*=301.21622) ning 15-hüdroksü-7-oksodehüdroksüabietiinhappele ($[C_{20}H_{26}O_4+H]^+$, *m/z*=331.19035). Madalama intensiivsusega on esimes klastris näha oksüdeerunud abietiinhappele vastavat piiki ($[C_{20}H_{30}O_2+O+H]^+$, *m/z*=319.22674). Teises klastris on peamiselt tegemist erinevate kombinatsioonidega esimeses klastris esinevatest komponentidest ja nende derivaatidest, näiteks piigile *m/z* väärtusega 655.39742 vastab ühend ioonvalemiga $[2C_{20}H_{28}O_2+O+Na]^+$, mis on tõenäoliselt dehüdroabietiinhappe dimeeri derivaat.

Abietiinhappe massispektris on samuti näha saastet. Nt piigid *m/z* väärtustel 338.34173 ning 675.67662 kuuluvad vastavalt erukamiidile (ioonvalemiga $[C_{22}H_{43}NO+H]^+$) ning selle dimeerile ($[2C_{22}H_{43}NO+H]^+$). Samuti kuuluvad saastele piigid *m/z* väärtustel 471.79574, mis vastab katioonile $(HCO_2)_6(H_2O)Fe_3O^+$, ning 489.80643, mis vastab katioonile $(HCO_2)_6(H_2O)_2Fe_3O^+$. Need kompleksid on ilmselt tekkinud proovi lahuste hapustamiseks kasutatud HCOOH roostevaba terase söövitamisel. Erukamiidi saaste võis massispektritesse tulla proovi ettevalmistuse käigus proovilahuse filtreerimiseks kasutatava süstla ebapiisava puhtuse tõttu või võis olla tegemist ESI allikasisese saatega. Erukamiidi ioonidele vastavad saaste piigid esinevad ka kõigis teistes proovide massispektrites ning seetõttu võib eeldada, et ei ole tegemist abietiinhappe proovist tulenevate ühenditega.

Heleda kampoli massispekter (Joonis 3) on sarnane abietiinhappe referentsproovi MS spektrile. Samas on heleda kampoli massispektris näha rohkem oksüdeerunud abietiinhappe derivaatidele iseloomulikke piike. Kõige intensiivsem piik heleda kampoli ESI-FT-ICR-MS spektris kuulub protoneeritud 15-hüdroksüdehüdroabietiinhappele ($[C_{20}H_{28}O_3+H]^+$, *m/z*=317.21117). Intensiivsed piigid annavad ka protoneerunud didehüdroabietiinhape ($[C_{20}H_{26}O_2+H]^+$, *m/z*=299.20059) ning 7-oksodehüdroabietiinhappe naatriumadukt ($[C_{20}H_{28}O_3+Na]^+$, *m/z*=339.19311). Ka siin on teises klastris näha peamiselt abietiinhappe ning selle derivaatide dimeere ja kombinatsioone, näiteks piigile *m/z* väärtusega 671.39238 vastab ühend ioonvalemiga $[2C_{20}H_{28}O_2+3O+Na]^+$, mis on suure tõenäosusega kahe dehüdroabietiinhappe dimeeri oksüdeerunud derivaat.



Joonis 4. Männivaigu (vasakul) ja männitõrva (paremal) referentsproovide ESI(+)-FT-ICR-MS massispektrid.

Männivaigu referentsproovi massispekter (Joonis 4) sarnaneb mõningal määral nii abietiinhappe kui ka heleda kampoli massispektritele. Erinevalt abietiinhappest ning heledast kampolist on männivaigu massispektris teine klaster oluliselt madalama intensiivsusega. Võrreldes heleda kampoliga on männivaigu massispektris esimese klastris intensiivseid piike vähem. Kõige intensiivsem piik männivaigu massispektris on *m/z* väärtusel 315.19552 ja see kuulub protoneeritud 7-oksodehüdroabietiinhappele ($[C_{20}H_{26}O_3+H]^+$). See viitab männivaigu ulatuslikumale vananemisele võrreldes heleda kampoliga. Olulised piigid esimeses klastris viitavad veel didehüdroabietiinhappele ($[C_{20}H_{26}O_2+H]^+$, *m/z*=299.20057) ning norabietatrieeni struktuuriga ühendile ioonvalemiga $[C_{19}H_{28}-2H+H]^+$ (*m/z*=255.21081). Norabietatrieeni struktuuriga ühendite puhul on tegemist üsna stabiilsete vaheühenditega abietiinhappe oksüdeerumisel reteeniks. Peamiselt peetakse neid küll männitõrva biomarkeriteks, kuid neid võib ka leiduda vananenud männivaigus. Vaadates lähemalt teist klastrit on näha, et ka selle proovi puhul on peamiselt tegemist erinevate kombinatsioonidega abietiinhappest ja selle derivaatidest. Siin leidub samuti näiteks piik *m/z* väärtusega 655.39676, millele vastab sama ioonvalemiga $[2C_{20}H_{28}O_2+O+Na]^+$ ühend nagu ka abietiinhappe referentsproovis, mis on tõenäoliselt dehüdroabietiinhappe dimeeri derivaat.

Lisaks protoneeritud ühenditele ning Na-aduktidele leidus männivaigu massispektris ka K-adukte. Näiteks piigile *m/z* väärtusel 355.16710 vastab oksüdeeritud dehüdroabietiinhappe K-

adukt ($[C_{20}H_{28}O_2+O+K]^+$), *m/z* 357.18301 vastab oksüdeeritud abietiinhappe K-adukt ($[C_{20}H_{30}O_2+O+K]^+$) ning teises klastris tuvastati *m/z* väärtuse 671.37028 puhul, et tegu on ilmselt dehüdroabietiinhappe dimeeri oksüdeerunud derivaadi K-aduktiga ($[2C_{20}H_{28}O_2+2O+K]^+$). Kaalium ilmselt pärineb looduslikku päritolu referentsproovidest.

Männitõrva referentsproovi massispektris (Joonis 4) on näha oluliselt suuremaid erinevusi võrreldes eelnevate proovidega. Selles massispektris on kõige intensiivsem piik *m/z* väärtusel 315.23191, mis vastab protoneerunud metüüldehüdroabietaadile ($[C_{21}H_{30}O_2+H]^+$). Metüüldehüdroabietaati loetakse männitõrva üheks peamiseks biomarkeriks. [7] Metüüldehüdroabietiinhappe derivaate leidub antud spektris veelgi, näiteks piigile *m/z* väärtusega 329.21146 vastab protoneerunud metüül-7-oksodehüdroabietaat ($[C_{21}H_{28}O_3+H]^+$). Lisaks nendele biomarkerühenditele leidub männitõrvas ka norabietatrieeni struktuuriga ühendeid. Näiteks protoneeritud dehüdrogeenitud norabietatrieenile ($[C_{19}H_{28}-2H+H]^+$) vastav piik on leitav *m/z* väärtusel 255.21080. Norabietatrieeni struktuuriga ühendid tekivad abietiinhappest tõrva valmistamise käigus, kuid võivad ka loomulikult tekkida männivaigulise materjali vananemise käigus.

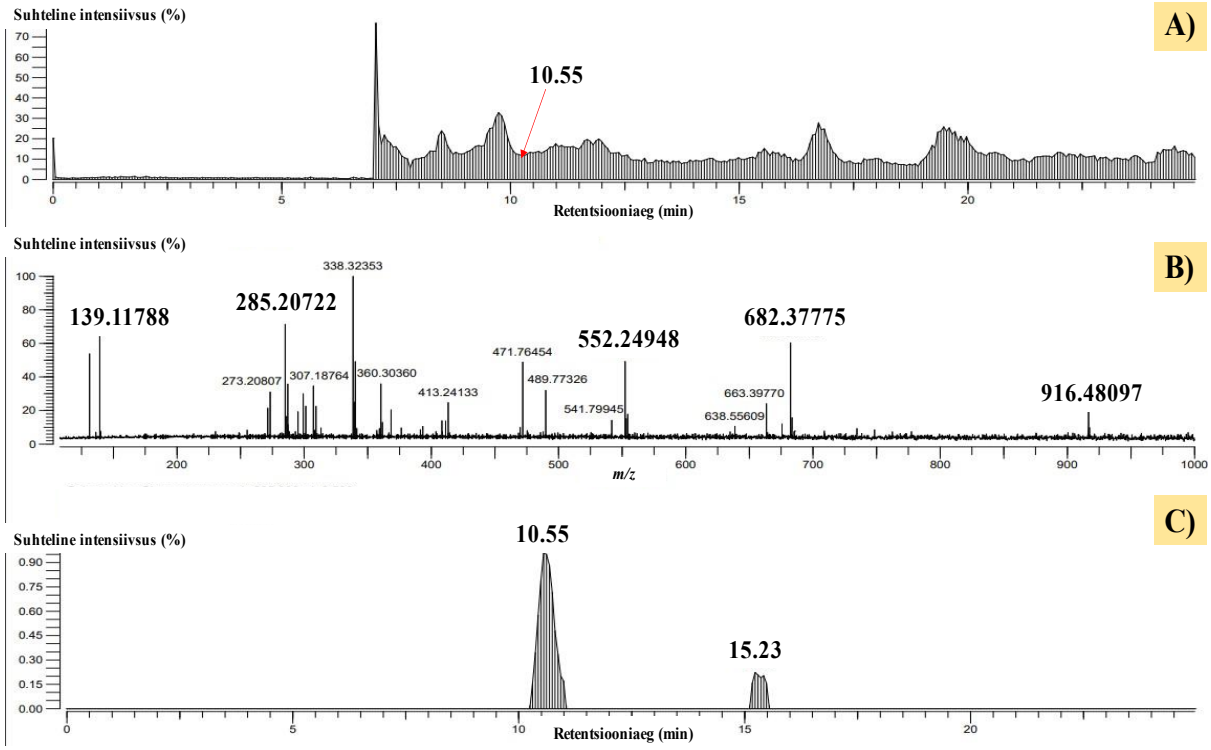
Männitõrva massispektris praktiliselt puudub teine klaster. Sellele põhjuseks võib olla männitõrva halvem lahustuvus etüülatsetaadis (suurema molekulmassiga ühendid ei lahustunud). Samuti on männitõrvas suurem hulk vähem polaarseid ühendeid, mis ei pruugi ioniseeruda ESI positiivses režiimis. Keskendudes peamiselt metüüldehüdroabietaadile ning selle derivaatidele on ESI-FT-ICR-MS-iga võimalik eristada männitõrva teistest männivaigu-laadsetest referentsproovidest.

Kokkuvõttes näidati, et kõigi referentsproovide mõõtmiste teostamine ESI(+)-FT-ICR-MS instrumendiga oli edukas. Kuid nende massispektrite interperteerimine ning referentsproovides sisalduvate kindlate komponentide tuvastamine oli keeruline ning aeganõudev. Peamisteks põhjusteks oli komponentide omavaheline sarnasus ning massipiikide küllaltki suur hulk igas massispektris. Mitmed massipiigid jäid tuvastamata ning komponendid, mis suudeti tuvastada, identifitseeriti kirjanduse põhjal. Lisaks sellele puudus ka interperteeringute kinnitamise võimalus. Neid probleeme võiks aidata lahendada ESI(+)-FT-ICR-MS-i ühendamine NP-HPLC-ga, mis võimaldaks keerulise koostisega segudes komponente eraldada. Seeläbi saaks neid tuvastada kromatograafilistele piikidele vastavate massispektrite alusel, milles oleks vähem massipiike ja seeläbi oleks nende interperteerimine lihtsam.

4.4 Referentsproovide analüüsimine NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS-ga

NP-HPLC ning ESI(+)-FT-ICR-MS instrumendid ühendati vastavalt skeemile, mida on kirjeldatud peatükis 3.4 (vt Joonis 1). Ühendatud süsteemi katsetati kõigi referentsproovidega, kuid korralikke tulemusi andsid vaid männivaigu ning männitõrva referentsproovid. Abietiinhappe ning heleda kampoli referentsproovides ei detekteeritud NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS meetodiga ühtegi piiki. Seega ei olnud võimalik nende referentsproovide jaoks tuvastada kromatograafilistele piikidele vastavaid ioone massispektrites. Seetõttu keskenduti edaspidi vaid männivaigu ja männitõrva referentsproovidele.

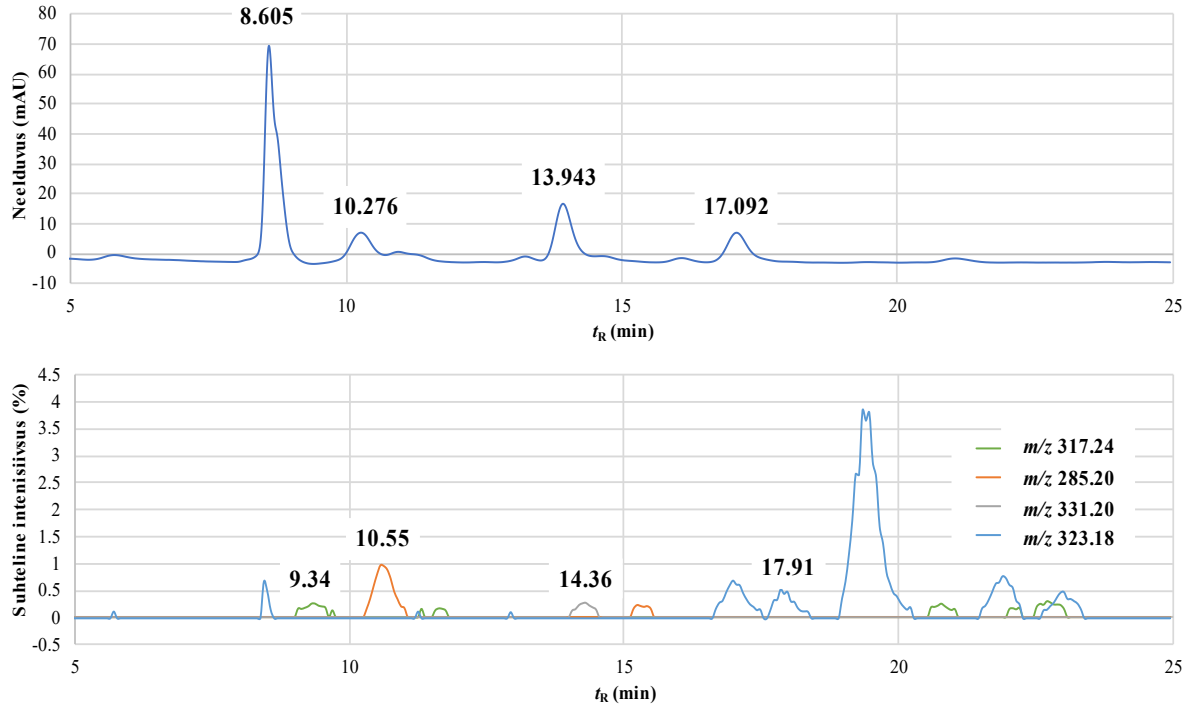
Joonisel 5 on näitena toodud männitõrvast NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS mõõtesüsteemiga saadud andmed ja nagu näha on võimalik ühe mõõtmisega saada proovist päris palju infot.



Joonis 5. Männitõrva referentsproovist NP-HPLC ja ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga registreeritud toorandmete näide. A) masskromatogramm, B) ajahetkele 10.55 min vastav massispekter ja C) *m/z* väärtuse 285.22133 ekstraheeritud ioonkromatogramm.

Joonisel 5A on toodud männivaigu summaarne ioonvoolu kromatogramm ehk masskromatogramm. Masskromatogramm koosneb iga 4 sekundi tagant registreeritud massispektritest (25 minuti pikkuse NP-HPLC katse jooksul registreeriti umbes 400 massispektrit). Alates 7. minutist lisati ESI allikasse suunduvale eluendile ka sisekalibrantide

ja metanooli lahus, mistõttu sisaldas iga masskromatogrammis olev massispekter sellest hetkest alates sisekalibrantidele vastavaid piike (masskromatogrammi baasijoon tõusis märgatavalt). NP-HPLC dioodrividetektoriga (DAD-ga) registreeritud kromatograafiliste piikide retentsiooniaegade järgi otsiti masskromatogrammist üles ajaliselt lähedasi massispektreid. Üks selline massispekter on toodud näitena joonisel 5B, kus on leitud masskromatogrammis esinevale piigile retentsiooniajaga 10.55 min vastav massispekter. Selles massispektris on näha 36 erinevat piiki, mis on arvestatavalt vähem, kui vaid ESI(+)-FT-ICR-MS-iga mõõdetud spektrites (võrdlus on toodud Lisas 7). Selleks, et mõista milline massipiik neist vastab DAD-i kromatograafilisele piigile leiti iga massispektris oleva iooni (*m/z* väärtuse) jaoks selle ekstraheeritud ioonkromatogramm. Sellise otsinguga välistati ioonid, mis esinesid kogu masskromatogrammi jooksul (näiteks kalibrandid ning saaste). Joonisel 5C on toodud *m/z* väärtusel 285.22133 ekstraheeritud ioonkromatogramm, mis esines masskromatogrammis peamiselt ajahetkel 10.55 min, kuid vähesel määral ka ajahetkel 15.23 min. Sellisel andmete vaatlemisel leiti suhteliselt vähese vaevaga kromatograafilistele piikedele vastavad ioonid masskromatogrammi moodustavatest massispektritest.



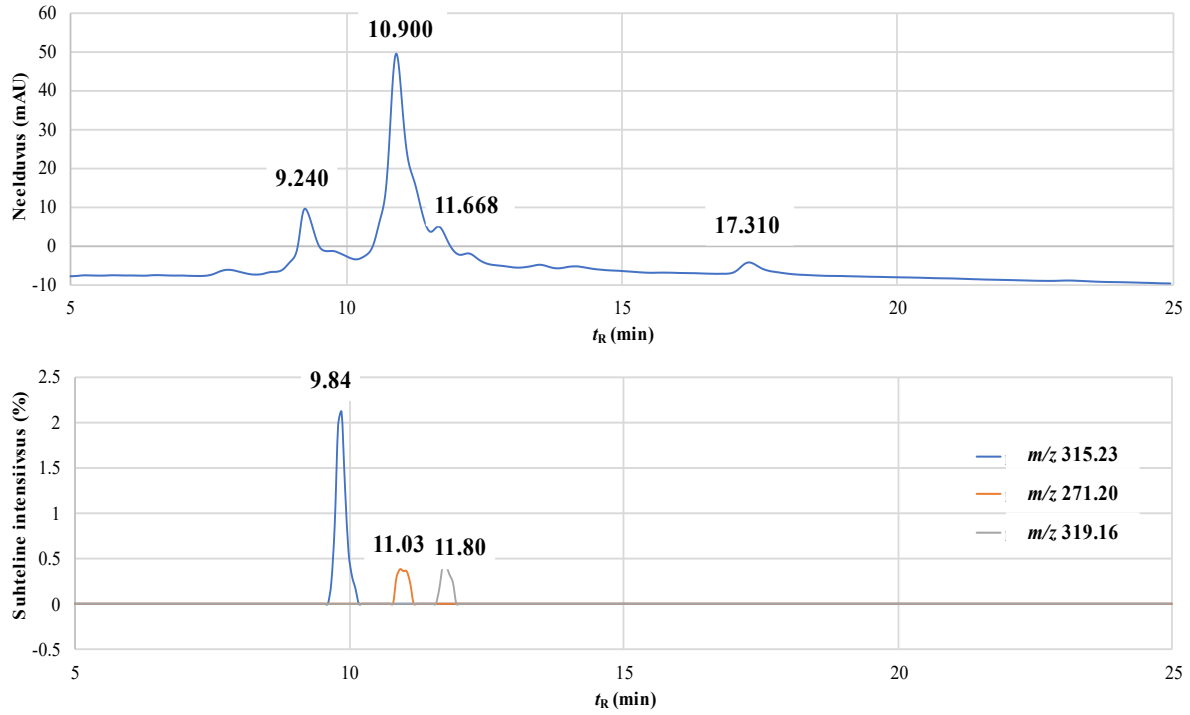
Joonis 6. NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga mõõdetud männivaigu referentsproovi dioodrividetektoriga registreeritud kromatogramm (üleval) ning FT-ICR-MS abil salvestatud (kalibreerimata) ekstraheeritud ioonkromatogramm (all).

NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS-iga analüüsides registreeriti samaaegselt nii kromatogramm kui ka masskromatogramm. Joonisel 6 on võrdlevalt toodud männivaigu NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS ühendatud süsteemis DAD-ga registreeritud kromatogramm ning andmetetöötluse käigus kromatograafilistele piikidele vastavate ioonide ekstraheeritud ioonkromatogrammid. On näha, et DAD-ga registreeritud kromatograafiliste piikide retentsiooniajad ning ekstraheeritud ioonkromatogrammide retentsiooniajad ei ühti. Instrumentide ühendamise mooduse tõttu (Joonis 1, peatükk 3.4) jõudis eluendi vool pärast kolonnist väljumist DAD-i varem kui massispektromeetrisse. ESI-FT-ICR-MS-i jõudmiseks pidi eluendi vool läbima pikema teekonna, mis koosnes 90 cm metallkapillaarist, T-lülist ning ESI nõelaga ühendatud PEEKSil kapillaarist. See ajaline nihe tuvastati katsete käigus kõikide proovide korral ning hinnati olevat vahemikus 0.2 kuni 0.9 minutit.

Kõikidele männivaigu DAD-i kromatogrammis esinenud piikidele suudeti tuvastada vastavad ühendid. Retentsiooniajale 8.605 min vastas ühend ioonvalemiga $[C_{21}H_{32}O_2+H]^+$ (*m/z*=317.24751), mis kuulub metüülabietaadile. Retentsiooniajale 10.276 min omistati ioonvalem $[C_{20}H_{28}O+H]^+$ (*m/z*=285.22133), mis vastab dehüdroabietaalile. Retentsiooniajal 13.943 min esinevale piigile vastas ühend ioonvalemiga $[C_{21}H_{30}O_3+H]^+$ (*m/z*=331.22702), mis interpreteeriti metüül-7-oksodehüdroabietaadina. Kromatogrammis olevale viimasele piigile (retentsiooniajal 17.092 min) vastas ühend ioonvalemiga $[C_{20}H_{28}O_2+Na]^+$ (*m/z*=323.19830), mis kuulub tõenäoliselt dehüdroabietiinhappele.

Kõigi männivaigu referentsproovi ekstraheeritud ioonkromatogrammide puhul on näha, et antud ioonid ei esine vaid retentsiooniaegadel, mis on vastavusse seatud UV-Vis kromatograafiliste piikidega. See on põhjendatav sellega, et samale *m/z* väärtusele vastavad sama katioonvalemiga, kuid erineva struktuuriga ühendid. Selline tulemus demonstreerib süsteemi võimekust lahutada erineva struktuuriga ühendeid, mis ei oleks võimalik analüüsides proovi vaid ESI(+)-FT-ICR-MS-iga.

Joonisel 7 on toodud männitõrva NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS ühendatud süsteemis DAD-ga registreeritud kromatogramm ning kromatograafilistele piikidele vastavate ioonide ekstraheeritud ioonkromatogrammide võrdlus.



Joonis 7. NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga mõõdetud männitõrva referentsproovi DAD-ga registreeritud kromatogramm lainepikkusel 290 nm (üleval) ning FT-ICR-MS abil salvestatud (kalibreerimata) ekstraheeritud ioonkromatogramm (all).

Männitõrva DAD-ga registreeritud kromatogrammi piikidele suudeti tuvastada kolm ühendt. Retentsiooniajale 9.240 min vastab ühend ioonvalemiga $[C_{21}H_{30}O_2+H]^+$ (*m/z*=315.23194), mis kuulub männitõrva biomarkerile metüüldehüdroabietaadile. Retentsiooniajale 10.900 min vastab ühend ioonvalemiga $[C_{19}H_{28}+O-2H+H]^+$ (*m/z*=271.20576), mis kuulub norabietatrieeni struktruuiga ühendile. Retentsiooniajale 11.668 min vastav ühend ioonvalemiga $[C_{20}H_{26}O_2-2H+Na]^+$ (*m/z*=319.16677), mis interpreteeriti dehüdrogeenitud didehüdroabietiinhappena. Kromatograafilisele piigile t_R = 17.310 min ei leitud massispektromeetri abil vastet. Tõenäoliselt on selle põhjuseks see, et ühend, mis elueerub sellel retentsiooniajal ei ioniseeru piisavalt hästi positiivses režiimis.

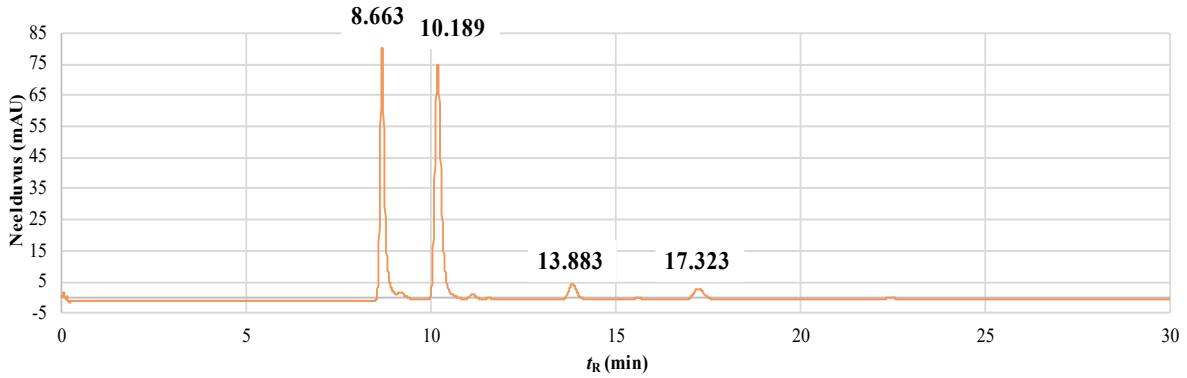
Võrreldes männivaigu ning männitõrva DAD kromatogramme on näha, et ühtegi kromatograafilist piiki ei saa lugeda ajaliselt kattuvaks. Männitõrva analüüsil leitud biomarkeri metüüldehüdroabietaadi põhjal saab aga oluliselt lühema andmetöötlusega kinnitada, et tegemist on just tõrva mitte männivaiguga. Võrreldes männivaigu ja –tõrva ekstraheeritud ioonkromatogramme on näha, et männitõrva referentsproovi puhul vastab ühele katioonvalemile vaid üks ühend samas kui männivaigu puhul omab sama *m/z* väärtust mitu erinevat ühendit. Töötlemata männivaigus on tasakaal erinevate $C_{20}H_{30}O_2$ brutovalemiga

isomeeride vahel (abietiinhape, pimaarhape jne), kuid männivaigu töötlemisel männitõrvaks nihkub see tasakaal praktiliselt täielikult abietiinhappe suunas. Selle põhjal võib järeldada, et tõenäoliselt on männivaigu referentsproovi puhul tegemst töötlemata männivaiguga samas, kui männitõrva referentsiproov on töödeldud.

4.5 Arheoloogilise proovi analüüsimine NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS meetodiga

Ühendatud süsteemi võimekuse testimiseks kasutati seda arheoloogilise proovi analüüsimiseks. Proov pärineb 16. sajandi laevavrakist (töönimega Nargen 1), mis leiti aastal 2015 a. Naissaare lähistel. Vrakist leiti hulk tõenäoliselt meditsiinilise otstarbega savi- ja klaasnõusid. Analüüsitav arheoloogiline proov pärineb ühe sellise väikese savinõu sisemusest (Lisa 8, Joonis 21). Tegemist on kleepuva ning tugeva, töödeldud puidu lõhnaga tumedat kollakaspruuni värvi seguga. Lisas 8 (Joonis 22) toodud mikroskoobipildil on näha, et tegemist on üsna klaasja materjaliga. Lisaks proovi üldisele kollakaspruunile värvile on proovi sisemuses näha ka punaseid ja musti tükikesi.

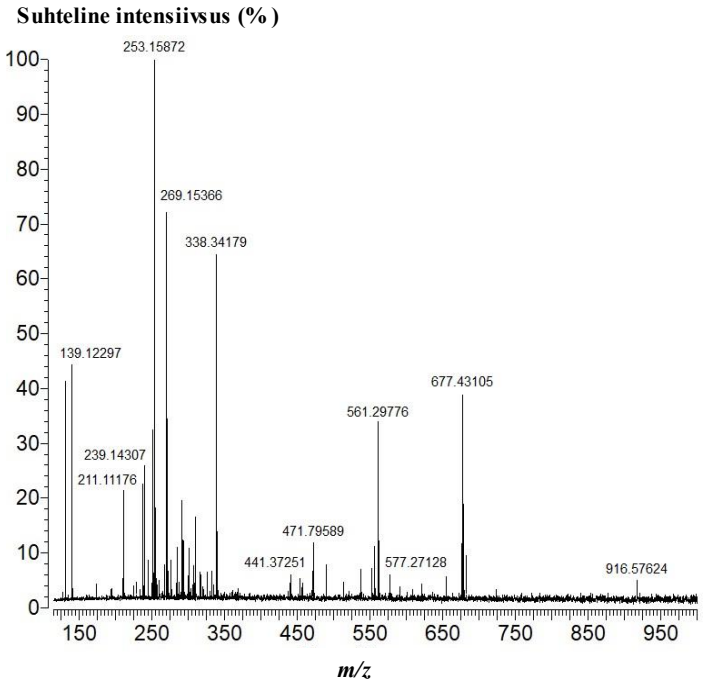
Võrdluseks mõõdeti esmalt eraldi arheoloogilise proovi NP-HPLC kromatogramm (vt Joonist 8) ja ESI(+)-FT-ICR-MS spekter (vt Joonist 9).



Joonis 8. Arheoloogilise proovi NP-HPLC kromatogramm. Solvendisüsteem EtOAc/Hex protsendilises vahekorras 15/85, voolukiirusel 0.4 mL/min, lainepikkusel 290 nm.

Arheoloogilise proovi NP-HPLC kromatogrammil (Joonis 8) on näha, et valitud solvendisüsteem tagas adekvaatse lahutuse. Oli võimalik eristada nelja piiki. Piik ajamomendil 8.663 min tundub kattuvat männivaigu referentsproovi piigiga (Joonis 2, peatükk 4.2) ning piik ajamomendil 10.189 min tundub kattuvat männitõrva referentsprooviga (Joonis 2, peatükk 4.2). Küll aga on raske teha järeldust, kas arheoloogiline proov on männivaigu või männitõrva sarnane ilma täiendava informatsioonita, mida pakub NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS süsteem.

Arheoloogilise proovi ESI-FT-ICR-MS spektris (Joonis 9) oli 82 piiki, millest intensiivsemad (suhteline intensiivsus üle 10%) valiti interperteerimiseks (toodud Lisas 9 Tabelis 4).



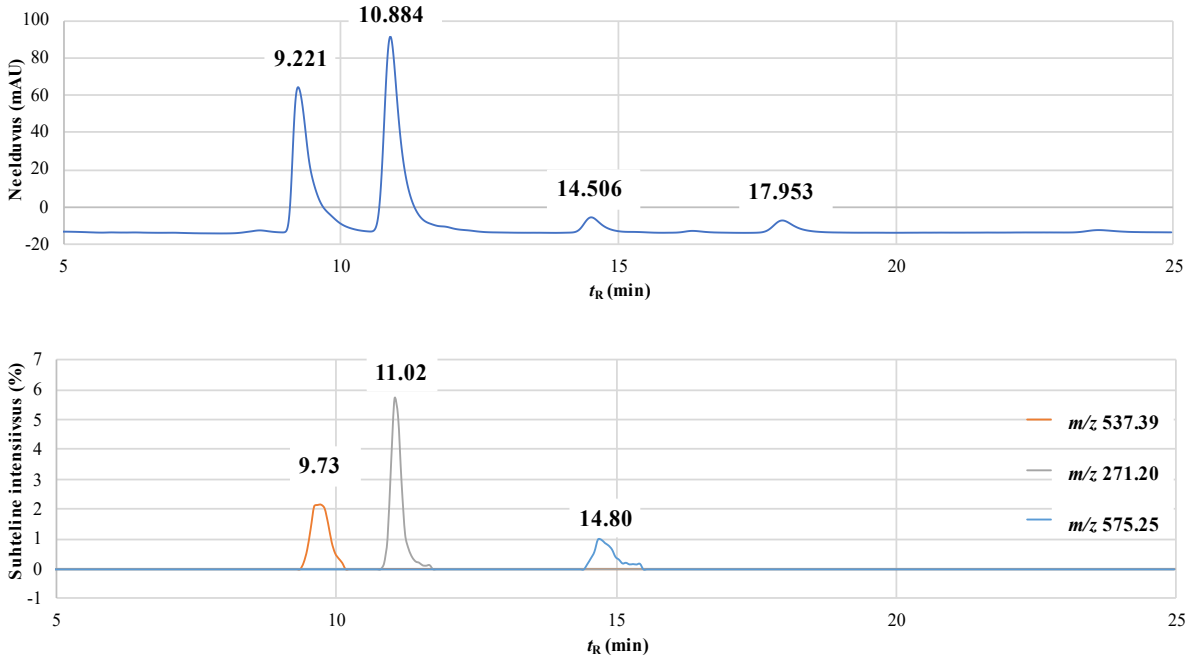
Joonis 9. Arheoloogilise proovi ESI(+)-FT-ICR-MS massispekter.

Kõige intensiivsem piik massispektris (Joonis 9) kuulus reteeni-põhisele ühendile ($[C_{18}H_{20}O+H]^+$, *m/z*=253.15872). Reteen on üks peamistest komponentidest männitõrvas ning seetõttu oli alust arvata, et reaalne proov sisaldab männitõrva. Seda kinnitavad ka teised intensiivsed piigid, mis tulenevad tõenäoliselt reteeni algstruktuuri omavatest ühenditest, nagu näiteks $[C_{18}H_{20}O_2+H]^+$ (*m/z*=269.15366) ja $[C_{18}H_{20}O_2+Na]^+$ (*m/z*=291.13560).

Erinevalt männitõrva ESI-FT-ICR-MS spektrist on Joonisel 9 näha mõningaid piike *m/z* vahemikus 440-680. Mitmed neist piikidest võivad kuuluda seskviterpenoidse struktuuriga ($C_{15}H_{24}$) ühenditele, näiteks *m/z* väärtusel 561.29777 tuvastati ioon $[2C_{15}H_{24}+5O+3CH_3-10H+K]^+$, *m/z* 513.35742 juures ioon $[2C_{15}H_{24}+5O+2CH_3-6H+H]^+$ ning *m/z* väärtusele 441.37252 vastab ioon $[2C_{15}H_{24}+2O+H]^+$. Tõenäoliselt on tegemist seskviterpenoidide hulka kuuluva karüofülleeni derivaatidega. $C_{15}H_{24}$ struktuuriga ühendeid leidub palju eeterlikes õlides. Karüofülleen on üks sellistest seskviterpenoididest. Üks tüüpiline taim, mille koostisosade hulka karüofülleen kuulub on näiteks naistepuna. Seega on ESI-FT-ICR-MS spektri põhjal alust arvata, et uuritav segu sisaldab valdavalt männitõrva, millele on lisatud aineid, mis sisaldavad eeterlikke õlisid.

Viimaks analüüsiti ka arheoloogiline proov ühendatud NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemiga. Joonisel 10 on võrdlevalt toodud arheoloogilise NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS

ühendatud süsteemis DAD-ga registreeritud kromatogramm ning kromatograafilistele piikidele vastavate ioonide ekstraheeritud ioonkromatogrammid. Nagu Joonisel 10 on näha, siis peaaegu igale DAD-ga detekteeritud piigile leiti vaste FT-ICR-MS-iga salvestatud kromatogrammis.



Joonis 10. NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga mõõdetud arheoloogilise proovi DAD-ga registreeritud kromatogramm lainepikkusel 290 nm (üleval) ning FT-ICR-MS abil salvestatud (kalibreerimata) ekstraheeritud ioonkromatogrammid (all).

Võrreldes arheoloogilise proovi ühendatud süsteemiga registreeritud retentsiooniaegu DAD-ga saadud kromatogrammidel männivaigu ning männitõrva referentsproovidega (vastavalt Joonised 6 ja 7, peatükk 4.4) on näha, et arheoloogilisel proovil on üks ajaline kattuvus männitõrva referentsprooviga retentsiooniaja 10.900 min juures. Sellele vastab norabietatrieeni struktuuriga ühend, millele omistati massispektris ioonvalem $[C_{19}H_{28}+O-2H+H]^+$ (*m/z*=271.20576). Kuna norabietatrieeni struktuuriga ühendid on peamised stabiilsemad vaheühendid enne abietiinhappe reteeniks oksüdeerumist on mõistlik järeldada, et arheoloogilises proovis sisaldub männitõrva. Retentsiooniajale 14.506 min vastab ühend katioonvalemiga $C_{39}H_{36}O_3Na^+$ ning ioonvalemiga $[C_{20}H_{30}O_2+C_{19}H_{28}+O-12H+Na]^+$ (*m/z* 575.25562), mis on suure tõenäosusega tekkinud abietiinhappe ($C_{20}H_{30}O_2$) ning norabietatrieeni ($C_{19}H_{28}$) kombineerumisel. Kromatograafilisele piigile retentsiooniajaga 9.221 min vastab ühend ioonvalemiga $[C_{35}H_{52}O_4+H]^+$ (*m/z* 537.39482), mis kuulub ilmselt naistepunas leiduvale tunnuskomponendile hüperforiinile. Piigid retentsiooniaegadel 14.506

min ja 9.221 min tuvastati NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga, mõõtes vaid ESI(+)-FT-ICR-MS-iga oli nende piikide intensiivsus liialt madal ning need jäeti interperteerimisest välja. Hüperforiini leid kinnitab ESI-FT-ICR-MS-iga saadud tulemusi, kus leiti eeterliku õli komponente (peamiselt karüofülleeni ja selle derivaate), mis leiduvad samuti naistepunas. Seega saab ka NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS andmete põhjal järeldada, et lisaks männitõrvale on üks osa proovist pärit naistepunast.

4.6 Järeldused NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi võimekuse kohta männivaiguliste materjalide analüüsimisel

NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemiga keeruliste männivaiguliste proovide analüüsimsel on eeliseid mõlema instrumendi eraldi kasutamise ees. Kromatograafilise lahutuse tõttu oli igas masskromatogrammi massispektris vähem massipiike, mis lihtustas oluliselt massispektreid (võrdlus Lisas 7) ja nende interprteerimist. Ühendatud süsteem demonstreeris ka võimekust eraldada sama katioonvalemi, kuid erineva struktuuriga ühendeid, mis on võimatu kasutades vaid ESI-FT-ICR-MS instrumenti. Isomeeride lahutamine on omane NP-HPLC-le ning see võimaldab erinevate isomeeride struktuuride uurimisel täpsemini tuvastada komponente männivaigulistes (ja ka muud tüüpi) materjalides. Suureks eeliseks on ka see, et ühendatud süsteemi puhul on võimalik kromatograafiliste piikide retentsiooniaegadele vastavate biomarkerite tuvastamine materjalide vähem polaarses osas. Seda demonstreerib männitõrva referentsproovis leitud metüüldehüdroabietaat ning reaalses arheoloogilises proovis leitud hüperforiin. Viimaks võimaldab selline ühendatud süsteem teostada analüüse lihtsamini, kui varasemalt töögrupis arendatud RP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteem. Ideaalis ei ole operaatoril vaja pärast analüüsi käivitamist enam mõõtmisprotsessi sekkuda (RP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS-i kasutamisel oli vajalik pidev ESI-sse suunduva voolu manuaalne sättimine, et tagada pihustuse stabiilsus). Ainsa potentsiaalselt problemaatilise ühenduskohana on voolujagaja, mille puhul tuleb paika sättida õige voolujaotus ning mis võib olla põhiliseks lekke allikaks. Ülejäänud süsteem ei vaja peenhäälestust analüüsi teostamise käigus.

Samas on NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteemil ka mõned puudused. Peamiseks puuduseks on, et NP-HPLC ei sobi polaarsemaid ühendeid sisaldavate proovide (siin töös abietiinhappe ja heleda kampoli referentsproovid) kromatograafiliseks lahutamiseks. Kuigi polaarseid ühendeid leidus ka männivaigu ning männitõrva referentsproovides oli nende proovide puhul tunnusühendid pigem mittepolaarsed. Teema edasi uurimisel oleks mõistlik keskenduda kromatograafilise lahutuse saavutamisele ka polaarsemate proovide puhul. Ühe

võimalusena võiks veel testida erinevaid NP-HPLC solvente, mittevesikeskkonnas pöördfaaskromatograafiat, mille jaoks töös rakendatud aminokolonn on sobilik. Samuti oleks mõistlik jätkata veelgi paremate kromatograafiliste tingimuste otsimist männivaigu ja -tõrvale sarnastes proovides.

Mainitud probleemidest hoolimata võib järeldada, et NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS ühendatud süsteem annab täpsustavat informatsiooni keeruliste vaiguliste proovide kohta. Süsteem osutus sobivaimaks männitõrva, männivaigu ning männitõrva sisaldava reaalse proovi analüüsimiseks.

5 KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli ühendada omavahel NP-HPLC ja ESI(+)-FT-ICR-MS seadmed, mis võimaldaks uurida mitmekomponendilisi vaiguliste materjalide segusid. Arendustöö oli mitmeetapiline.

Kõigepealt töötati välja uudne NP-HPLC meetod (selleks kasutati aminokolonni) männivaiguliste materjalide analüüsimiseks. Töö käigus katsetati erinevaid solvendisüsteeme ning solventide vahekordi, leidmaks optimaalsed tingimused, mis võimaldas proovide kromatograafilisi jookse omavahel ka võrrelda. Välja töötatud normaalfaaskromatograafiliste meetodite baasil arendati töötav NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS mõõtesüsteem ning optimeeriti metoodika keeruliste männivaiguliste proovide analüüsimiseks.

Arendustöö käigus lahendati mitmeid probleeme ja modifitseeriti olemasolevaid lahendusi. Nagu näiteks, instrumendid ühendati uudsel viisil, ühendusetapis lisati abisolvent (MeOH) NP-HPLC solventidele, selleks, et saavutada stabiilne ESI pihustus ja lõpuks töötati välja mõõtmismetoodikad erinevate männivaiguliste materjalide jaoks. Välja töötatud NP-HPLC ja ESI(+)-FT-ICR-MS-i ühendamise viis võimaldas vähendada potentsiaalsete lekete ning korratavuse probleeme, muutes ühendatud süsteemiga analüüsimise stabiilsemaks ning vähem tülikaks.

NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi katsetused teostati erinevate männivaiguliste referentsproovide (abietiinhape, hele kampol, männivaik ja männitõrv) peal. Leiti, et NP-HPLC ja seega ka ühendatud süsteem on sobilik männitõrva ning männivaigu referentsproovide analüüsimiseks ning omavaheliseks eristamiseks. Ühendatud süsteemiga analüüsi teostamine vähendas oluliselt massispektrites esinevate piikide hulka, mis lihtsustas massispektrite interperteerimist. Samuti võimaldas NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS lahutada omavahel sama katioonvalemi, kuid erineva struktuuriga komponente.

Viimaks testiti NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS süsteemi sobilikkust arheoloogilise proovi analüüsimiseks. NP-HPLC kromatogrammi piikidele vastavate ekstraheeritud ioonkromatogrammide alusel tuvastati, et tegemist on männitõrva ja mõningal määral ka naistepunast pärit eeterlikke õlisid sisaldava seguga.

Töö tulemusena leiti, et välja töötatud NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS mõõtmismetoodika on sobilik keerulise koostisega männivaiguliste materjalide analüüsimiseks.

6 SUMMARY

Assessment of the suitability of normal phase liquid chromatography and mass-spectrometry hybrid system for analysis of materials related to pine resin

Peep Põdder

The aim of this work was to connect the NP-HPLC and ESI(+)-FT-ICR-MS instruments into a hybrid system that would allow for the analysis of materials related to pine resin. The development work was done in several steps.

Firstly, a novel NP-HPLC method (using an amino column) was developed for the analysis of materials related to pine resin. Several different solvent systems and proportions were tested in order to find optimal conditions which enabled comparison of chromatograms. Based on those normal phase chromatography methods a working NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS measurment system was developed and optimized for the analysis of pine resin related materials.

During the development work several problems were solved and existing solutions were modified. For example, the instruments were connected in a novel way, during the connection aiding solvent (MeOH) was added to the NP-HPLC solvents to achieve stable ESI spray. Finally, measurment methods were developed for different pine resin related materials. The developed system of connecting NP-HPLC and ESI(+)-FT-ICR-MS made it possible to reduce potential leaks and problems with repeatability. This made analysis with the hybrid system more stable and less troublesome.

The NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS system was tested on several different reference samples related to pine resin (abietic acid, colophony, pine resin and pine tar). It was found that NP-HPLC and thus the hybrid system are suitable for analyzing and distinguishing pine resin and pine tar. Conducting analysis with the hybrid system reduced the number of peaks present in mass-spectra, which simplified their interpertation. In addition to that the NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS was able to seperate components that had the same cation formula, but different structures.

Finally, the NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS hybrid system was tested on an archeological sample. Based on the extracted ion chromatograms that corresponded to NP-HPLC chromatogram peaks it was concluded that the sample is a mixture of pine tar and essential oils originating from St. John’s wort.

In conclusion, it was found that the developed NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS measurment method is suitable for the analysis of pine resin related materials with complex compositions.

7 KASUTATUD KIRJANDUS

1. *Organic Mass Spectrometry in Art and Archeology;* Colombini, M. P. Modugno, F., Eds.; Wiley: Chichester, United Kingdom, 2009, pp 3-74.
2. Mills, J. S.; White, R. Natural Resins of Art and Archeology Their Sources, Chemistry, and Identification, *Stud. Conserv.* **1977**, *22*, 12-31.
3. Mills, J. S.; White, R. *Organic Chemistry of Museum Objects*, 2nd ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, United Kingdom, 2003, pp 95-128.
4. Scalarone, D.; Lazzari, M.; Chiantore, O. Aging Behaviour and Pyrolytic Characterisation of Diterpenic Resins Used as Art Materials: Colophony and Venice Turpentine. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **2002**, *66*, 345-361.
5. Smith, R. H. *Xylem monoterpenes of pines: distribution, variation, genetics, function*; https://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/psw_gtr177 viimati alla laetud 22.05.2021.
6. Masschelein-Kleiner, L. *Ancient Binding Media, Varnishes and Adhesives*; ICCROM: Rome, Italy, 1995, pp. 64-80.
7. Beck, C. W.; Borromeo, C. Ancient pine pitch: technological perspectives from a Hellenistic shipwreck. *MASCA research papers in science and archaeology*. **1990**, 7, 51-58.
8. Langenheim, J. H. *Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany*; Timber Press: Cambridge, United Kingdom, 2003, pp 51-140.
9. Regert, M.; Garnier, N.; Decavallas, O.; Cren-Olivè, C.; Ronaldo, C. Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, *14*, 1620-1630.
10. Vahur, S.; Kriiska, A.; Leito, I. Investigation of the adhesive residue on the flint insert and the adhesive lump found from Pulli early Mesolitihc settlement site (Estonia) by micro-ATR-FT-IR spectroscopy. *Estonian J. Archeol.* **2011**, *15* (1), 3-17.
11. Vandenabeele, P.; Wehling, B.; Moens, L.; Edwards, H.; De Reu, M.; Van Hooydonk, G. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *407*, 261-274.
12. Huong, P. V. New possibilities of Raman micro-spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **1996**, *11*, 17-28.
13. Andreotti, A.; Bonaduce, I.; Colombini, M. P.; Gautier, G.; Modugno, F.; Ribechini, E. Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy,

Resinous and Proteinaceous Materials in Unique Paint Microsample. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4490-4500.

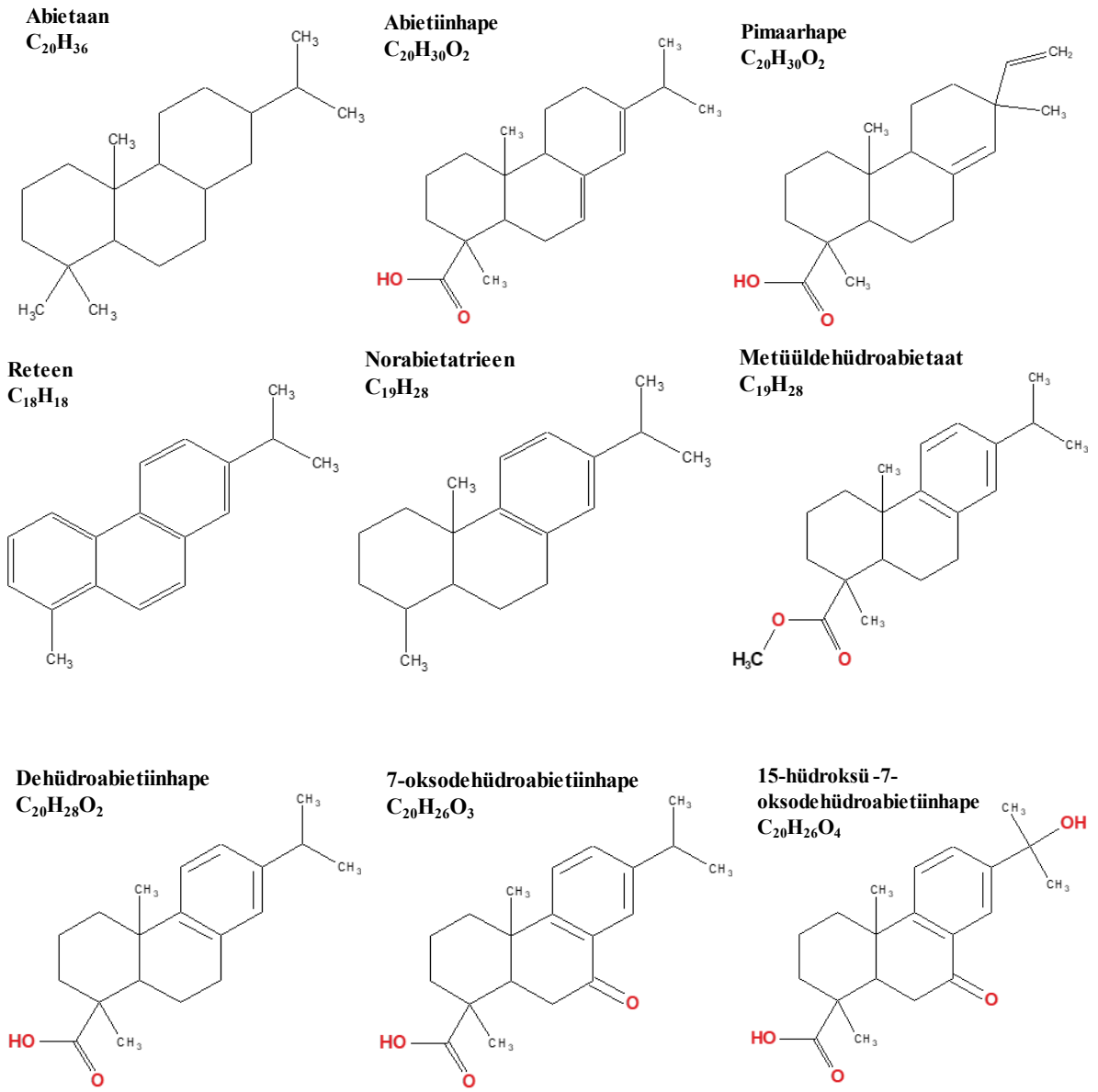
14. Ribechini, E.; Orsini, S.; Silvano, F.; Colombini, M. P. Py-GC/MS, GC/MS and FTIR Investigations on Late Roman-Egyptian Adhesives from *Opus Sectile*: New Insights into Ancient Recipies and Technologies. *Anal, Chim. Acta*. **2009**, *678*, 79-87.
15. Petit-Dominguez, M. D.; Martinez-Maganto, M. MCF Fast Derivatization Procedure for the Identification of Resinous Deposit Components from the Inner Walls of Roman Age Amphorae by GC-MS. *Talanta.* **2000**, *51* (4), 727-734.
16. Ardrey, R. E. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, 1st ed.; Wiley: Chichester, United Kingdom, 2003, 6-15.
17. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Donald, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed.; Wiley: Chichester, United Kingdom, 2010.
18. Martin, P.; Archier, P.; Viellescazes, C.; Pistre, S. HPLC Coupled with Fluorimetric Detection for the Identification of Natural Resins in Archaelogical Materials. *Chromatographia* **2001**, *53*, 380-384.
19. Van den Berg, K. J. *Analysis of Diterpenoid Resins and Polymers in Paint media and Varnishes*, FOM Institute AMOLF, Amsterdam, Netherlands, (MOLART Report 10), 2003, pp 11-74.
20. McKeon, L. *Characterization and Determination of Rosin Compositions Using Analytical Approaches*. PhD thesis, University of Dublin, 2014.
21. Nilsson, U.; Berglund, N.; Lindahl, F.; Axelsson, S.; Redeby, T.; Lassen, P.; Karlberg, A.-T. SPE and HPLC/UV of Resin Acids in Colophonium Containing Products. *J. Sep. Sci*. **2008**, *31*, 2784-2790.
22. Hroboňová, K.; Lehotay, D. J.; Skačáni, I.; Čižmárik, J. HPLC Determination and M MS Identification of Dehydroabietic Acid and Abietic Acid in Propolis. J. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 1725–1735.
23. Wilson, W. B.; Hayes, H. V.; Sander, L. C.; Campiglia, A. D.; Wise, S. A. Qualitative Characterization of SRM 1597a Coal Tar for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Methyl-Substituted Derivatives via Normal-Phase Liquid Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 5171-5183.
24. Karonen, M.; Loponen, J.; Ossipov, V.; Pihlaja, K. Analysis of Procyanidins in Pine Bark with Reversed-Phase and Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2004**, *522*, 105-112.

25. Zareva, S.; Kuleff, I. The Application of the Derivative IR-Spectroscopy and HPLC-ESI-MS/MS in the Analysis of Archaeology Resin. *Spectrochim. Acta. A.* **2010**, *76*, 283-286.
26. McIver, R. T.; McIver, J. R. *Fourier Transformation Mass Spectrometry; Principles and Applications*; IonSpec Corporation: California, USA, 2006, pp 24-30.
27. Thomson, B. A. Atmospheric Pressure Ionization and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry – Together at Last. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1988**, *9*, 187-193.
28. De Hoffman, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons: Chichester, United Kingdom, 2007, pp 154-164.
29. Vahur, S.; Teearu, A.; Haljasorg, T.; Burk, P.; Leito, I.; Kaljurand, I. Analysis of Dammar Resin with MALDI-FT-ICR-MS and APCI-FT-ICR-MS. *J. Mass. Spectrom.* **2012**, *47*, 392-409.
30. Mofikoya, O. O.; Mäkinen, M.; Jänis, J. Chemical Fingerprinting of Conifer Needle Essential Oils and Solvent Extracts by Ultrahigh-Resolution Fourier Transformation Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *ACS Omega.* **2020**, *5*, 10543-10552.
31. Dehghanizadeh, M.; Cheng, F.; Jarvis, J. M.; Holguin, F. O.; Brewer, C. E. Characterization of Resin Extracted from Guayule (*Parthenium argentatum*): A Dataset Including GC-MS and FT-ICR MS. *DataBrief* . **2020**, *31*, 105989.
32. Han, F.; Li, Y.; Zhang, X.; Song, A.; Zhang, J.; Yin, R. Comparitive Study of Direct Injection Analysis and Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Identification of Chemical Constituents in Kudiezi Injection by FT-ICR-MS. *Int. J. Mass. Spectrom.* **2016**, *405*, 32-38.
33. Han, F.; Li, Y.; Mao, X.; Xu, R.; Yin, R. Characterization of Chemical Constituents in Rhodiola Crenulate by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer (HPLC-FT-ICR-MS). *J. Mass. Spectrom.* **2016**, *51*, 363-368.
34. Emmett, M. R.; White, F. M.; Hendrickson, C. L.; Shi, D. H.; Marshall, A. G. Application of Micro-Electrospray Liquid Chromatography Techniques to FT-ICR-MS to Enable High-Sensitivity Biological Analysis. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1998**, *9*, 333-340.
35. Frahm, J. L.; Howard, B. E.; Heber, S. Muddiman, D. C. Accessible Proteomics Space and its Implications for Peak Capacity for Zero-, One- and Two-Dimensional Separations Coupled with FT-ICR and TOF Mass Spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **2006**, *41*, 281-288.

36. Kovačević, B.; Barić, D.; Maksić, Z. B. Basicity of exceedingly strong non-ionic organic bases in acetonitrile —Verkade's superbase and some related phosphazenes., *New J. Chem.* **2004**, *28*, 284-288.
37. Lababidi, S.; Schrader, W. Online normal-phase high-performance liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: Effects of different ionization methods on the characterization of highly complex crude oil mixtures. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2014**, *28* (12), 1345-1352.
38. Sun, C.; Zhao, Y-Y.; Curtis, J. M. A study of the ozonolysis of model lipids by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26* (8), 921-930.
39. Veinla, M. *HPLC ja FT-ICR-MS tandeminstrumendi arendamine keerukate looduslike materjalide analüüsimiseks*. Magistritöö, Tartu Ülikool, 2019.
40. Oro, N. E. *Analysis of Nitrogen Species in Gas Oils Using High Performance Liquid Chromatography and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, PhD thesis, University of Alberta, 2012.
41. Benzie, F. F.; Wachtel-Galor, S. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd ed.; CRC Press/Taylor & Francis: London, United Kingdom, 2011, pp 211-229.

8 LISAD

LISA 1



Joonis 1. Abietaani, abietiinhappe, pimaarhappe, reteeni, norabietatrieeni, metüüldehüdroabietaadi, dehüdroabietiinhappe, 7-oksodehüdroabietiinhappe ja 15-hüdroksü-7-oksodehüdroabietiinhappe struktuurid.

LISA 2

Tabel 1. Kõik NP-HPLC jaoks katsetatud solvendisüsteemide isokraatilised %-lised vahekorrad. Rohelisega on tähistatud need solventide %-lised vahekorrad, millega saavutati hea kromatograafiline lahutus ja kollasega need millega teostati edasised katsetused NP-HPLC-ESI(+)-FT-ICR-MS-iga.

Solvendisüsteemid	**Protsendilised vahekorrad**			
	Abietiinhape	**Hele kampol**	**Männivaik**	**Männitõrv**
DCM/EtOAc	60/40, 50/50, 40/60, 30/70	60/40, 50/50, 40/60, 30/70	60/40, 50/50, 40/60, 30/70	60/40, 50/50, 40/60, 30/70
EtOAc/Hex	60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 15/85	60/40 50/50, 40/60, 30/70, 15/85	40/60, 30/70, 20/80, 10/90, 15/85, 5/95	45/55, 35/65, 30/70, 25/75, 20/80, 15/85, 10/90, 5/95
DCM/Hex	55/45, 45/55, 35/65, 25/75	55/45, 45/55, 35/65, 25/75	60/40, 45/55, 40/60, 30/70	60/40, 45/55, 40/60, 30/70

Abietiinhappe jaoks valiti algpunktideks järgmised protsendilised vahekorrad: DCM/EtOAc 50/50, EtOAc/Hex 50/50 ning DCM/Hex 55/45.

Heleda kampoli jaoks valiti algpunktideks järgnevad protsendilised vahekorrad: DCM/EtOAc 50/50, EtOAc/Hex 50/50 ja DCM/Hex 55/45.

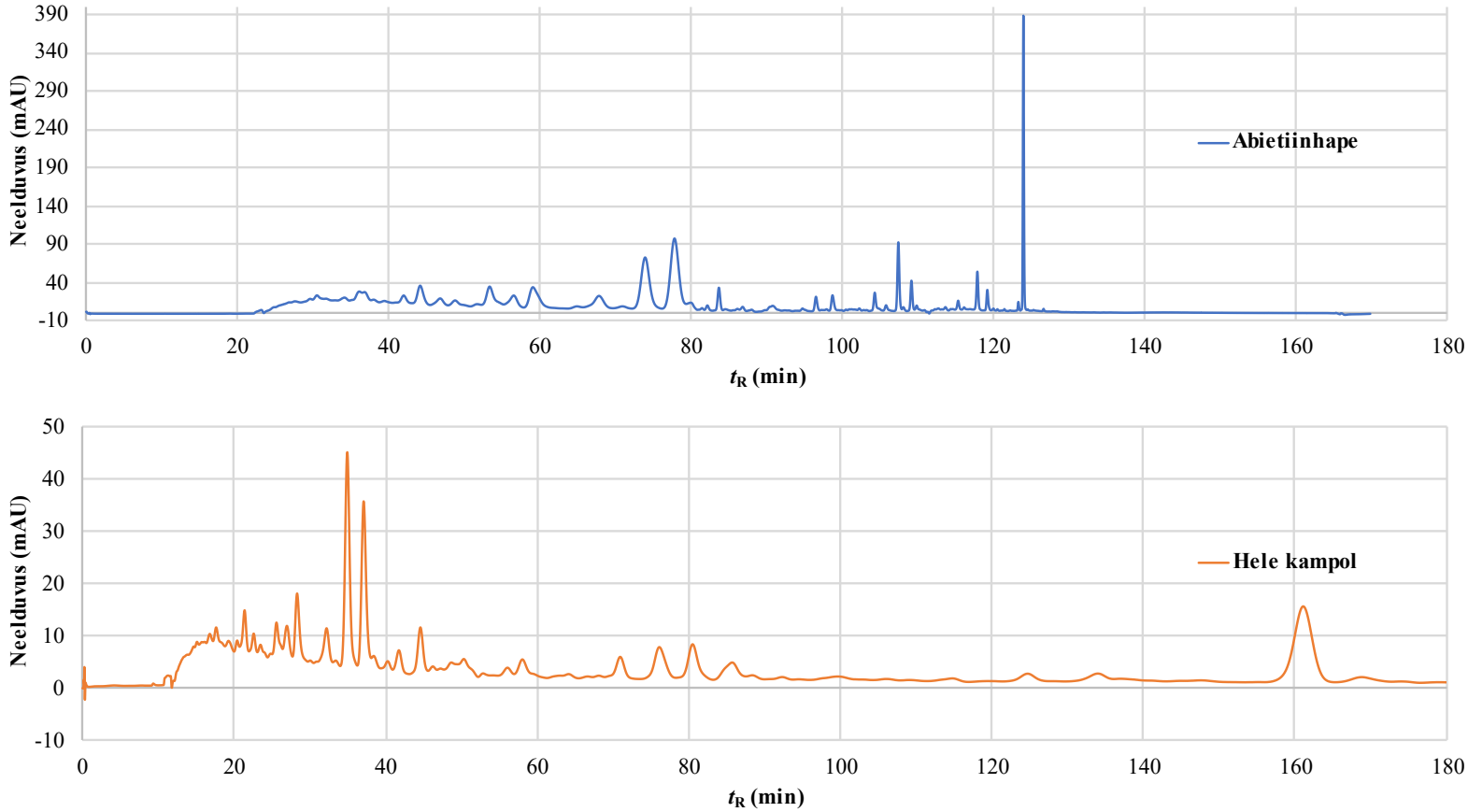
Männivaigu jaoks valiti algpunktideks DCM/EtOAc 40/60, EtOAc/Hex 30/70 ja DCM/Hex 45/55 protsendilised vahekorrad ja männitõrva jaoks DCM/EtOAc 50/50, EtOAc/Hex 25/75 ja DCM/Hex 45/55.

LISA 3

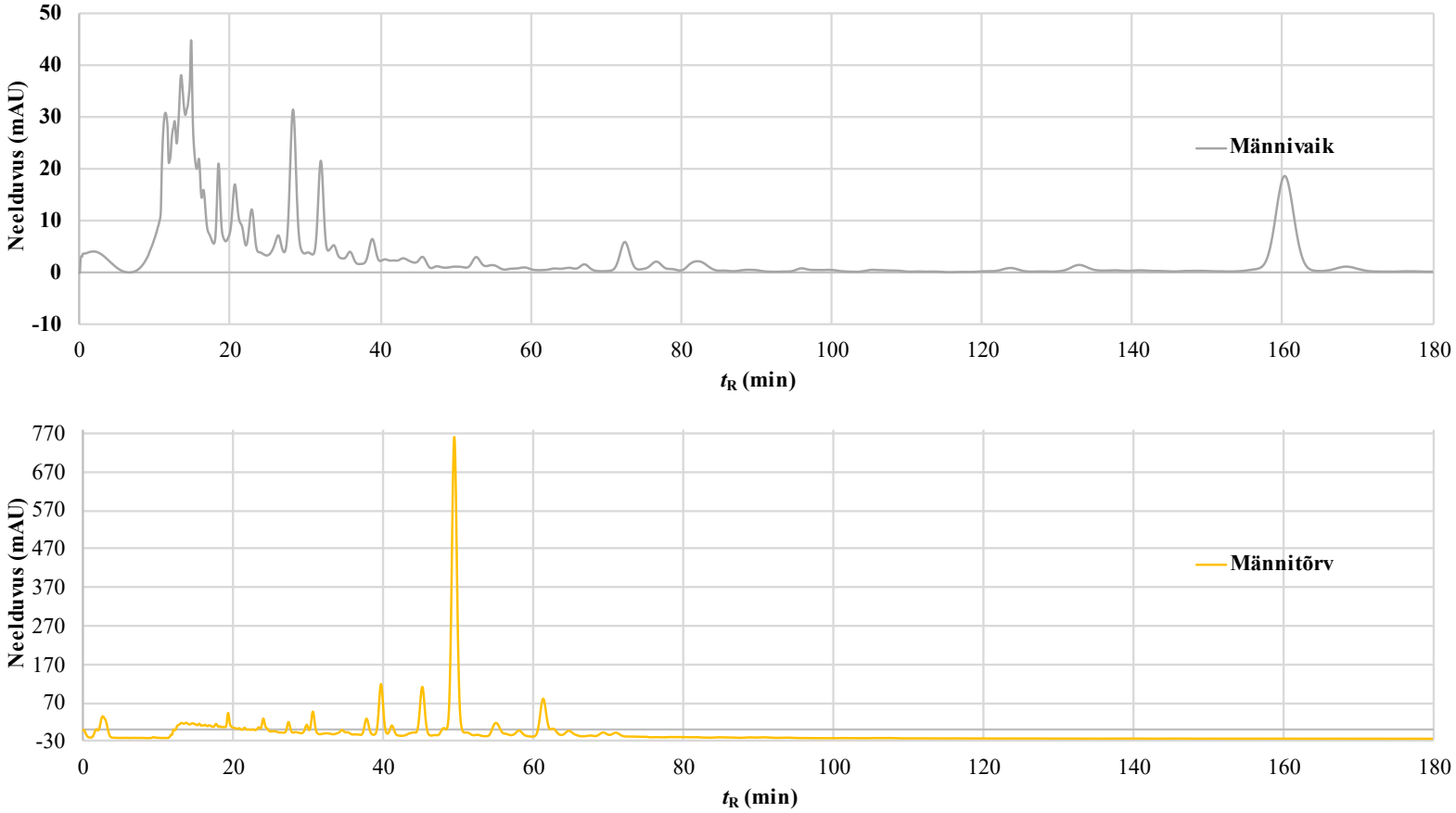
Tabel 2. ESI-FT-ICR-MS analüüsil kasutatud sisekalibrandid ning kalibrantide lahuses nende kontsentratsioonid.

Brutovalem (protoneeritud)	**Iooni täpne *m/z***	**Kontsentratsioon kalibrantide lahuses (mM)**
$C_8H_{15}N_2^+$	139.12297	0.604
$C_{12}H_{26}N_4P^+$	257.18896	0.125
$C_{14}H_{40}N_7P_2^+$	368.28149	0.125
$C_{18}H_{29}N_4BrP^+$	411.13077	0.125
$C_{26}H_{45}N_7ClP_2^+$	552.28947	0.125
$C_{26}H_{64}N_{13}P_4^+$	682.43526	0.125
$C_{44}H_{82}N_{13}P_4^+$	916.57611	0.125

LISA 4



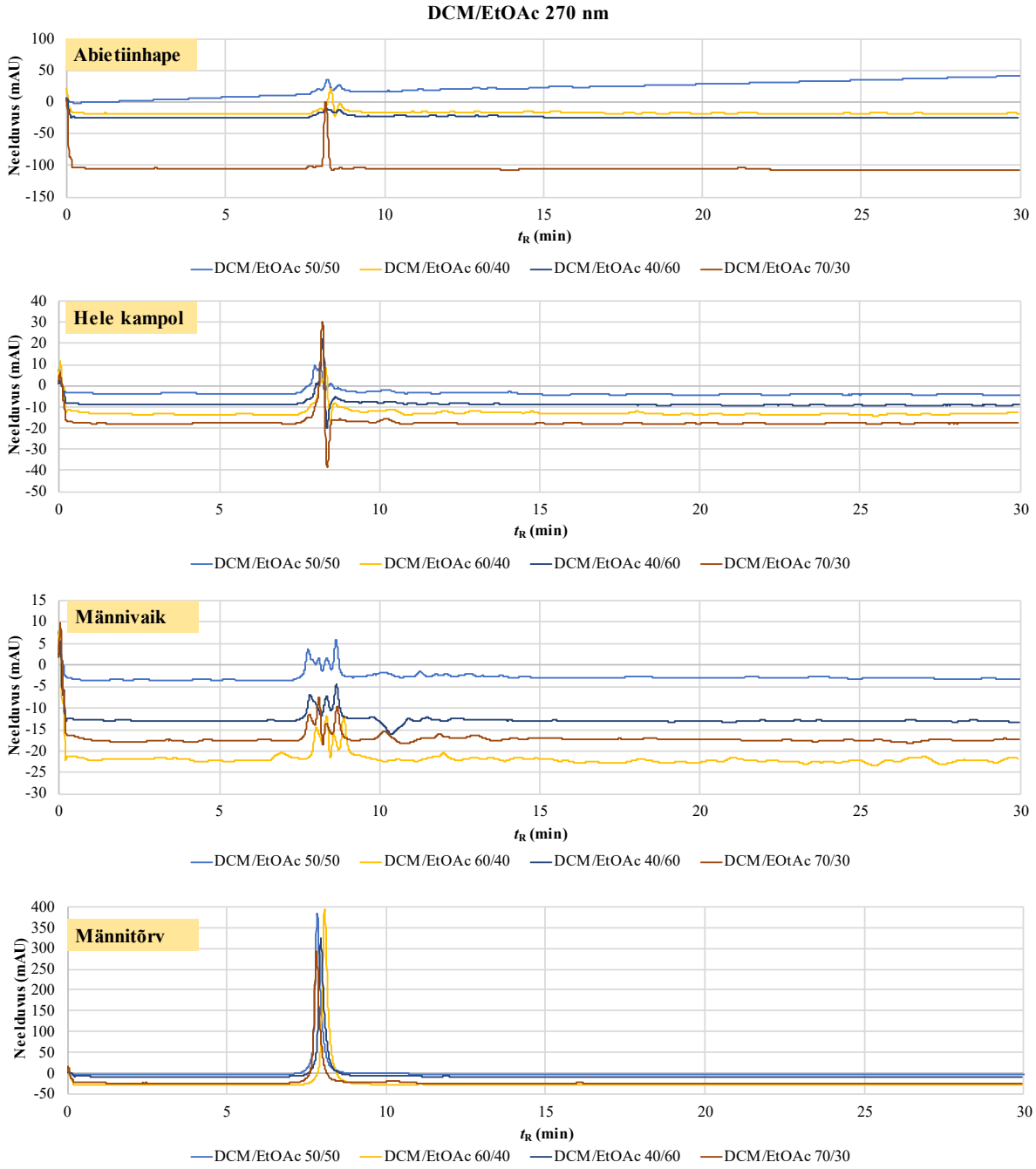
Joonis 2. Abietiinhappe ja heleda kampoli referentsproovide RP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 254 nm.



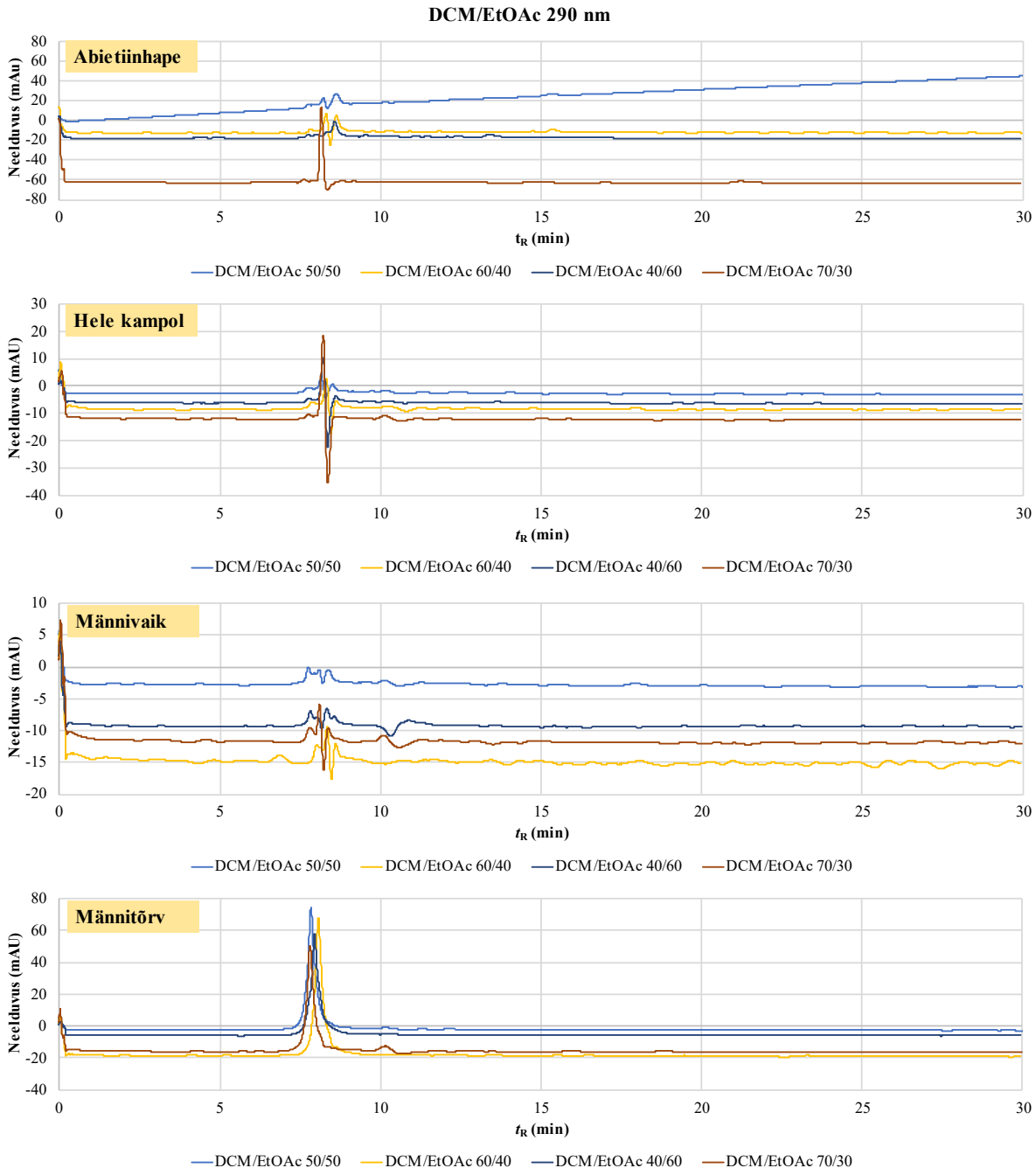
Joonis 3. Männivaigu ja männitõrva referentsproovide RP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 254 nm.

LISA 5

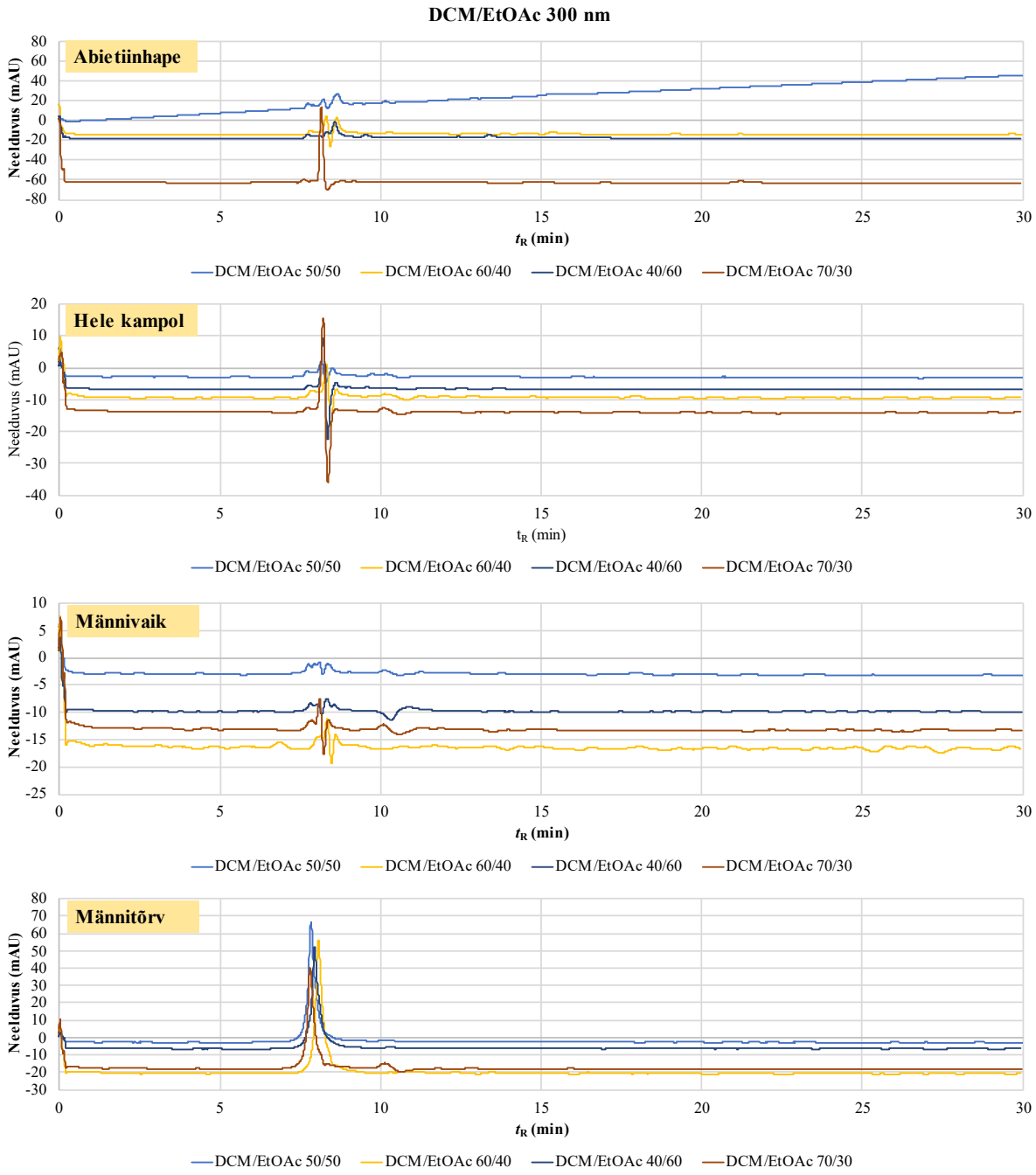
Siin ja edaspidi (kõik lisas 5 toodud kromatogrammid) märgib langus 7. minuti läheduses negatiivsesse surnud aega. Baasijoone triivimine võib tuleneda mitmest põhjusest, kuid kõige tõenäolisemalt on see põhjustatud solventide oma neeldumisest muude neeldumiste puudumisel. Kromatogrammidel, mille baasijoon jäi alla poole nulli on esinenud probleem masinasisel nullimisel.



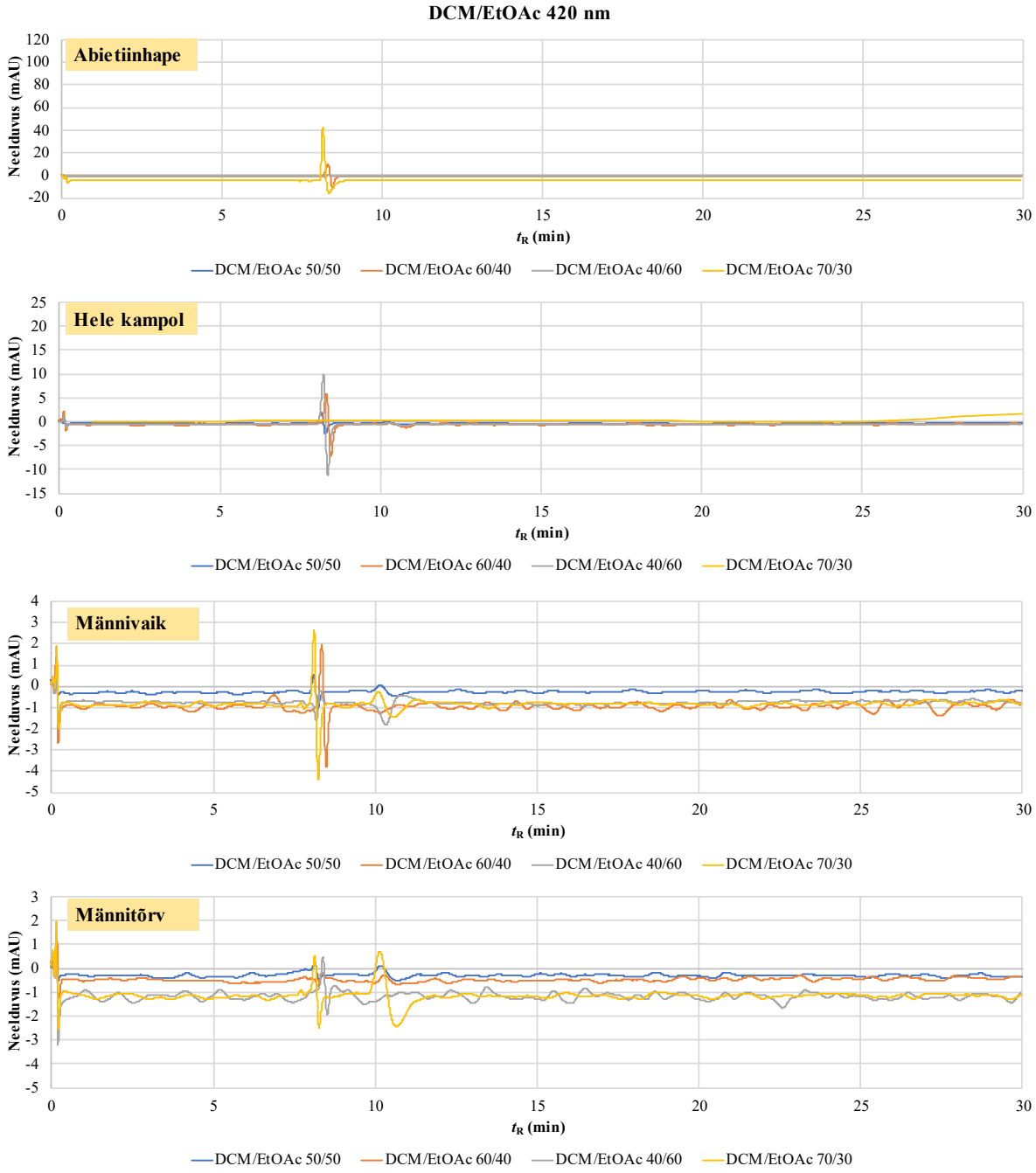
Joonis 4. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 270 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/EtOAc solvendisüsteemiga.



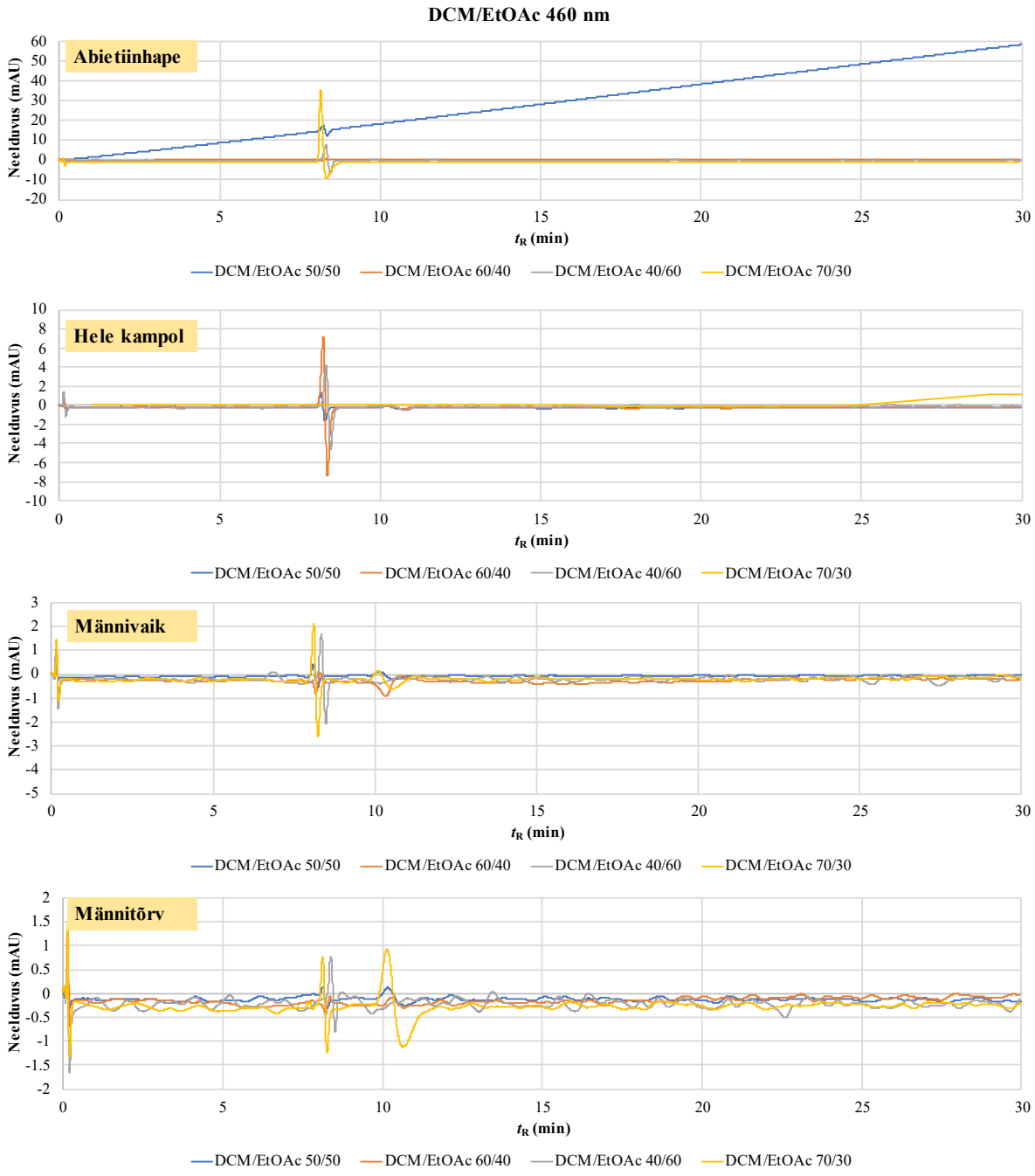
Joonis 5. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 290 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/EtOAc solvendisüsteemiga.



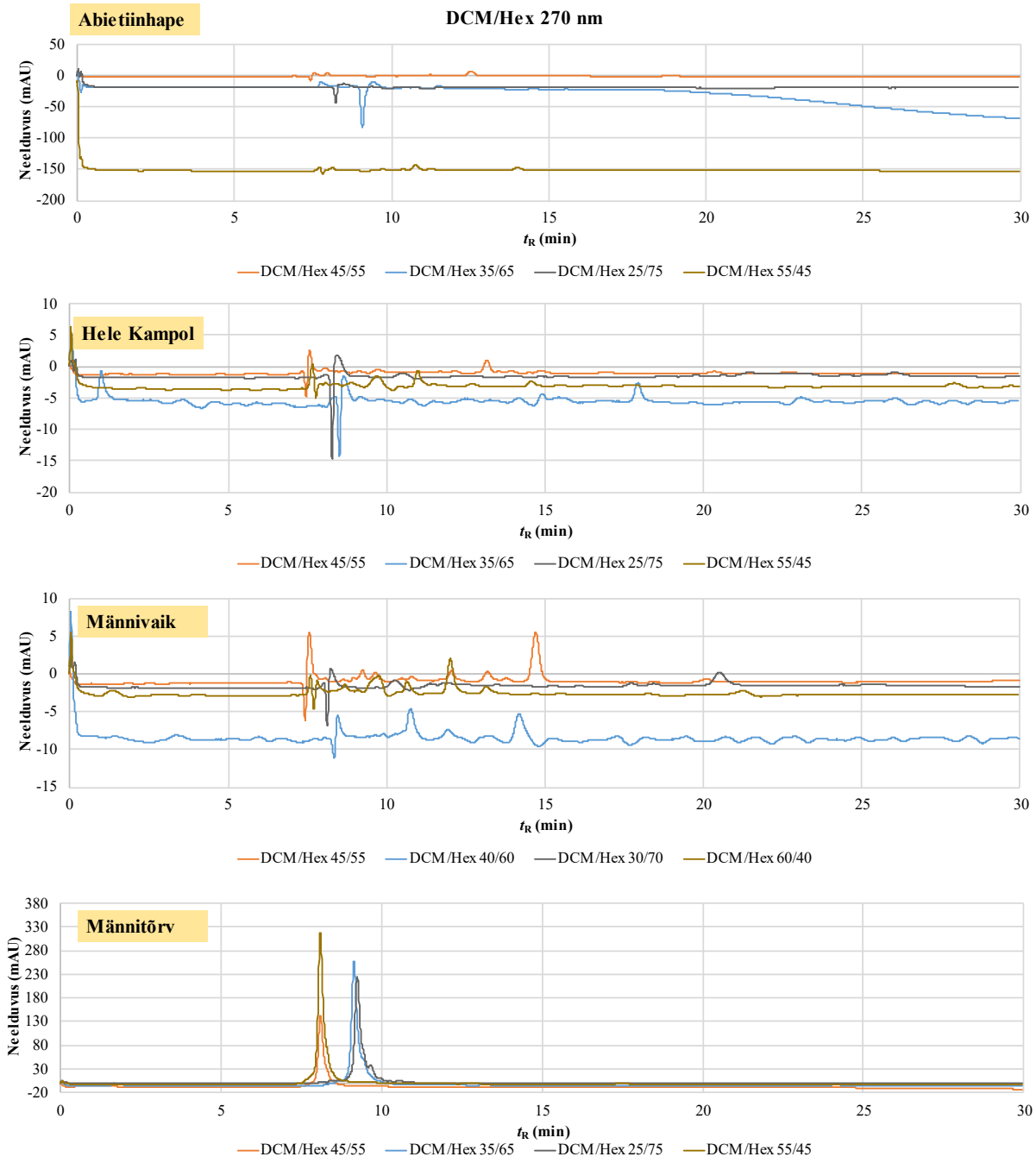
Joonis 6. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 300 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/EtOAc solvendisüsteemiga.



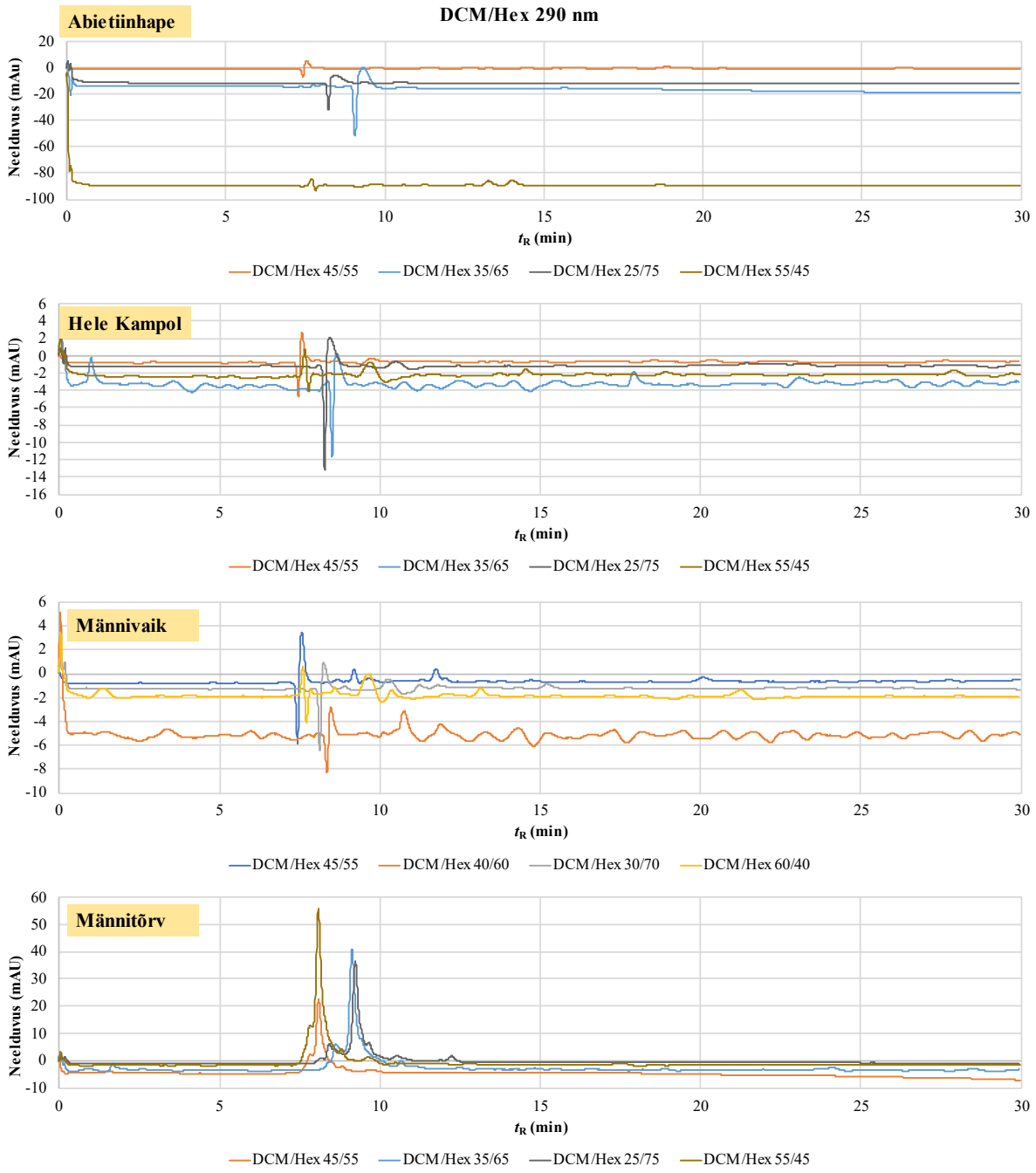
Joonis 7. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 420 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/EtOAc solvendisüsteemiga.



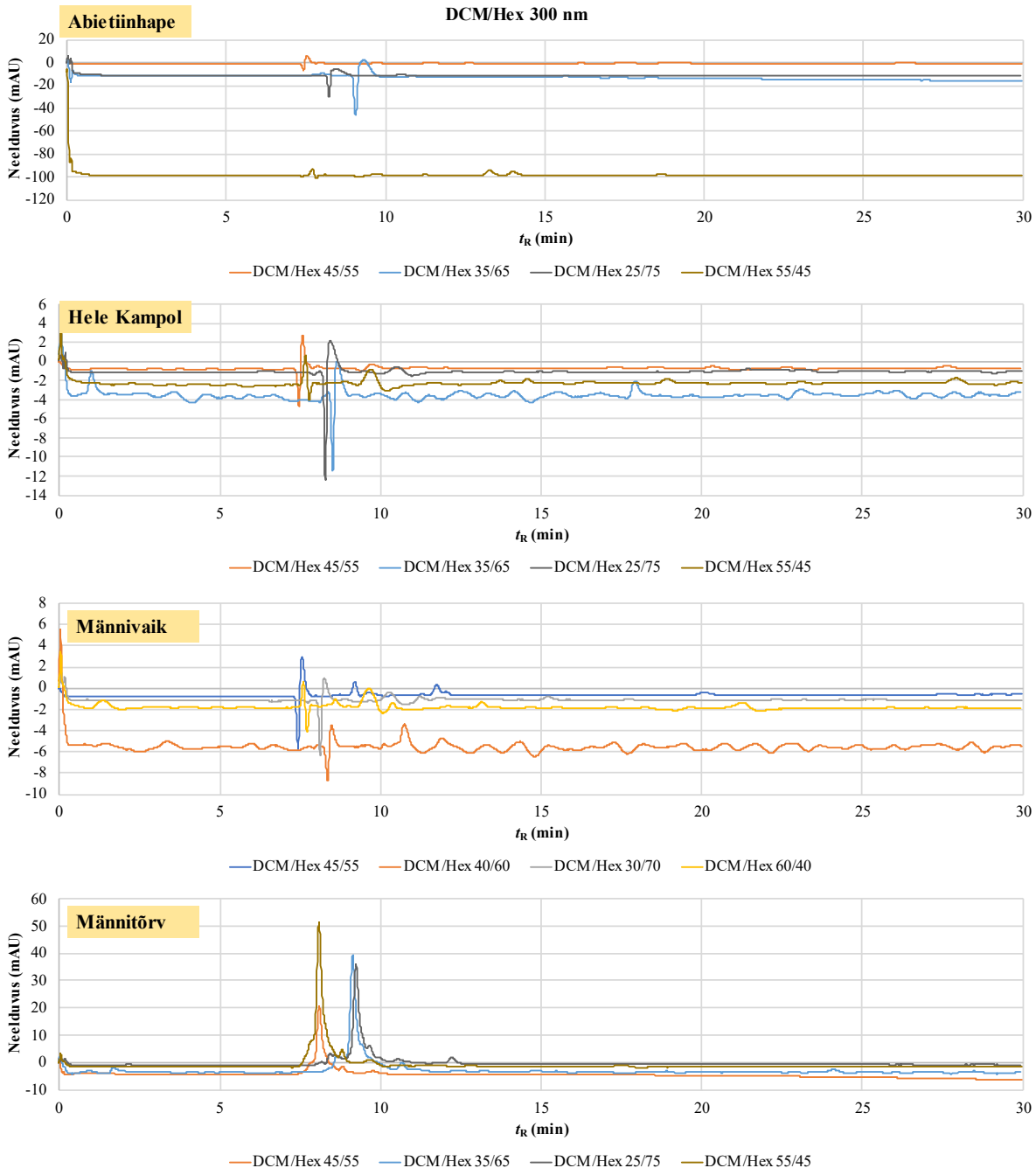
Joonis 8. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 460 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/EtOAc solvendisüsteemiga.



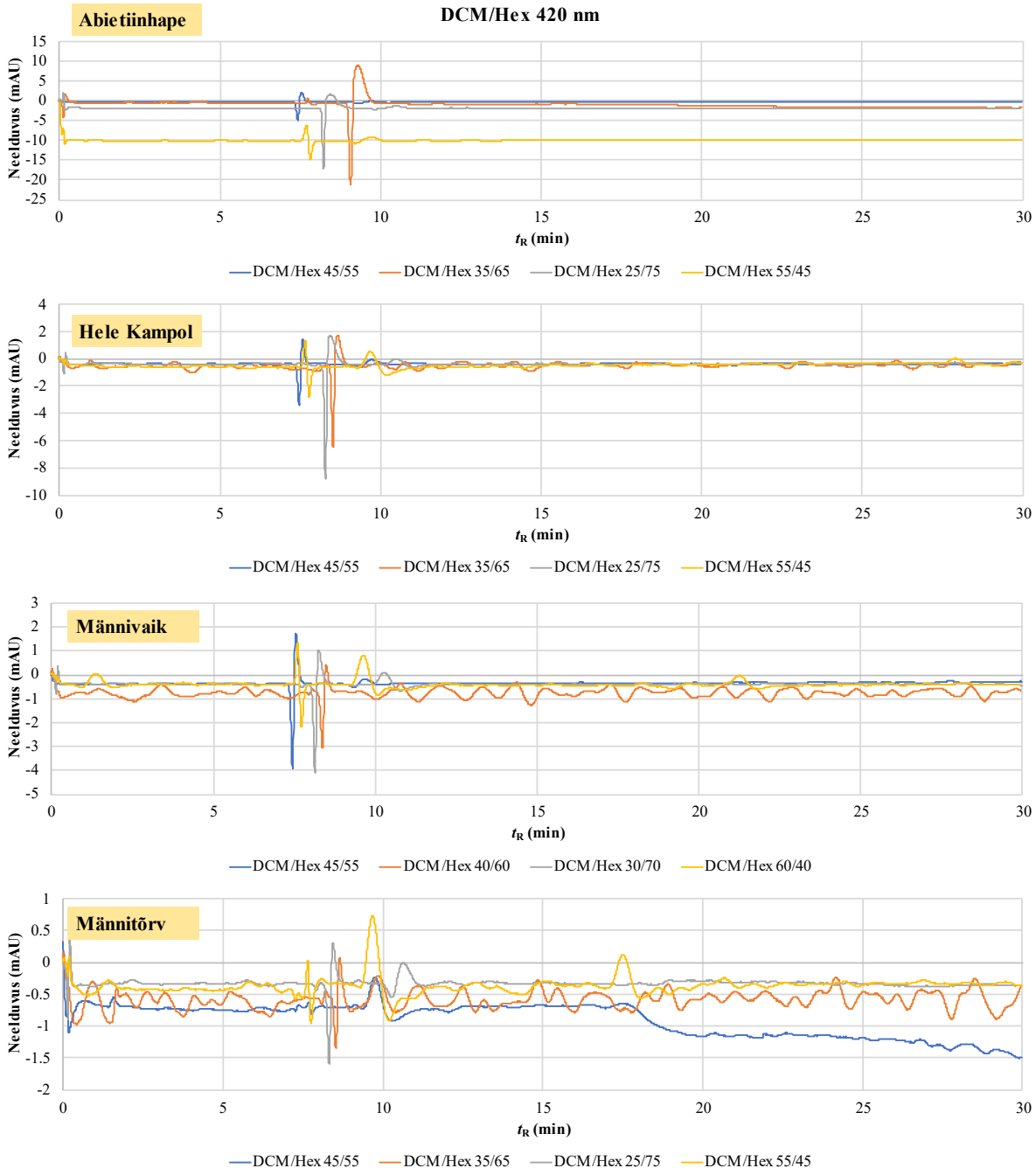
Joonis 9. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 270 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/Hex solvendisüsteemiga.



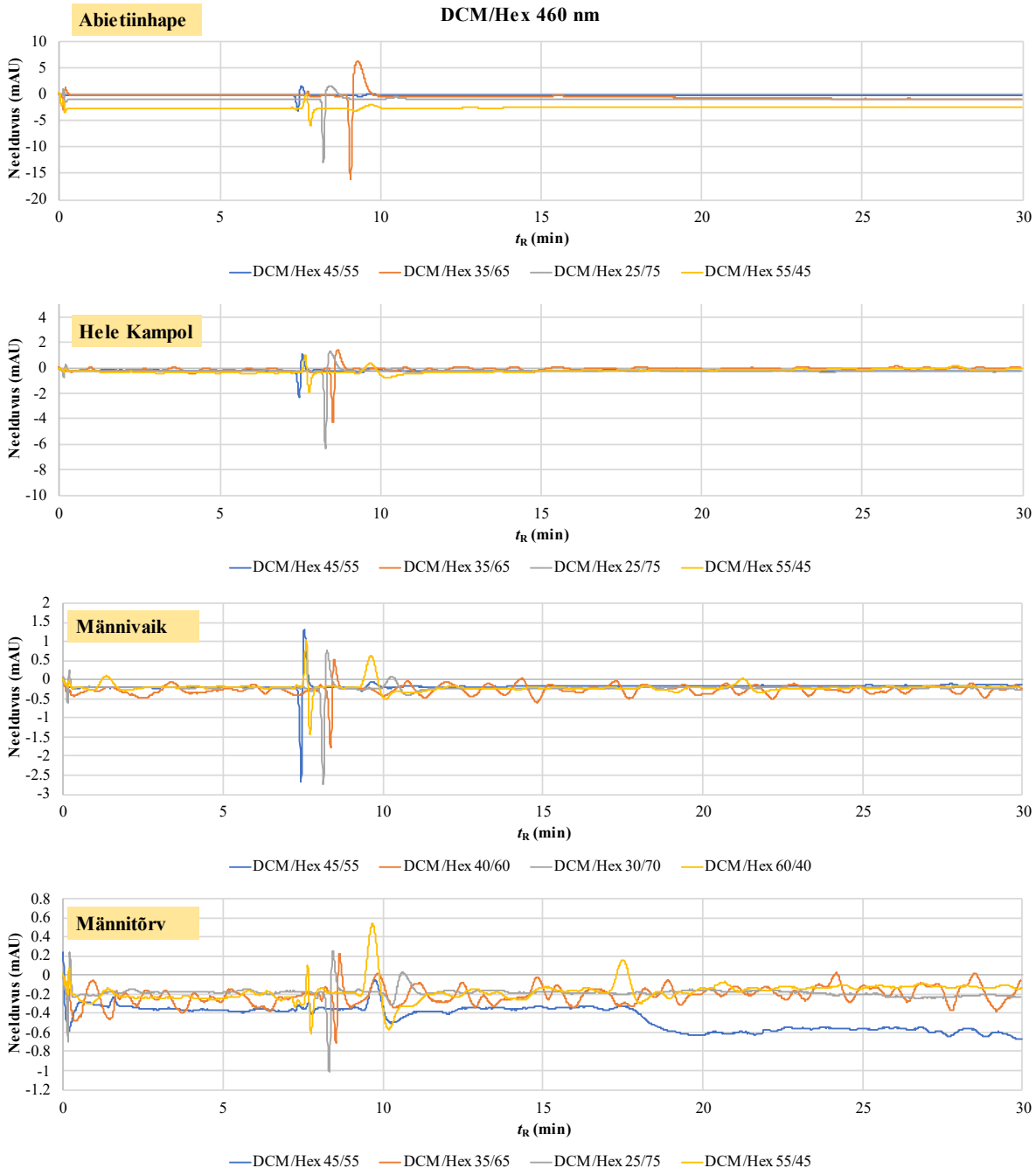
Joonis 10. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 290 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/Hex solvendisüsteemiga.



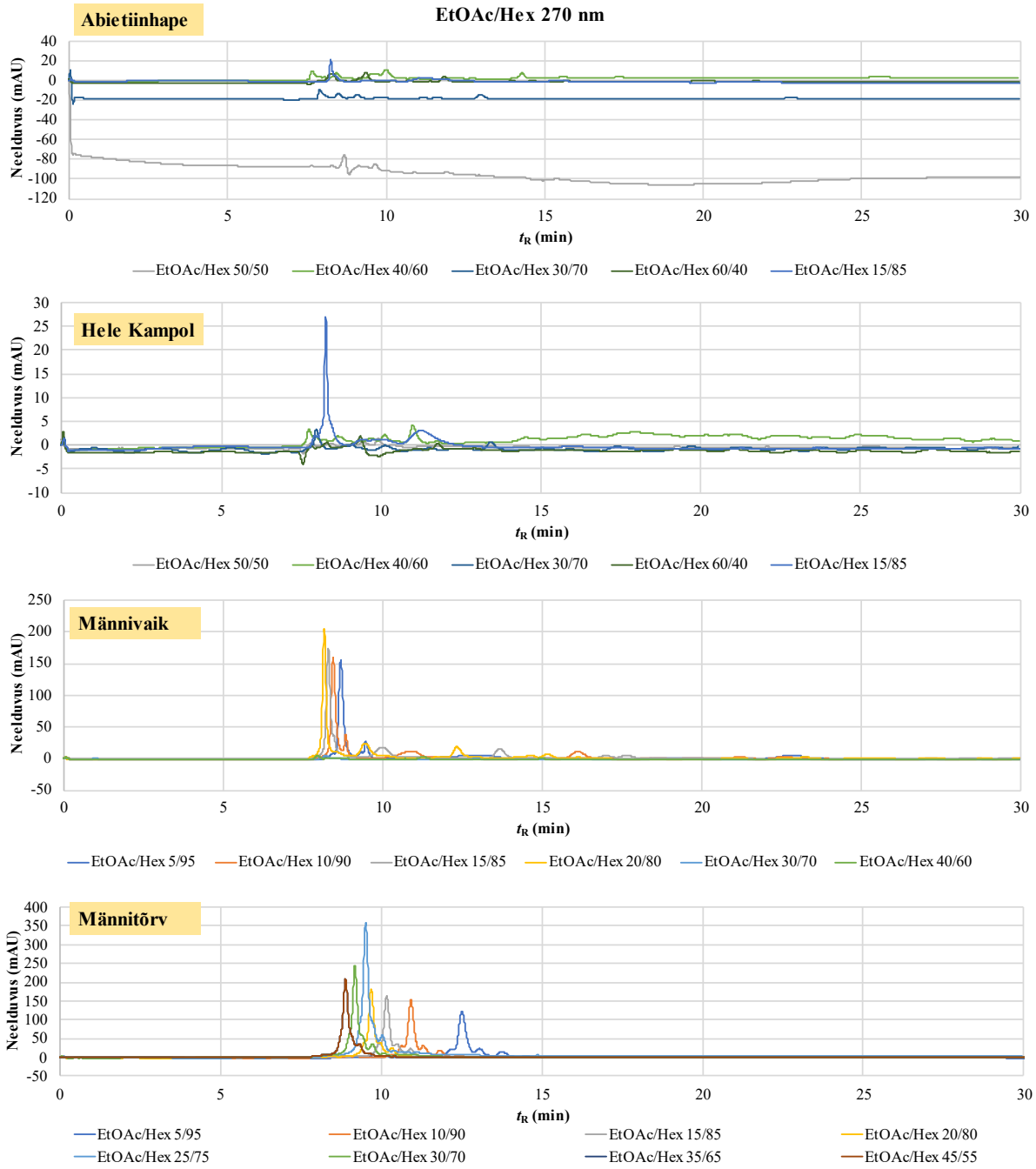
Joonis 11. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 300 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/Hex solvendisüsteemiga.



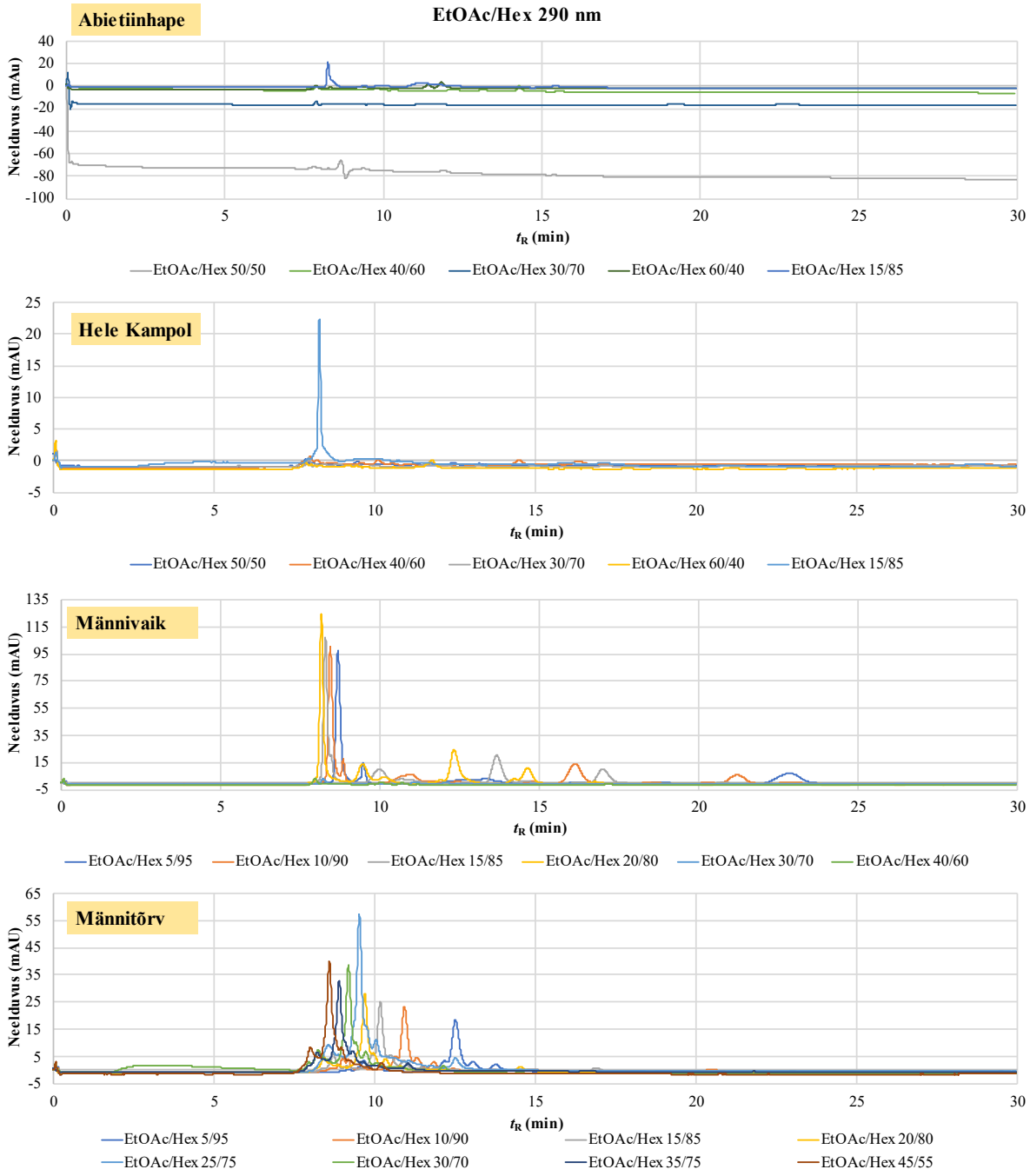
Joonis 12. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 420 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/Hex solvendisüsteemiga.



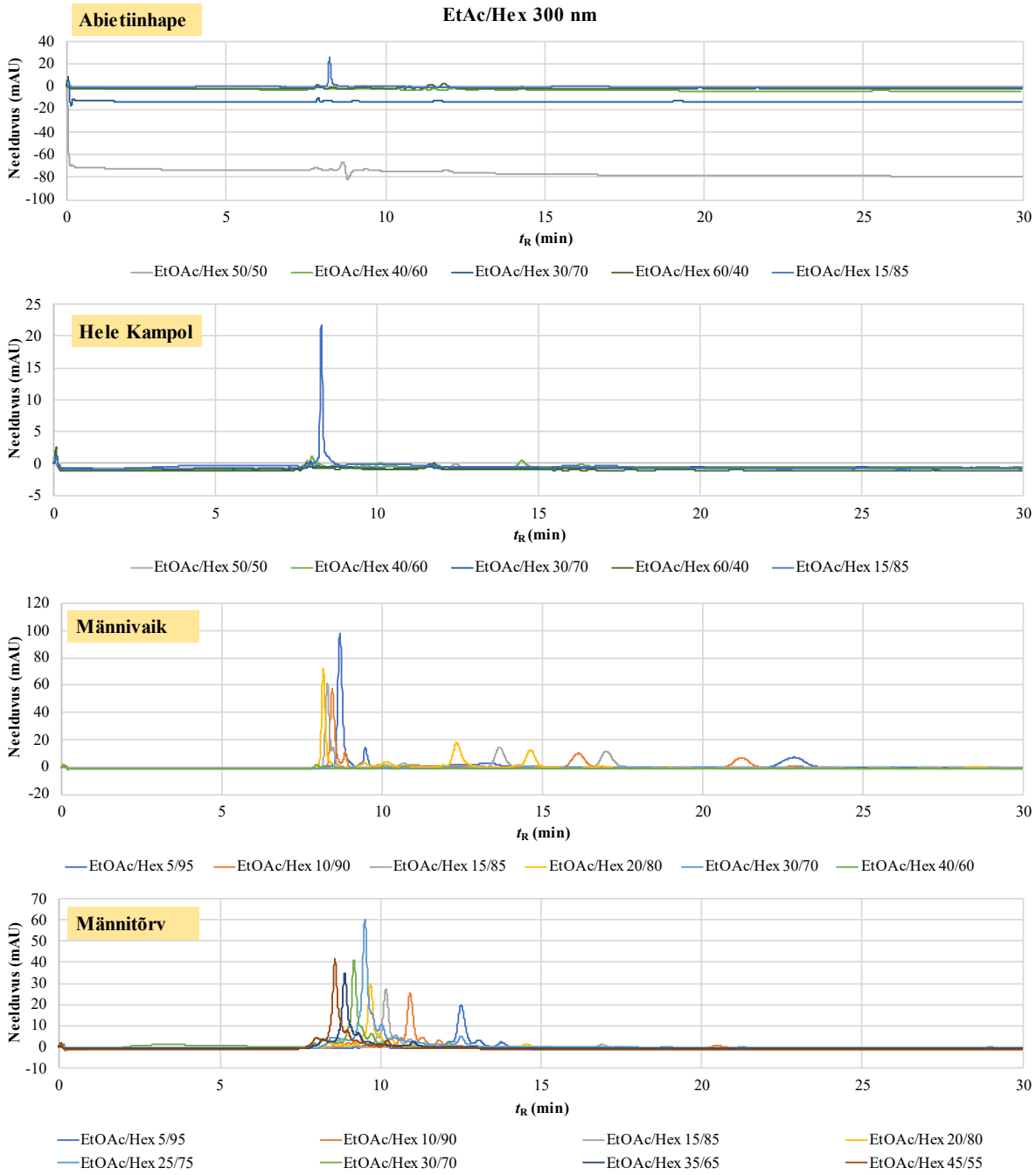
Joonis 13. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 460 nm, registreeritud erineva vahekorraga DCM/Hex solvendisüsteemiga.



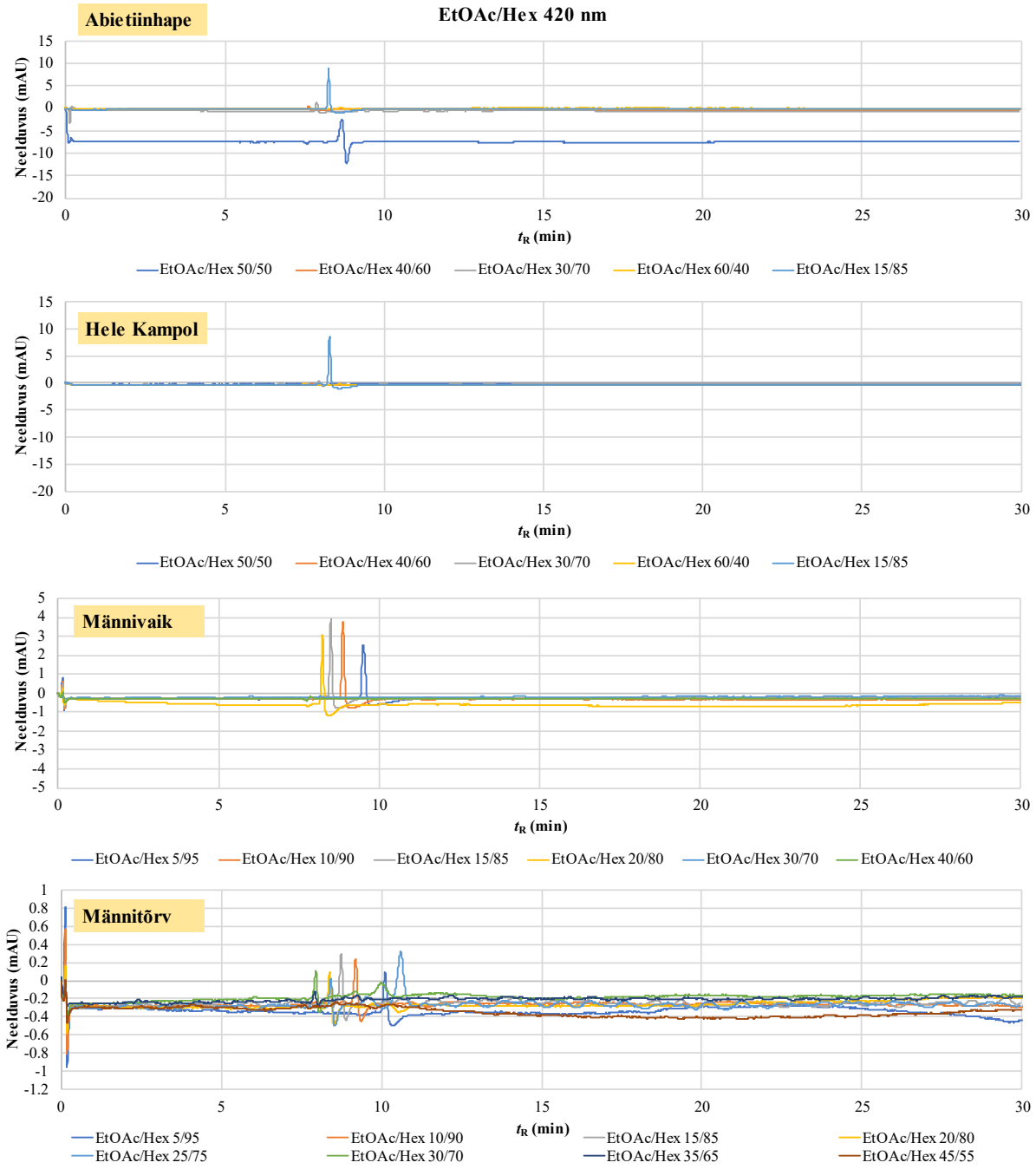
Joonis 14. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 270 nm, registreeritud erineva vahekorraga EtOAc/Hex solvendisüsteemiga.



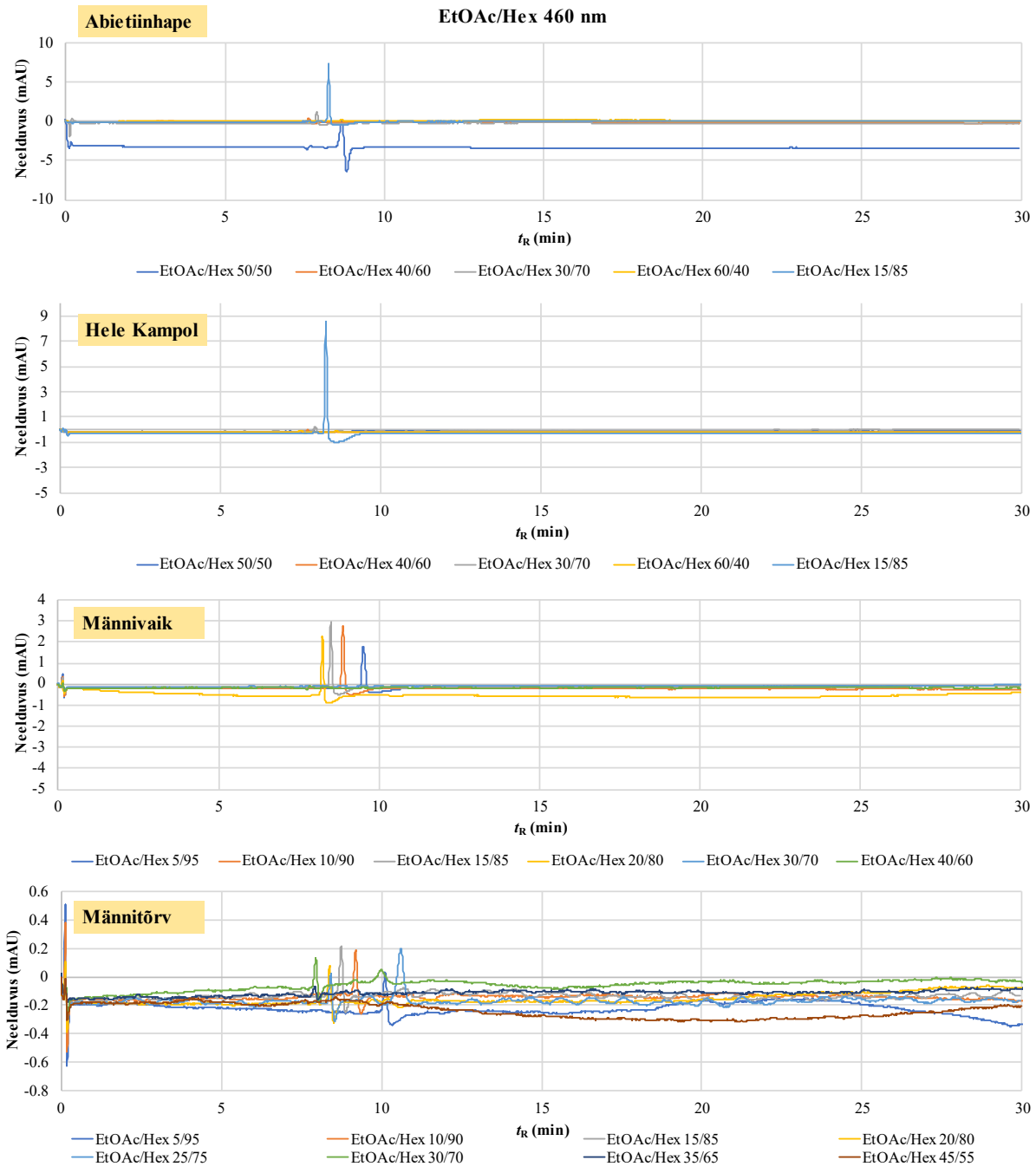
Joonis 15. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 290 nm, registreeritud erineva vahekorraga EtOAc/Hex solvendisüsteemiga.



Joonis 16. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 300 nm, registreeritud erineva vahekorraga EtOAc/Hex solvendisüsteemiga.



Joonis 17. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 420 nm, registreeritud erineva vahekorraga EtOAc/Hex solvendisüsteemiga.



Joonis 18. Referentsproovide NP-HPLC kromatogrammid lainepikkusel 460 nm, registreeritud erineva vahekorraga EtOAc/Hex solvendisüsteemiga.

LISA 6

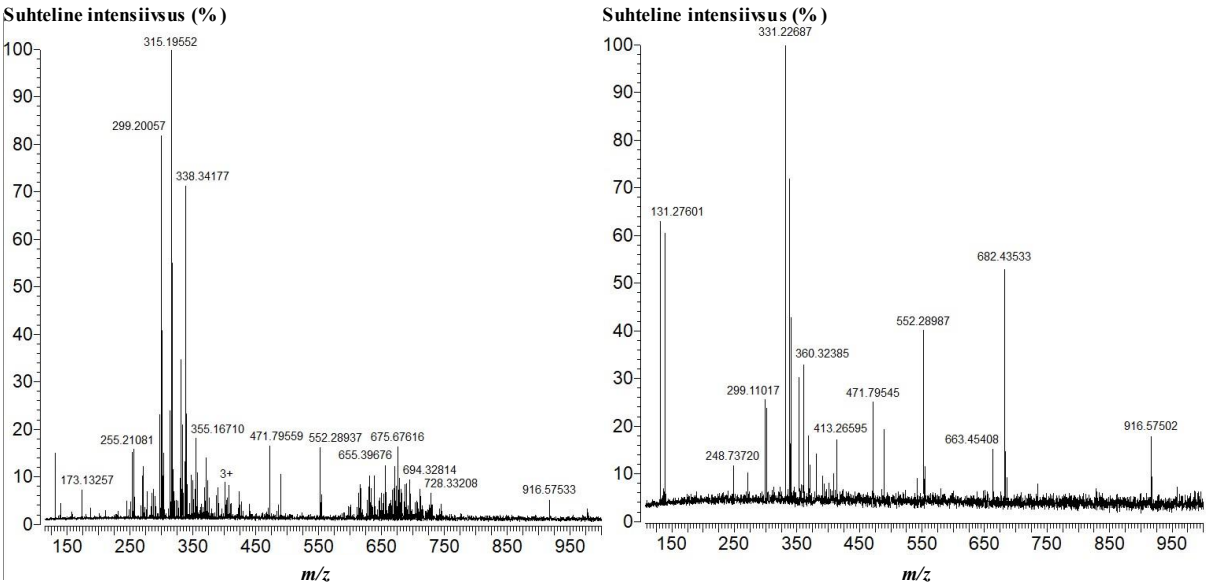
Tabel 3. ESI(+)-FT-ICR-MS-iga registreeritud referentsproovide interperteerimise tulemused. [1-8, 40]

Abietiinhape		**Hele kampol**		**Männivaik**		**Männitõrv**		**Katioonvalem**	**Ioonvalem**	**Arvatav algne komponent**
Mõõdetud *m/z*	**Δ *m/z* (ppm)**	**Mõõdetud *m/z***	**Δ *m/z* (ppm)**	**Mõõdetud *m/z***	**Δ *m/z* (ppm)**	**Mõõdetud *m/z***	**Δ *m/z* (ppm)**			
139.12296	-0.04	139.12297	0.01	139.12296	-0.08	139.12297	0.00	$C_8H_{15}N_2^+$		Kalibrant
173.13248	-0.03	173.13251	0.18	173.13257	0.53	173.13247	-0.08	$C_{13}H_{17}^+$	$[C_{13}H_{16}+H]^+$	1,4-dihüdro-2,5,8-trimetüülnaftaleen
253.19506	-0.09	253.19511	0.10	253.19518	0.40	253.19514	0.24	$C_{19}H_{25}^+$	$[C_{19}H_{24}+H]^+$	Simonelliit
255.21063	-0.40	255.21068	-0.20	255.21081	0.31	255.21080	0.28	$C_{19}H_{27}^+$	$[C_{19}H_{28}-2H+H]^+$	Dehüdrogeenitud norabietatrieen
257.22647	0.35	257.22641	0.12	257.22633	-0.18	257.22633	-0.21	$C_{19}H_{29}^+$	$[C_{19}H_{28}+H]^+$	Norabietatrieen
267.17421	-0.49			267.17412	-0.82	267.17438	0.14	$C_{19}H_{23}O^+$	$[C_{19}H_{28}+O-6H+H]^+$	Norabietatrieen
269.19003	0.14	269.19018	0.70	269.19015	0.61	269.19014	0.56	$C_{19}H_{25}O^+$	$[C_{19}H_{28}+O-4H+H]^+$	Norabietatrieen
271.20560	-0.15	271.20566	0.06	271.20565	0.02	271.20561	-0.10	$C_{19}H_{27}O^+$	$[C_{19}H_{28}+O-2H+H]^+$	Norabietatrieen
277.17981	-0.03	277.17990	0.27	277.17984	0.07			$C_{17}H_{25}O_3^+$	$[C_{20}H_{30}O_2-3CH_3+O+3H+H]^+$	3x demetüleerunud abietiinhape
297.18496	0.15	297.18492	0.04	297.18496	0.16			$C_{20}H_{25}O_2^+$	$[C_{20}H_{26}O_3-H_2O+H]^+$	7-oksodehüdroabietiinhape
299.20052	-0.13	299.20059	0.11	299.20057	0.05	299.20083	0.91	$C_{20}H_{27}O_2^+$	$[C_{20}H_{26}O_2+H]^+$	didehüdroabietiinhape
301.21618	-0.09	301.21628	0.22	301.21630	0.30	301.21626	0.18	$C_{20}H_{29}O_2^+$	$[C_{20}H_{28}O_2+H]^+$	Dehüdroabietiinhape
303.23183	-0.09	303.23196	0.32	303.23195	0.31			$C_{20}H_{31}O_2^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+H]^+$	Abietiinhape
						309.18268	0.58	$C_{19}H_{26}O_2Na^+$	$[C_{20}H_{28}O_2-CH_3+H+Na]^+$	Demetüleerunud dehüdroabietiinhape
313.17988	0.19	313.17975	-0.21	313.17987	0.16			$C_{20}H_{25}O_3^+$	$[C_{20}H_{26}O_4-OH+H]^+$	15-hüdroksü-7-oksodehüdroabietiinhappe
				313.21631	0.33	313.21570	-1.63	$C_{21}H_{29}O_2^+$	$[C_{21}H_{30}O_2-2H+H]^+$	Dehüdrogeenitud metüüldehüdroabietaat
315.19542	-0.17	315.19549	0.05	315.19552	0.16	315.19561	0.44	$C_{20}H_{27}O_3^+$	$[C_{20}H_{26}O_3+H]^+$	7-oksodehüdroabietiinhape
				315.23172	-0.58	315.23191	0.02	$C_{21}H_{31}O_2^+$	$[C_{21}H_{30}O_2+H]^+$	Metüüldehüdroabietaat
317.21098	-0.43	317.21117	0.15	317.21120	0.26	317.21097	-0.41	$C_{20}H_{29}O_3^+$	$[C_{20}H_{28}O_3+H]^+$	15-hüdroksüdehüdroabietiinhape
319.22674	-0.09	319.22696	0.60	319.22664	-0.40			$C_{20}H_{31}O_3^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+O+H]^+$	Abietiinhappe
321.18233	-0.54	321.18235	-0.48	321.18253	0.10	321.18245	-0.15	$C_{20}H_{26}O_2Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2-4H+Na]^+$	Didehüdroabietiinhape
				322.81106		322.81186			Struktuur teadmata	
		323.19814	-0.0.4	323.19829	0.45	323.19826	0.33	$C_{20}H_{28}O_2Na^+$	$[C_{20}H_{28}O_2+Na]^+$	Dehüdroabietiinhape
325.21361	-0.60	325.21391	0.34	325.21368	-0.37	325.21372	-0.24	$C_{20}H_{30}O_2Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+Na]^+$	Abietiinhape
329.17476	0.05	329.17466	-0.24	329.17493	0.58			$C_{20}H_{25}O_4^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+2O-6H+H]^+$	3x dehüdrogeenitud abietiinhappe
				329.21130	0.54	329.21146	1.02	$C_{21}H_{29}O_3^+$	$[C_{21}H_{28}O_3+H]^+$	Metüül-7-oksodehüdroabietaat
331.19035	-0.11	331.19052	0.40	331.19047	0.20			$C_{20}H_{27}O_4^+$	$[C_{20}H_{26}O_4+H]^+$	15-hüdroksü-7-oksodehüdroabietiinhape
333.20601	-0.09	333.20610	0.18	333.20611	0.21			$C_{20}H_{29}O_4^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+H]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
335.22179	0.30	335.22180	0.34	335.22179	0.31			$C_{20}H_{31}O_4^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+2O+H]^+$	Abietiinhape
337.17741	-0.03	337.17744	0.06	337.17752	0.29	337.17709	-0.99	$C_{20}H_{26}O_3Na^+$	$[C_{20}H_{26}O_3+Na]^+$	7-oksodehüdroabietiinhape
						337.21378	-0.06	$C_{21}H_{30}O_2Na^+$	$[C_{21}H_{30}O_2+Na]^+$	Metüüldehüdroabietiinhape
338.34167	-0.22	338.34179	0.14	338.34177	0.08	338.34185	0.14	$C_{22}H_{44}NO^+$	$[C_{22}H_{43}NO+H]^+$	Saaste: Erukamiid

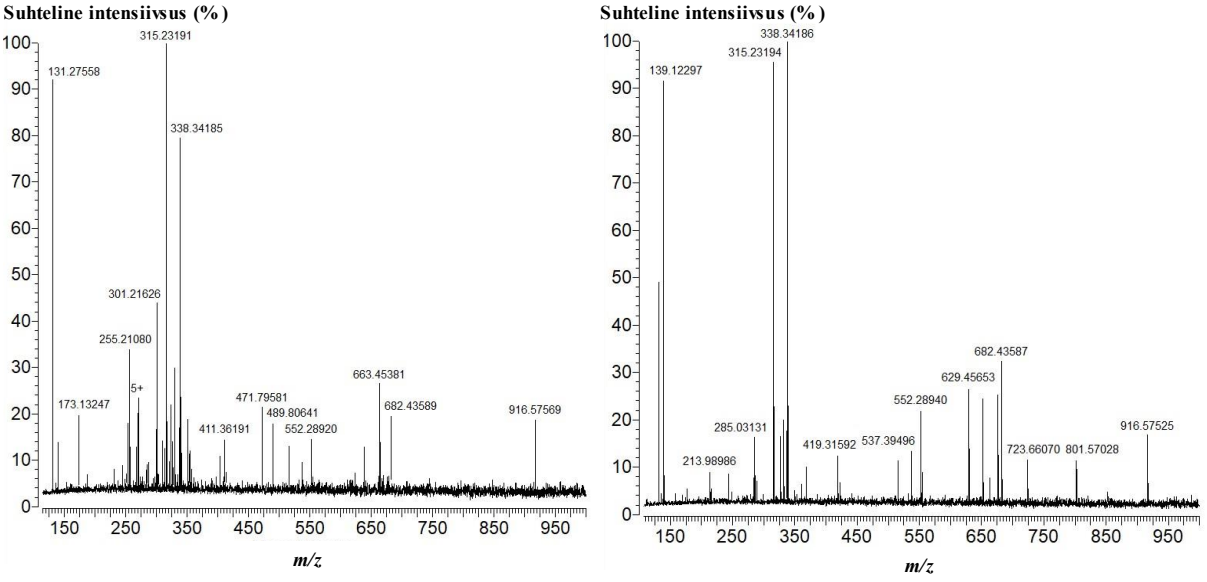
339.19310	0.10	339.19311	0.12	339.19319	0.35	339.19299	-0.24	$C_{20}H_{28}O_3Na^+$	$[C_{20}H_{28}O_3+Na]^+$	Hüdroksüdehüdroabietiinhape
341.20862	-0.29	341.20874	0.05	341.20883	0.33	341.20897	0.73	$C_{20}H_{30}O_3Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+O+Na]^+$	Abietiinhappe
347.18542	0.35	347.18555	0.72	347.18576	1.33			$C_{20}H_{27}O_5^+$	$[C_{20}H_{26}O_4+O+H]^+$	15-hüdroksü-7-oksodehüdroabietiinhape
349.20097	0.07	349.20110	0.44	349.20105	0.29			$C_{20}H_{29}O_5^+$	$[C_{20}H_{28}O_2+3O+H]^+$	Dehüdroabietiinhape
						351.193129	0.17	$C_{21}H_{28}O_3Na^+$	$[C_{21}H_{30}O_2+O-2H+Na]^+$	Metüüldehüdroabietiinhape
351.21687	0.78	351.21663	0.07	351.21649	-0.32			$C_{20}H_{31}O_5^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+3O+H]^+$	Abietiinhape
353.17226	-0.21	353.17232	-0.03	353.17199	-0.97			$C_{20}H_{26}O_4Na^+$	$[C_{20}H_{26}O_4+Na]^+$	15-hüdroksü-7-oksodehüdroabietiinhape
						353.20879	0.21	$C_{21}H_{30}O_3Na^+$	$[C_{21}H_{30}O_2+O+Na]^+$	Metüüldehüdroabietiinhape
355.16707	0.19	355.16708	0.22	355.16710	0.27	355.16712	0.34	$C_{20}H_{28}O_3K^+$	$[C_{20}H_{28}O_3+K]^+$	Hüdroksüdehüdroabietiinhape
355.18803	0.15	355.18795	-0.09	355.18801	0.10			$C_{20}H_{28}O_4Na^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+Na]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
		357.18289	0.66	357.18301	1.01			$C_{20}H_{30}O_3K^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+O+K]^+$	Abietiinhape
357.20363	-0.01	357.20368	0.13	357.20385	0.63			$C_{20}H_{30}O_4Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+2O+Na]^+$	Abietiinhappe
365.19593	0.18			365.19602	0.40			$C_{20}H_{29}O_6^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+2O+H]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
371.16193	0.02	371.16195	0.08	371.16201	0.25			$C_{20}H_{28}O_4K^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+K]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
371.18279	-0.31	371.18285	-0.13	371.18298	0.21			$C_{20}H_{28}O_5Na^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+O+Na]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
373.17757	-0.01	373.17752	-0.13	373.17774	0.44			$C_{20}H_{30}O_4K^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+2O+K]^+$	Abietiinhape
373.19842	-0.35	373.19859	0.09	373.19842	-0.49			$C_{20}H_{30}O_5Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+3O+Na]^+$	Abietiinhape
375.21403	-0.46	375.21429	0.23	375.21399	-0.56			$C_{20}H_{32}O_5Na^+$	$[C_{20}H_{32}O_2+3O+Na]^+$	Dihüdroabietiinhape
387.15666	-0.44	387.15683	0.01	387.15710	0.70			$C_{20}H_{28}O_5K^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+O+K]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
387.17778	-0.09	387.17832	1.30					$C_{20}H_{28}O_6Na^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+2O+Na]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
389.17252	0.09	389.17247	-0.02	389.17255	0.17			$C_{20}H_{30}O_5K^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+3O+K]^+$	Abietiinhape
389.19359	0.33	389.19349	0.07	389.19387	1.05			$C_{20}H_{30}O_6Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+4O+Na]+$	Abietiinhape
391.18828	0.39	391.18816	0.07	391.18815	0.04			$C_{20}H_{32}O_5K^+$	$[C_{20}H_{32}O_2+3O+K]^+$	Dihüdroabietiinhape
391.20922	0.27	391.20872	-0.99	391.20908	-0.07			$C_{20}H_{32}O_6Na^+$	$[C_{20}H_{32}O_2+4O+Na]^+$	Dihüdroabietiinhape
403.15167	-0.21	403.15175	0.00	403.15197	0.55			$C_{20}H_{28}O_6K^+$	$[C_{20}H_{28}O_4+O+K]^+$	7,15-dihüdroksüdehüdroabietiinhape
405.16758	0.43	405.16771	0.76	405.16721	-0.48			$C_{20}H_{30}O_6K^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+4O+K]^+$	Abietiinhape
						411.36191	-0.46	$C_{29}H_{47}O^+$	$[C_{29}H_{46}O+H]^+$	24-etüülkolesta-4,6-dieen-3-oon
471.79566	-0.04	471.79566	-0.05	471.79559	-0.19	471.79581	0.27	$C_6H_8O_{14}Fe_3^+$	$(HCO_2)_6(H_2O)Fe_3O^+$	Süsteemist tulev saastus
489.80635	0.21	489.80656	0.63	489.80655	0.60	489.80641	0.32	$C_6H_{10}O_{15}Fe_3^+$	$(HCO_2)_6(H_2O)_2Fe_3O^+$	Süsteemist tulev saastus
						515.41334	0.92	$C_{30}H_{59}O_4S^+$	$[C_{30}H_{58}O_4S+H]^+$	Didodetsüül-3,3'-tiodipropionaat (detergent)
552.28946	-0.01	552.28939	-0.14	552.28937	-0.19	552.28920	-0.82	$C_{26}H_{45}N_7ClP_2^+$		Kalibrant
613.38982	1.76	613.38984	1.78	613.38904	0.47			$C_{40}H_{53}O_5^+$	$[2C_{20}H_{26}O_2+O+H]^+$	Kahe didehüdrobietiinhappe kombinatsioon
615.40375	-1.06	615.40425	-0.25	615.40432	-0.14			$C_{40}H_{55}O_5^+$	$[C_{20}H_{26}O_3+ C_{20}H_{28}O_2+H]^+$	Kombinatsioon 7-oksodehüdroabietiinhappest + dehüdroabietiinhappest
631.39956	0.37	631.39867	-1.03	631.39928	-0.06			$C_{40}H_{55}O_6^+$	$[C_{20}H_{26}O_3+C_{20}H_{28}O_3+H]^+$	Kombinatsioon 7-oksodehüdroabietiinhappest + hüdroksüdehüdroabietiinhappest

633.41576	1.24	633.41446	-0.81	633.41386	-1.75			$C_{40}H_{57}O_6^+$	$[2C_{20}H_{28}O_3+H]^+$	Kahe hüdroksüdehüdroabietiinhappe kombinatsioon
647.39448	0.39	647.39337	-1.33	647.39451	0.43			$C_{40}H_{55}O_7^+$	$[2C_{20}H_{30}O_2+3O-6H+H]^+$	Kahe abietiinhappe kombinatsioon
653.38026	-1.53	653.38093	-0.51	653.38206	1.23			$C_{40}H_{54}O_6Na^+$	$[C_{20}H_{26}O_3+C_{20}H_{28}O_3+Na]+$	Kombinatsioon 7-oksodehüdroabietiinhappest + hüdroksüdehüdroabietiinhappest
655.39727	0.55	655.39661	-0.46	655.39676	-0.24			$C_{40}H_{56}O_6Na^+$	$[2C_{20}H_{28}O_3+Na]^+$	Kahe hüdroksüdehüdroabietiinhappe kombinatsioon
657.41328	1.09	657.41279	0.35	657.41203	-0.80			$C_{40}H_{58}O_6Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_3+C_{20}H_{28}O_3+Na]^+$	Kombinatsioon hüdroksüabietiinhappest + 7-oksodehüdroabietiinhappest
		659.42840	0.28					$C_{40}H_{60}O_6Na^+$	$[2C_{20}H_{30}O_3+Na]^+$	Kahe hüdroksüabietiinhappe kombinatsioon
		671.36925	-2.38	671.37028	-0.84			$C_{40}H_{56}O_6K^+$	$[2C_{20}H_{28}O_3+K]^+$	Kahe hüdroksüdehüdroabietiinhappe kombinatsioon
671.39242	0.87	671.39238	0.83	671.39261	1.17			$C_{40}H_{56}O_7Na^+$	$[2C_{20}H_{28}O_3+O+Na]^+$	Kahe hüdroksüdehüdroabietiinhappe kombinatsioon
673.40820	1.06	673.40823	1.12	673.40807	0.87			$C_{40}H_{58}O_7Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_3+C_{20}H_{28}O_3+O+Na]^+$	Kombinatsioon hüdroksüabietiinhappest + 7-oksodehüdroabietiinhappest
675.42267	-0.68	675.42379	0.97					$C_{40}H_{60}O_7Na^+$	$[2C_{20}H_{30}O_3+O+Na]^+$	Kahe hüdroksüdehüdroabietiinhappe kombinatsioon
675.67642	0.31			675.67616	-0.07			$C_{44}H_{87}N_2O_2^+$	$[2C_{22}H_{43}NO+H]^+$	Saaste: erukamiidi dimeer
682.43514	-0.17			682.43471	-0.81	682.43589	0.92	$C_{26}H_{64}N_{13}P_4^+$		Kalibrant
687.38714	0.59	687.38750	1.11	687.38776	1.49			$C_{40}H_{56}O_8Na^+$	$[2C_{20}H_{28}O_3+2O+Na]^+$	Kahe 7-oksodehüdroabietiinhappe kombinatsioon
		689.38051	-1.31					$C_{40}H_{58}O_7K^+$	$[C_{20}H_{30}O_3+ C_{20}H_{28}O_3+O+K]^+$	Kombinatsioon hüdroksüabietiinhappest + hüdroksüdehüdroabietiinhappest
689.40365	1.83	689.40325	1.25	689.40352	1.64			$C_{40}H_{58}O_8Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_3+ C_{20}H_{28}O_3+2O+K]^+$	Kombinatsioon hüdroksüabietiinhappest + hüdroksüdehüdroabietiinhappest
691.41907	1.55	691.41915	1.66	691.41819	0.27			$C_{40}H_{60}O_8Na^+$	$[2C_{20}H_{30}O_3+2O+Na]^+$	Kahe hüdroksüabietiinhappe kombinatsioon
916.57573	-0.41	916.57630	0.20	916.57533	-0.85	916.57569	-0.45	$C_{44}H_{82}N_{13}P_4^+$		Kalibrant

LISA 7



Joonis 19. Männivaigu ESI(+)-FT-ICR-MS spekter (vasakul) ning ühendatud NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi massispekter ajahetkel 14.3 min (paremal).



Joonis 20. Männitõrva ESI(+)-FT-ICR-MS spekter (vasakul) ning ühendatud NP-HPLC-ESI-FT-ICR-MS süsteemi massispekter ajahetkel 9.8 min (paremal).

Lisa 8

Joonis 21. Laevavrakilt leitud savinõud (Foto: Vello Mäss, Meremuuseum).

Joonis 22. Mikroskoobipilt arheoloogilisest proovist (50x suurendus).

LISA 9

Tabel 4. ESI(+)-FT-ICR-MS-iga mõõdetud arheoloogilise proovi massispektri interperteerimine. [1-8, 40-41]

Mõõdetud *m/z*	Δ*m/z* (ppm)	Katioonvalem	Ioonvalem	Arvatav algne komponent
139.12297	0.01	$C_8H_{15}N_2^+$		
173.13250	0.09	$C_{13}H_{17}^+$	$[C_{13}H_{16}+H]^+$	1,4-dihüdro-2,5,8-trimetüülnaftaleen
211.11176	0.09	$C_{15}H_{15}O^+$	$[C_{15}H_{13}+O+H+H]^+$	Metüülfenentreen
237.16380	0.06	$C_{18}H_{21}^+$	$[C_{18}H_{18}+2H+H]^+$	Reteen
239.14308	0.15	$C_{17}H_{19}O^+$	$[C_{18}H_{18}-CH_3+O+3H+H]^+$	Reteen
244.19073	-1.18	$C_{13}H_{26}NO_3^+$	Struktuur teadmata	
251.14310	0.23	$C_{18}H_{19}O^+$	$[C_{18}H_{18}+O+H]^+$	Reteen
253.15872	0.11	$C_{18}H_{21}O^+$	$[C_{18}H_{18}+O+2H+H]^+$	Reteeni põhine ühend
255.21084	0.46	$C_{19}H_{27}^+$	$[C_{19}H_{28}-2H+H]^+$	Dehüdrogeenitud norabietatrieen
257.22632	-0.25	$C_{19}H_{29}^+$	$[C_{19}H_{28}+H]^+$	Norabietatrieen
269.15366	0.19	$C_{18}H_{21}O_2^+$	$[C_{18}H_{20}O_2+H]^+$	Reteeni põhine ühend
269.18998	-0.04	$C_{19}H_{25}O^+$	$[C_{20}H_{28}O_2-CH_3-OH+H]^+$	Demetüleerunud dehüdroabietiinhape
271.20572	0.31	$C_{19}H_{27}O^+$	$[C_{19}H_{28}+O-2H+H]^+$	Norabietatrieeni derivaat
285.14865	0.45	$C_{18}H_{21}O_3^+$	$[C_{18}H_{1820}O_2+O+H]^+$	Reteeni põhine ühend
291.13560	0.18	$C_{18}H_{20}O_2Na^+$	$[C_{18}H_{20}O_2+Na]^+$	Reteeni põhine ühend
293.15117	-0.10	$C_{18}H_{22}O_2Na^+$	$[C_{18}H_{20}O_2+2H+Na]^+$	Reteeni põhine ühend
299.20045	-0.36	$C_{20}H_{27}O_2^+$	$[C_{20}H_{26}O_2+H]^+$	Didehüdroabietiinhape
301.21620	-0.04	$C_{20}H_{29}O_2^+$	$[C_{20}H_{28}O_2+H]^+$	Dehüdroabietiinhape
303.23152	-1.12	$C_{20}H_{31}O_2^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+H]^+$	Abietiinhape
309.14621	0.27	$C_{18}H_{22}O_3Na^+$	$[C_{18}H_{20}O_2+O+2H+Na]^+$	Reteeni põhine ühend
315.19529	-0.57	$C_{20}H_{27}O_3^+$	$[C_{20}H_{26}O_3+H]^+$	7-oksodehüdroabietiinhape
317.21082	-0.94	$C_{20}H_{29}O_3^+$	$[C_{20}H_{28}O_3+H]^+$	15-hüdroksüdehüdroabietiinhape
319.22671	-0.19	$C_{20}H_{31}O_3^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+O+H]^+$	Abietiinhape
325.21319	-1.89	$C_{20}H_{30}O_2Na^+$	$[C_{20}H_{30}O_2+Na]^+$	Dehüdroabietiinhape
332.08310			Struktuur teadmata	Saaste: Erukamiidi fragment
338.34179	0.14	$C_{22}H_{44}NO^+$	$[C_{22}H_{43}NO+H]^+$	Saaste: Erukamiid
441.37252	-0.44	$C_{30}H_{49}O_2^+$	$[2C_{15}H_{24}+2O+H]^+$	Kahe karüofülleeni kombinatsioon
453.33601	-0.67	$C_{30}H_{45}O_3^+$	$[2C_{15}H_{24}+2O-4H+H]^+$	Kahe karüofülleeni kombinatsioon
457.36763	0.03	$C_{30}H_{49}O_3^+$	$[2C_{15}H_{24}+3O+H]^+$	Kahe karüofülleeni kombinatsioon
471.34677	-0.26	$C_{30}H_{47}O_4^+$	$[2C_{15}H_{24}+4O-2H+H]^+$	Kahe karüofülleeni kombinatsioon
471.79591	0.48	$C_6H_8O_{14}Fe_3^+$	$(HCO_2)_6(H_2O)Fe_3O^+$	Süsteemist tulev saastus
489.80578	-0.97	$C_6H_{10}O_{15}Fe_3^+$	$(HCO_2)_6(H_2O)_2Fe_3O^+$	Süsteemist tulev saastus
513.35742	-0.07	$C_{32}H_{49}O_5^+$	$[2C_{15}H_{24}+5O+2CH_3-6H+H]^+$	Kahe karüofülleeni kombinatsioon
552.28902	-0.82	$C_{26}H_{45}N_7ClP_2^+$		Kalibrant
561.29777	0.15	$C_{33}H_{46}O_5K^+$	$[2C_{15}H_{24}+5O+3CH_3-10H+K]^+$	Kahe karüofülleeni kombinatsioon
675.67544	-1.14	$C_{44}H_{87}N_2O_2^+$		Saaste: Erukamiidi dimeer
682.43589	0.93	$C_{26}H_{64}N_{13}P_4^+$		Kalibrant
916.57629	0.20	$C_{44}H_{82}N_{13}P_4^+$		Kalibrant

INFOLEHT

Normaalfaaskromatograafia ja massispektromeetria hübriidsüsteemi kasutatavuse hindamine männivaiguliste materjalide analüüsimiseks

Käesoleva töö raames töötati välja normaalfaas-kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (NP-HPLC) ning elektropihustusionisatsioon-Fourier' teisendusega ioontsüklotronresonants massispektromeetriat (ESI-FT-ICR-MS) kombineeriv meetod keeruliste männivaiguliste materjalide analüüsimiseks.

Esmalt töötati välja NP-HPLC mõõtmismetoodikad männivaiguliste referentsproovide (abietiinhappe, kampoli, männivaigu, männitõrva) jaoks. Seejärel ühendati NP-HPLC ja ESI-FT-ICR-MS kasutades selleks töögrupis eelnevalt loodud süsteemi. Kokku pandud süsteemi modifitseeriti vastavalt normaalfaaskromatograafia tingimustele ja töötati välja meetod referentsproovide analüüsimiseks. Seejärel rakendati meetodit ühe arheoloogilise proovi koostise uurimiseks. Leiti, et NP-HPLC kombineeritult ESI-FT-ICR-MS-iga on võimekas meetod männivaiku ja -tõrva sisaldavate materjalide analüüsimiseks.

Märksõnad: normaalfaaskromatograafia, ESI, kõrglahutusega massispektromeetria, männivaik, männitõrv.

Assessment of the suitability of normal phase liquid chromatography and mass-spectrometry hybrid system for analysis of materials related to pine resin

In this work, a method was developed for the analysis of materials related to pine resin by combining normal phase high pressure liquid chromatography (NP-HPLC) with electrospray ionisation-Fourier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FT-ICR-MS).

First, NP-HPLC measurement methods were developed for abietic acid, colophony, pine resin and pine tar. Then NP-HPLC and ESI-FT-ICR-MS were connected using a system previously developed within the work group. The system was modified according to the NP-HPLC conditions ,and a method was developed for the analysis of reference samples. Finally, the system was used to analyze an archaeological sample. It was found that NP-HPLC combined with ESI-FT-ICR-MS is a powerful tool for the analysis of materials containing pine resin and pine tar.

Keywords: normal phase liquid chromatography, ESI, high-resolution mass spectrometry, pine resin, pine tar.

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Peep Põdder,

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

Normaalfaaskromatograafia ja massispektromeetria hübriidsüsteemi kasutatavuse hindamine männivaiguliste materjalide analüüsimiseks,

mille juhendajad on teadur Anu Teearu-Ojakäär, PhD ja teadur Signe Vahur, PhD,

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 **24.05.2023** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

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

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

Tartus, **24.05.2021**