

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

Lola Sõukand

**PÜROLÜÜSER-GAASIKROMATOGRAAFIA-
MASSISPEKTROMEETRIA METOODIKA ARENDUS
VAHADE TUVASTAMISEKS KULTUURIVÄÄRTUSLIKEST
PROOVIDEST**

Füüsika, keemia ja materjaliteaduse õppekava, materjaliteaduse eriala
Bakalaureusetöö (12 EAP)

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

Tartu 2023

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	3
1 SISSEJUHATUS.....	4
2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
2.1 Vahad.....	5
2.1.1 Mesilasvaha.....	5
2.1.2 Karnaubavaha.....	6
2.1.3 Kandelillavaha.....	6
2.1.4 Parafiin	7
2.2 Vahade analüüsimine.....	7
2.2.1 Py-GC-MS.....	8
3 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	12
3.1 Puhtad vahad.....	12
3.2 Vahade segu.....	13
3.3 Isetehtud pitservaha segud.....	13
3.4 Ajaloolistelt objektidelt saadud proovid.....	14
3.5 Uuringud Py-GC-MS-iga	15
3.5.1 Probleemid Py-GC-MS-iga.....	16
4 TULEMUSED JA ARUTELU.....	18
4.1 Py-GC-MS-i meetodika arendus vahade uurimiseks	18
4.1.1 Py-GC-MS meetodika arendus TMAH-iga derivatiseerides	18
4.1.2 Py-GC-MS-i meetodika arendus HMDS-iga derivatiseerides	22
4.2 Puhaste vahade pürogrammide interpreteerimine	23
4.3 Mesilasvaha ja karnaubavaha segu pürogrammi interpreteering	29
4.4 Pitservaha segude pürogrammide interpreteering	30
4.5 Reaalsete proovide analüüsimine	32
4.6 Järeldused	35
5 KOKKUVÕTE.....	36
6 SUMMARY	37
7 KASUTATUD KIRJANDUS	38
8 LISAD	42

KASUTATUD LÜHENDID

EI (*electron ionization*) – elektronionisatsioon

ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*) – elektropihustus-ionisatsiooni massispektromeetria

FID (*flame ionisation detector*) – leek-ionisatsioon-detektor

GALDI-MS (*graphene-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) – grafeen-abistatud laserdesorptsioon-ionisatsiooni massispektromeetria

GC (*gas chromatography*) – gaasikromatograafia

HMDS (*hexamethyldisilazane*) – heksametüüldisilasaan

MS (*mass spectrometry*) – massispektromeetria

PPK – pürolüüseri proovikapillaar

Py (*pyrolyzer*) – pürolüüser

TMAH (*tetramethylammonium hydroxide*) – tetrametüülammoniumhüdroksiid

t_R – retentsiooniaeg

1 SISSEJUHATUS

Inimesed on läbi ajaloo kasutanud vahasid väga erinevateks otstarveteks: mumifitseerimisel palsameerimisvahendina, värvides sideainena, lakkides matistava lisandina. Vahad on populaarne materjal ka küünalde valmistamises, meditsiinis ja konserveerimises. Neil on palju kasulikke omadusi, näiteks hüdrofoobsus, plastilisus, antibakteriaalsus jne, mis teeb need väärtuslikeks materjalideks farmaatsia- ja toiduainetööstuses. Kõikides nendes valdkondades on vaja teada täpset vahade koostist, et mõista, kuidas vahad teiste ainetega kokku sobivad.

Vahad on keerulise koostisega pikkade süsinikahelatega alkaanide, alkoholide ja hapete segud. Kirjanduses on tihti vahade komponendid varieeruvad ning siamaani ei teata täpselt looduslike vahade keemilist koostist. Vahade keemilise koostise uurimine on probleemne nende keerulise koostise ning, olenevalt analüüsimeetodist, mahuka prooviettevalmistuse tõttu. Lisaks on kultuuriväärtuslike objekte uurides proovide kogused väga väikesed, mistõttu ei saa kõiki analüüsimeetodeid neile rakendada.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada mõõtmismetoodika pürolüüsigaasikromatograaf-massispektromeetrile (Py-GC-MS) vahade koostiskomponentide kindlakstegemiseks. Py-GC-MS valiti, sest tegemist on hea tundlikkusega meetodiga, millega on võimalik analüüsida väga väikeseid ja keeruka koostisega proove (nagu kultuuriväärtuslikelt objektidelt saadud proovid). Töö käigus uuriti Py-GC-MS-iga erinevaid vahasid (mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha, parafiin) ning isevalmistatud pitservaha segusid (vahade segud vaigu ja pigmendiga). Mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiin valiti seetõttu, et need on nii tänapäeval kui ka ajalooliselt enim kasutatud vahad. Lisaks vahade analüüsimeetodika väljatöötamisele koostati töö käigus referentsmaterjalide (puhtad vahad ja neid sisaldavad segud) pürogrammide kogumik, mis on abiks kultuuriväärtuslikes proovides sisalduvate vahade tuvastamisel.

Töös väljatöötatud Py-GC-MS-i meetodikat rakendati kolmelt kultuuriväärtuslikult objektilt (kaks 13. sajandist pärit pitsert ja 19. sajandi lõpus Amandus Heinrich Adamsoni poolt tehtud skulptuur “Kalevipoeg ja vanasarvik”) pärit proovide analüüsimeetodiks.

2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Vahad

Inimesed on vahasid kasutanud juba aastatuhandeid [1]. Vahasid on kasutatud alates Vana-Egiptuses mumifitseerimisest kuni materjalide veekindlaks tegemiseni [1,2]. Tänapäeval on vahad kasutusel paljudes erinevates valdkondades. Põhiliselt kasutatakse vahasid kosmeetikatoodetes, värvide ja lakkide koostises, küünlades, puidutööstuses ja ravimitööstuses [1–5].

Vahad koosnevad pika süsinikahelaga alkaanidest, hapetest, alkoholidest, estritest või nende segudest [2]. Vahad jagunevad kaheks suureks rühmaks, looduslikud vahad ja sünteetilised vahad [1]. Selles töös uuritakse looduslikke vahasid. Looduslikud vahad jagunevad kolmeks suuremaks grupiks: mineraalvahad, loomsed vahad ja taimsed vahad [1]. Mineraalvahadest on tuntuim parafiin, mida on juba sajandeid kasutatud näiteks küünalde tegemiseks [1,2]. Loomsetest vahadest on levinuim mesilasvaha [1]. Taimsetest vahadest on tuntumad karnaubavaha ja kandelillavaha. [1] Selles bakalaureusetöös uuritakse mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha, parafiini ja nendega tehtud segusid.

2.1.1 Mesilasvaha

Mesilasvaha on kasutatud tuhandeid aastaid [6]. Juba 40 000 aastat tagasi kasutas San'i rahvas Aafrikas nooleotste kinnituseks mesilasvaha, millele lisati juurde taimekiudusid [7]. See on ka esimene teadaolev kasutusala mesilasvaha jaoks [7]. Mesilasvaha on kaua kasutusel olnud ka meditsiinis, eriti tähtsal kohal on see olnud Hiina meditsiinis, kus seda kasutatakse põhiliselt kreemides [6]. Lisaks relvade valmistamisele ja meditsiinile on mesilasvaha juba tuhandeid aastaid kasutatud küünalde valmistamiseks [6].

Mesilasvaha on kasutatud ka kunstis. Näiteks batikas, mis on Indoneesiast pärit kanga värvimistehnika (umbes 2000 aastat vana), kus tekstiilile joonistatakse vahaga muster ja seejärel värvitakse kogu kangas ning pärast seda vaha eemaldatakse kuuma veega, et paljastada vahaalune joonistus [6]. Veel üks olulisi tehnikaid, kus mesilasvaha kasutatakse, on enkaustika ehk vahamaal, mida on kasutatud juba 5. sajandist eKr [6]. Enkaustika on tehnika, kus maali tegemiseks kasutatakse Puunia vaha, mis koosneb mereveega töödeldud sulatatud mesilasvahast ja pigmendist [8,9]. Mesilasvaha on tähtsal kohal olnud ka pitserite koostises [10].

Mesilasvaha sünteesivad 12- kuni 18-päevased mesilased oma vahanäärmetes, et ehitada sellest mesilaskärg [3]. Selleks, et mesilaskärjest vaha kätte saada, eemaldatakse nõrutades kõigepealt mesi [1]. Seejärel sulatatakse alles jäänud mesilaskärg kuumas vees või õhukese kihina päikese

käes, millest pärast sulatamist jääb alles mesilasvaha [1]. Algselt on mesilasvaha valge, kuid muutub kollaseks tänu meele, õietolmule ja taruvaigule [3]. Mesilasvaha võib muutuda metallide tõttu ka pruunikaks või roheliseks, kui vaha sulatamisel on kasutatud rauast või tsingist anumaid [3,11]. Mesilasvaha sulamistemperatuuri vahemik on 61 °C kuni 65 °C ja tihedus 15 °C juures on 0,958 g/cm³ kuni 0,970 g/cm³ [5,11]. Mesilasvaha lahustub kuumutades enamustes orgaanilistes solventides, näiteks atsetoonis, toluenis ja benseenis, ilma kuumutuseta on lahustuvus ainult osaline [12]. Põhiliselt koosneb mesilasvaha pika süsinikahelaga alkaanidest, hapetest ja alkoholidest [1]. Mesilasvahas on 13–16% pika süsinikahelaga süsivesinikke (C19–C35), 30–35% paarisarvulise süsinikahelaga rasvhappeid (C16–C36) ja 30–35% paarisarvulise pika süsinikahelaga alkohole (C22–C34) [1,13,14]. Mesilasvaha üheks peamiseks koostisosaks on müritsüülpalmitaat (C₁₅H₃₁COOC₃₀H₆₁) [15], lisaks on selle põhikomponentideks veel heptakosaan (C₂₇H₅₆), hentriakontaan (C₃₁H₆₄), pentakosaan (C₂₅H₅₂) ja nonakosaan (C₂₉H₆₀) [13].

2.1.2 Karnaubavaha

Karnaubavaha on Brasiilias kasvava karnauba palmi (*Copernicia cerifera*) lehtedest saadav vaha [1]. Euroopasse jõudis karnaubavaha 17. sajandil [1]. Esimene karnaubavaha tööstus alustas 1856. aastal Brasiilias [1]. Tänapäeval kasutatakse karnaubavaha põhiliselt farmaatsiatööstuses tablettide katetes [1]. Karnaubavaha kasutatakse ka kosmeetikas ja toiduainetööstuses [1].

Karnaubavaha saamiseks purustatakse palmi lehed ja keedetakse vees, mille käigus eraldub lehtedelt vaha [1]. Karnaubavaha värvus sõltub sellest, millistest lehtedest on vaha tehtud [1,16]. Noortest lehtedest saadud vaha on helekollane, samas vanematest lehtedest tehtud vaha on pruun või hall [1,16]. Karnaubavaha sulamistemperatuur on vahemikus 82 °C kuni 86 °C [16]. Karnaubavaha on võimalik lahustada eetris ja kloroformis [16]. Karnaubavaha koosneb põhiliselt paarisarvulise süsinikahelaga estritest (C48–C62), paarisarvulistest pika süsinikeahelaga alkoholidest (C22–C34), paarisarvulise süsinikahelaga küllastunud rasvhahapetest (C16–C28) ja triterpeenidest [1,2,13,14]. Üheks põhikomponendiks karnaubavaha puhul on müritsüültserotaat (C₂₅H₅₁COOC₃₀H₆₁) [15], karakteristikud komponendid on ka näiteks beheenhape (C₂₂H₄₄O₂) ja 4-hüdroksükaneelhape (C₉H₈O₃) [13,17].

2.1.3 Kandelillavaha

Kandelillavaha on Mehhikost pärit taimne vaha [1]. Traditsiooniliselt on kasutatud kandelillavaha küünalde ja närimiskummi valmistamiseks ning tikkude ja naha töötlemiseks [18]. Esimeses maailmasõjas kasutati kandelillavaha selle hüdrofoobsete omaduste tõttu ka telkide veekindlaks

tegemisel [18]. Tänapäeval kasutatakse kandelillavaha põhiliselt kosmeetikatoodes, kuid vähesel määral ka toiduaine- ja ravimitööstuses [19].

Kandelillavaha saadakse Mehhikos kasvava kandelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) taime lehtedest ja varrest [5]. Taime keedetakse 0,2% väävelhappe vesilahuses, et vaha taimelt eralduks [1]. Kandelillavaha värvus sõltub sellest, millises keskkonnas taime on kasvanud [1]. Värv varieerub pruunist helekollaseni [1]. Kandelillavaha on võrreldes teiste töös uuritud vahadega tunduvalt kõvem ja rabedam [1]. Selle sulamistemperatuur on 68,5 °C kuni 72,5 °C [1,5]. Kandelillavaha on lahustatav orgaanilistes solventides (atsetoonis, eetris, kloroformis jne) [5,20]. Kandelillavaha koosneb suures osas paaritu süsinike arvuga süsivesinikest (ligikaudu 50%, C₂₂–C₃₃) [13,14]. Veel on vaha koostises pika süsinikahelaga estrid (28–29%), alkoholid (ligikaudu 5%) ja rasvhapped (7–9%) ning triterpenoidide estrid (12–14%) [5,14]. Kandelillavaha tunnuskomponentideks on müritsüülalkohol (CH₃(CH₂)₂₈CH₂OH), metüüldotriakontanoaat (C₃₃H₆₆O₂) ja triakontaan (C₃₀H₆₂) [13,14].

2.1.4 Parafiin

Parafiin on mineraalvaha, mida kasutatakse alates 19. sajandist küünalde valmistamiseks. See on ka tänapäeval parafiini põhiline kasutusala. Samuti kasutatakse parafiini näiteks termoliimides viskoossuse parandamiseks ja paberi tootmises (aitab vältida vahu tekkimist tootmisprotsessi käigus). [1]

Parafiini saadakse nafta destillatsiooni jääkidest õli eemaldamise käigus [2]. Puhastatud parafiin on valge ning kristallilise struktuuriga [1,2]. Parafiinvaha sulamistemperatuur on 52 °C kuni 57 °C [2]. Parafiini lahustamiseks on võimalik kasutada tolueeni, ketoone, lakibensiini, benseeni jne, kuid mida suurem on vaha molaarmass, seda keerulisem on lahustamine [1].

Parafiin koosneb põhiliselt erineva pikkusega alkaanidest, mille süsinikahelate pikkus sõltub suurel määral destillatsiooni temperatuurist, kõrgemal temperatuuril destilleerides on süsinikahela pikkus pikem [1]. Erinevates allikates on tihti kirjas erinev süsinikahela pikkus, kuid selles töös on aluseks võetud allikas [1] toodud andmed, mille kohaselt on parafiinides süsinikahelate pikkus 22 süsinikust kuni 60 süsinikuni. Parafiini põhikomponendid on heptakosaan (C₂₇H₅₆), dotriakontaan (C₃₂H₆₆) ja hentriakontaan (C₃₁H₆₄) [13].

2.2 Vahade analüüsimine

Vahasid ja nende koostist on uuritud erinevate meetoditega. Enne tänapäevaste meetodite kasutusele võtmist kasutati vahade tuvastamiseks nende sulamistemperatuuri ja lahustuvust

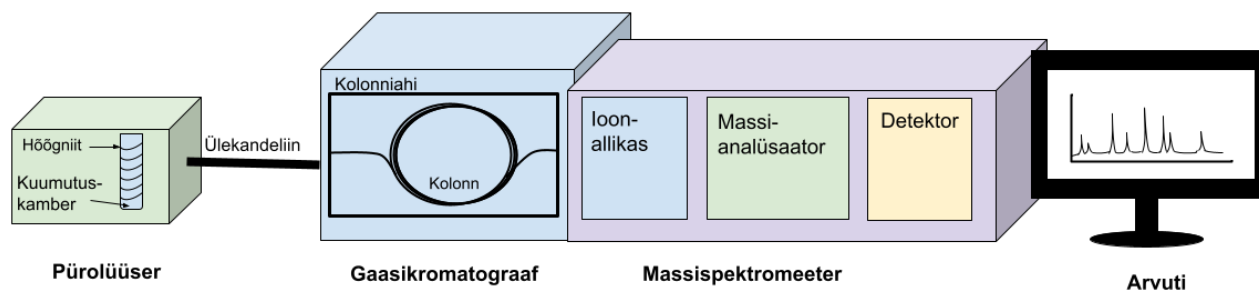
erinevates solventides. Vahade erinevad sulamistemperatuurid ja lahustuvused aitasid kindlaks teha, milline vaha võis proovis olla. Sellised uurimisviisid on destruktiivsed ja ei anna infot vahade koostise kohta. [2]

Tänapäeval kasutatakse vahade koostise uurimiseks näiteks infrapunaskaanspektroskoopiat, gaasikromatograafia-massispektromeetriat (GC-MS), elektropihustus-ionisatsiooni massispektromeetriat (ESI-MS), grafeen-abistatud laserdesorptsioon-ionisatsiooni massispektromeetriat (GALDI-MS) või pürolüüser-gaasikromatograafia-massispektromeetriat (Py-GC-MS) [2,14]. Vahade tuvastamiseks kasutatakse praegusel ajal põhiliselt GC-MS-i [2]. Tegu on võimeka meetodiga keeruka koostisega materjalide uurimiseks, kuid see eeldab ulatuslikku proovi ettevalmistust (sh proovi lahustamist ja tihti ka derivatiseerimist). [2]

Käesolevas töös uuritakse erinevaid vahasid ja nendega tehtud segusid pürolüüser-gaasikromatograafia-massispektromeetriaga. Nimetatud meetodi eelisteks on lihtne proovi ettevalmistus ja võimalus analüüsida tahket proovi [21]. Py-GC-MS-i kasutatakse ka laialdaselt keeruliste kultuuriväärtuslike proovide analüüsimiseks [21,22].

2.2.1 Py-GC-MS

Pürolüüser-gaasikromatograaf-massispektromeeter (Py-GC-MS) on kolmest seadmest koosnev süsteem, mis ühendab pürolüüseri gaasikromatograaf-massispektromeetriga. Py-GC-MS-i ehitus on toodud Joonisel 1.



Joonis 1. Py-GC-MS ehitus [23].

Pürolüüser

Pürolüüser (Py) on seade, milles toimub pürolüüs. Pürolüüs on protsess, kus õhuvabas keskkonnas kõrgel temperatuuril kuumutamisel (tavaliselt 400 °C–800 °C, võimalik kuni 1400 °C) lagunevad makromolekulid väiksemateks pürolüüsiproduktideks (sidemete, peamiselt süsinik-süsinik sidemete, katkemise tõttu). Selleks, et pürolüüs oleks korratav ja komponendid laguneksid iga kord

samamoodi, peavad temperatuur, kuumutamiskiirus ja kuumutamisaeg olema iga kord samasugused. Töös kasutati pürolüüsi proovi ettevalmistusmeetodina. [21–25]

Pürolüüserid jagatakse nende kuumutamiskiiruse järgi kolmeks: mikroahjuga (*microfurnace*), Curie punkti ja hõõgniidiga pürolüüserid [25]. Käesolevas töös kasutatakse hõõgniidiga pürolüüserit. Hõõgniidiga pürolüüseris pannakse proov kvartsist pürolüüseri proovikapillaari (PPK) ja sisestatakse see pürolüüsiks kuumutuskambrisse, mis vakumeeritakse [22,25,26]. Kuumutuskambri ümber on hõõgniit, mida kuumutatakse hõõgniidist voolu läbi lastes, soovitud temperatuuri saavutamiseks mõjutatakse voolutugevust [22,25]. Hõõgniidiga pürolüüseris võib saavutada ligikaudu 1400 °C temperatuuri millisekunditega [25]. Pärast pürolüüsi liiguvad pürolüüsiproduktid edasi gaasikromatograaf-massispektromeetrisse [25]. On olemas kahe erineva lahendusega pürolüüserid, ühed, mis on ühendatud otse GC külge, ja teised, millel on pürolüüser ühendatud GC-ga ülekandeliiniga (kasutati käesolevas töös, Joonis 1) [27,28].

Gaasikromatograaf-massispektromeeter

Kromatograafia on meetod, mis võimaldab segud komponentideks eraldada. Kromatograafias on mobiilne ja statsionaarne faas, kus iga komponent interakteerub faasidega erineva aja. Tänu sellele on võimalik segudest komponendid erinevatel aegadel detekteerida. [29]

Gaasikromatograafia (GC) eraldab komponente nende lenduvuse ja faaside interakteerumise järgi. GC-s on mobiilseks faasiks kandegaas, näiteks heelium. Kandegaas liigub proovi sisestussüsteemi, kust võtab kaasa segu komponendid, mis on lenduval kujul. Tagamaks, et proov oleks lenduv, on sisestussüsteemis kõrge temperatuur (selles töös 300 °C). Edasi viib kandegaas komponendid GC kolonni. GC-s on kahte tüüpi kolonne: täidiskolonnid ja kapillaarkolonnid. Tänapäeval on gaasikromatograafias levinumad kapillaarkolonnid, kus statsionaarne faas on tavaliselt kõrge molekulaarmassiga vedelik (nt (5%-fenüül)metüülpolü-siloksaan), mis on kantud õhukese kihina kolonni sisepinnale. Kolonnis interakteeruvad proovi eri komponendid statsionaarse faasiga erineva aja vältel ja seetõttu jõuavad komponendid detektorisse eri aegadel. GC detektoriks võib olla näiteks massispektromeeter (selles töös kasutusel) või leek-ionisatsioon-detektor (FID). [25,29]

Massispektromeetria (MS) on selektiivne meetod, millega on võimalik tuvastada komponente nende massi ja laengu suhte järgi (m/z). GC-MS-i puhul liigub proov pärast GC kolonnist väljumist MS-i ionallikasse, kus proovi komponendid saavad laengu. GC-MS-is kasutatakse tavaliselt ionide tekitamiseks elektronionisatsiooni (EI). EI-is põrkuvad proovi komponentide molekulid

elektronidega (tekitatakse katoodi kuumutamisel). Selle tagajärjel lüüakse molekulist elektron välja ja tekib positiivse laenguga ioon. EI on fragmenteeriv meetod, mistõttu on saadud massispektrid keerukad ja uuritavate ühendite tuvastamiseks kasutatakse andmebaase. Edasi liiguvad ioonid massianalüsaatorisse, milleks selles töös on kvadrupool. Kvadrupool koosneb neljast vardast, millele rakendatakse samaaegselt vahelduvvoolu ja alalisvoolu. Kui neil on kindel vahekord, siis saavad ainult kindla m/z suhtega ioonid liikuda kvadrupoolist läbi detektorisse. [14,29–31]

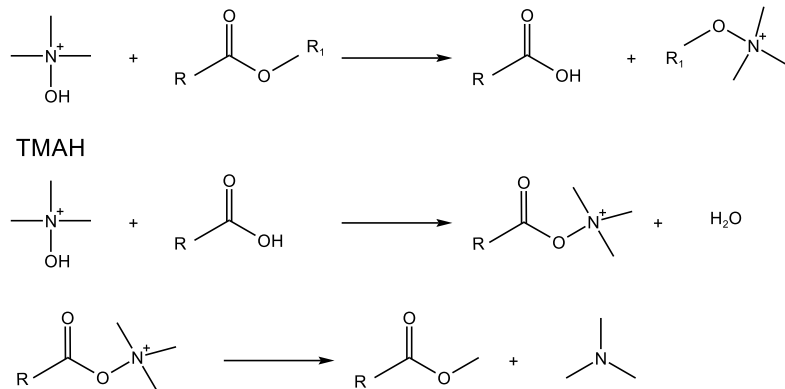
Py-GC-MS-i puhul on väga oluline, et pürolüüseri ja GC vaheline ülekanne oleks hea, et piigid oleks analüüsitavad. Selleks peab pürolüüser kuumutama proovi võimalikult kiiresti, et proov jõuaks kiiresti GC-sse. Kindlasti peab olema proovi kogus väike, et kuumutamine toimuks ühtlaselt. Erinevalt GC-MS-ist võivad Py-GC-MS-is olla proovid ka tahkel kujul, kui ühendid muutuvad kuumutades lenduvaks. Vajadusel saab kasutada derivatiseerimisreagente, mis aitavad komponente lenduvaks muuta. [21,22,32]

Derivatiseerimisreandid

Derivatiseerimisreagent on aine, mis aitab uuritavatel ainetel paremini sobituda kasutatava analüüsimeetodiga. Gaasikromatograafias kasutatakse kahte erinevat derivatiseerimise viisi - metüleerimist või silüülimist. GC puhul parandab derivatiseerimisreagent komponendi lenduvust ja aitab piike üksteisest paremini lahutada. [32,33]

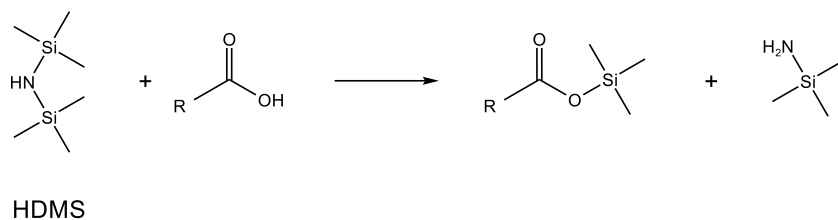
Paljud vaha koostises olevad komponendid ei ole ilma derivatiseerimisreagentideta lenduvad, näiteks rasvhapped ja alkoholid [34,35]. Ka käesolevas töös kasutati vahade uurimiseks derivatiseerimisreagente – metüleerivat tetrametüülammooniumhüdrosiidi (TMAH) ja silüleerivat heksametüüldisilasaani (HMDS).

Py-GC-MS-i proovide jaoks on üks enimkasutatavatest metüleerivatest derivatiseerimisreagentidest tetrametüülammooniumhüdrosiid (TMAH) (vt Joonis 2) [22,36]. Esmalt muudab TMAH metüleeritava aine happeliseks [37]. Edasi metüleerides deprotoneeritakse happelised funktsionaalrühmad ja tekivad tetrametüülammoonium-soolad [17,37]. Tekkinud soolad muutuvad kuumusega vastavateks metüülestriteks [17,37]. Tavaliselt on metüleeritavaks rühmaks näiteks alkoholid (-OH), karboksüülhapped (-COOH), amiinid (-NH) või amiidid (-CONH) [35]. TMAH vajab vähemalt 360 °C kuumutust, mida GC-MS-is proovi sisestusel ei ole võimalik saavutada, aga saab saavutada pürolüüsimisel [38]. TMAH-iga on uuritud näiteks rasvhappeid (vahade üks koostisosa) ja ka vahasid kultuuriväärtuslikes objektides [36,39].



Joonis 2. TMAH-iga metüleerimine estri funktsionaalrühma näitel (R ja R₁ tähistavad erinevaid pikki süsinikahelaid) [37,40].

Teiseks derivatiseerimisreagentiks kasutatakse selles töös heksametüüldisilasaani (HMDS). Tänu HMDS-ile toimub silüülimine [32]. Silüülimise käigus vahetatakse näiteks alkoholi (-OH), karboksüülhappe (-COOH) või amiini (-NH) rühma vesinik silüülrühmaga (vt Joonis 3) [35]. Erinevalt TMAH-iga derivatiseeritud proovi analüüsil saadud tulemustest on silüülitud komponente keerulisem tuvastada, sest GC-MS ja ka Py-GC-MS andmete tuvastamiseks kasutatavates andmebaasides leidub vähem vasteid silüülitud ühendite kohta [35]. HMDS-i on kasutatud arheoloogilistel uurimistel ja mesilasvaha uurimisel derivatiseerimisreagentina [41,42].

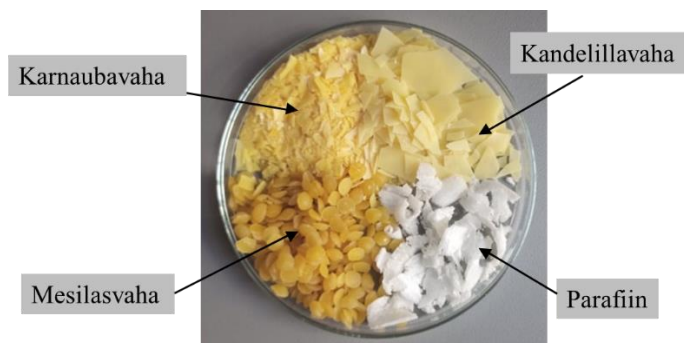


Joonis 3. HMDS-iga silüülimine karboksüülhappe näitel [33].

3 EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1 Puhtad vahad

Töös uuriti nelja puhast vaha (vt Lisa 1, Joonis 4): mesilasvaha (*Bienewachs natur*, 62200, Kremer Pigmente GmbH & Co. KG), karnaubavaha (*Carnaubawachs gebleicht*, 62300, Kremer Pigmente GmbH & Co. KG), kandelillavaha (*Candelillawachs*, 62350, Kremer Pigmente GmbH & Co. KG) ja parafiini (TÜ analüütilise keemia õppetooli laost).



Joonis 4. Töös uuritud neli puhast vaha.

Kõiki nelja vaha uuriti värskest. Selleks, et näha kuidas vaha koostis ajaga muutub, analüüsiti neid ka vanandatult. Vanandamine viidi läbi 50 °C juures kuivatuskapis. Temperatuur valiti kõigi vanandatud vahade sulamistemperatuuridest natuke madalam, et vältida vahade sulamist ja komponentide lendumist. Mesilasvaha ja karnaubavaha pandi vananema 2019. aasta suvel. Van't Hoffi võrrandi järgi on nende proovide hinnanguline vanus ligikaudu 95 aastat (juhul kui need oleks vananenud 20 °C juures). Kandelillavaha ja parafiin pandi vananema 2023. aasta algul, mis Van't Hoffi võrrandi järgi teeb nende vanuseks analüüsimise hetkel ligikaudu 2 aastat.

Kärgedest eraldatud vaha

Töö käigus uuriti lisaks kolme erinevat Eestist pärit mesilaskärjest eraldatud vaha, et võrrelda neid kommertsiaalse mesilasvahaga. Mesilaskärjed saadi professor Ivo Leitolt (Mesilaskärg 1) ja Martin Leissoolt (Mesilaskärg 2 ja 3) (vt Lisa 1, Joonis 1).

Enne Py-GC-MS uuringuid tuli kärgedest vaha välja sulatada. Mesilaskärg 3, millel välisel vaatlusel ei olnud muid mesilassaadusi, murti kõigepealt väiksemateks tükkideks. Seejärel kaaluti 1,70 g purustatud kärjetükke ja lisati need 200 ml keeduklaasis olevasse Milli-Q[®] vette. Milli-Q[®] vett oli alguses 150 ml ja seda lisati kuumutamise käigus juurde vastavalt vajadusele, et veetase oleks üle 100 ml. Segu kuumutati ligikaudu 100 °C juures paar tundi. Vaha on väiksema tihedusega kui vesi ja jääb vee pinnale. Kuna oli näha, et vee pinnal olevas vahakihis oli ka muid

mesilassaadusi (õietolm, taruvaik jne), otsustati segu filtreerida. Filtreerimiseks katsetati filterpaberit, sõela ja marlit. Filtreerimine toimis, kui vaha koos muude mesilassaadustega pandi marli sisse ja marli pandi varasemalt kasutatud keeduklaasi, kus oli Milli-Q® vesi. Keeduklaasis olevat vett kuumutati kuni vaha rohkem marlist läbi ei eraldunud. Seejärel tõsteti keeduklaas jahtuma. Kui vesi oli jahtunud, eemaldati tahke vaha vee pinnalt. Mesilaskärg 2-le läheneti teisiti, kuna oli näha, et esimene meetod oli aeganõudev. Lisaks oli sellel kärjel välisel vaatlusel näha rohkem mesilassaaduste jääke, mida pidi vahast eraldama. Kõigepealt kinnitati pingutatud marlitükk teibi abil 250 ml keeduklaasi avale. Keeduklaasis oli 150 ml Milli-Q® vett. Marlile lisati eelnevalt kaalutud (2,11 g) mesilaskärje tükid (vt Lisa 1, Joonis 2 A ja B) ja keeduklaasi hakati kuumutama. Aurustunud vesi sulatas kärjetükkides oleva vaha, mis tilkus läbi marli vette. Aeg-ajalt segati marli peal olevat massi klaaspulgaga. Kui tundus, et rohkem vaha ei eraldu, tõsteti keeduklaas jahtuma (vt Lisa 1, Joonis 2 C). Pärast vee jahtumist eraldati tahke vaha veest. Viimati kirjeldatud meetodit kasutati ka mesilaskärg 1 (8,12 g) jaoks, mis välisel vaatlusel oli lisanditest puhas.

3.2 Vahade segu

Lisaks puhastele vahadele uuriti ka ühte vahade segu - mesilasvaha ja karnaubavaha (1:1). Mõlemad vahad on pärit Kremer Pigmente GmbH & Co. KG-st. Segu valmistati 2019. aastal kultuuriväärtuste analüüsimise töögrupis. Segu valmistamiseks kaaluti võrdne kogus mesilasvaha ja karnaubavaha. Vahasid kuumutati kuni need sulasid. Vedel vahasegu segati klaaspulgaga ühtlaseks. Seejärel valati segu Petri tassile ja jäeti kuivatuskappi 50 °C juures vananema (Van't Hoffi võrrandi järgi oli segu analüüsimise hetkeks ligikaudu 95 aastat vana).

3.3 Isetehtud pitservaha segud

Vahasid on tihti kasutatud pitserite koostises [10]. Selleks, et saada referentsmaterjale pitserite uurimiseks, valmistati Vatikani arhiivi materjalide järgi kolm vahapitseri segu (Lisa 2, Joonis 3):

1. segu 1: mesilasvaha (95%) ja kinaveri (5%) segu;
2. segu 2: mesilasvaha (79%), kinaveri (4%) ja kampoli (17%) segu;
3. segu 3: mesilasvaha (71%), kinaveri (5%), kampoli (18%) ja karnaubavaha (6%) segu.

Segude retseptid saadi tänu Eesti Rahvusarhiivile, kus toimus 2007. aastal Vatikani arhiivaari Enrico Flaiani pitserikoolitus. Segudes kasutati pigmendina Kremer Pigmente GmbH & Co. KG-i kinaveri (*Zinnober*, 4200). Osadele segudele lisati ka kampilvaiku (*Kolophonium hellst balsamharz*, 60300, Kremer Pigmente GmbH & Co. KG).

Segu 1 jaoks kaaluti kõigepealt 50 ml keeduklaasi mesilasvaha ja 1,5 ml Eppendorfi katsutisse kinaveri. Seejärel tõsteti keeduklaas pliidile ja vaha kuumutati. Kui vaha oli sulanud, lisati sellele kinaver ja segati klaaspulgaga. Viimaks tõsteti keeduklaas jahtuma. Segu 1 saadi kokku 1,04 g.

Segu 2 puhul kaaluti 50 ml keeduklaasi mesilasvaha ja Eppendorfi katsutisse kinaveri. Lisaks valmistati kampolvaigu lahus etanoolis. Selleks kaaluti 16 ml viaali kampolvaik ja lisati sellele etanooli. Valmistatud lahuse kontsentratsioon oli 0,072 g/ml. Segu 2 valmistamiseks kuumutati keeduklaasis olev mesilasvaha sulamiseni ja lisati sellele 2,5 ml kampolvaigu lahust. Segu segati klaaspulgaga ja seejärel lisati keeduklaasi kinaver ning jätkati segamist. Kui segu oli ühtlane, tõsteti see jahtuma. Segu 2 lõppmassiks saadi 1,27 g.

Segu 3 jaoks kaaluti 50 ml keeduklaasi karnaubavaha, kaaluklaasi mesilasvaha ja Eppendorfi katsutisse kinaver. Algul kuumutati keeduklaasis olevat karnaubavaha sulamiseni (karnaubavaha sulab mesilasvahast kõrgemal temperatuuril). Seejärel lisati keeduklaasi mesilasvaha ja segati klaaspulgaga kuni mesilasvaha oli sulanud. Siis lisati vahade segule 2,5 ml eelnevalt valmistatud kampolvaigu lahust. Segu 3 segamist jätkati ja keeduklaasi lisati kinaver. Segu segati kuni see muutus ühtlaseks. Seejärel tõsteti segu jahtuma. Segu 3 saadi 0,96 g.

Kõik pitservaha segud jäeti vananema kuivatuskappi 50 °C juurde. Valmistatud pitservaha segusid analüüsiti värskelt ja pärast seda 1. nädalal pärast valmistamist (Van't Hoffi võrrandi järgi ligikaudu 4 kuud vanad) ning 6. nädalal pärast valmistamist (Van't Hoffi võrrandi järgi ligikaudu 2 aastat vanad).

3.4 Ajaloolistelt objektidelt saadud proovid

Töö üheks eesmärgiks oli teada saada, kas välja töötatud Py-GC-MS meetodika sobib ka reaalselt kultuuriväärtuslikelt objektidelt pärit proovide analüüsimiseks. Antud töös uuriti kahte pitseri ja ühte skulptuuri proovi.

Esimeseks vahapitseri prooviks oli 1270. aastast pärit Rootsi tulevase kuninga Magnus Ladulås'i pitserist saadud proov. Teiseks vahapitseri prooviks oli Taani kuninga Erik Klipping'i pitserist saadud proov, mis pärines 1282. aastast. Mõleamad pitseri proovid saadi konservaatorilt Marek Pressilt. Pitseri proovide puhul sooviti teada, millist vaha kasutati pitserite valmistamiseks.

Kolmandaks uurimisobjektiks oli Amandus Heinrich Adamsoni skulptuur "Kalevipoeg ja vanasarvik" (Eesti Kunstimuuseum KUMU), mis pärineb aastast 1896. Töös analüüsitud proov oli võetud skulptuuri sisemuses olevast plastiliinist. Selle proovi kohta sooviti teada saada, kas proov sisaldab vaha ja mis vahaga on tegemist.

Kõikide proovide puhul vaadeldi proovitükke kõigepealt Leica optilise stereomikroskoobiga (M165 FC) ja tehti neist ka pildid. Seejärel analüüsiti proove Py-GC-MS-iga ning mõõtmisteks kasutati käesolevas bakalaureusetöös välja töötatud meetodikat.

3.5 Uuringud Py-GC-MS-iga

Töös kasutati CDS Pyroprobe 6200 (CDS 6000 Pyroprobe juhtprogramm) pürolüüserit, mis oli ühendatud kuumutatud ülekandeliiniga Agilent 6890n gaasikromatograafi ja Agilent 5973 massispektromeetrilise detektoriga (MSD Productivity ChemStation juhtprogramm). Analüüsimisel kasutati Agilent HP-5ms 30 m kolonni. Kapillaarkolonni statsionaarseks faasiks oli (5%-fenüül)metüülpolüsiloksaan sisediameetriga 0,25 mm ja statsionaarse faasi kihi paksuseks oli 0,25 µm. Kandegaasiks oli heelium (He, puhtus 6.0 ehk 99,9999%). Derivatiseerimiseks kasutati TMAH-i (Sigma-Aldrich 25 wt% lahus metanoolis) ja HMDS-i (Sigma-Aldrich, puhtus > 99,0%). Pürolüüseri ja GC-MS-i vahelise ülekandeliini temperatuur oli kõikide proovide analüüsimisel 320 °C ja GC-MS-i sisendi (*inlet*) temperatuuriks oli 300 °C. Töös kasutati MS-i skaneerivat režiimi. Kõigil meetodikatel oli MS-i skaneerimise vahemik m/z 28 – 600. Proovi TMAH-iga derivatiseerides oli solvendi viivitus (*solvent delay*) 2,6 minutit ja HMDS-iga derivatiseerimise korral 3,6 minutit.

Iga mõõtmisseeriat Py-GC-MS-iga alustati instrumendi puhastusest. Kõigepealt puhastati majapidamispaberi ja etanooliga pürolüüseri automaatsisestaja (*autosampler*) augud. Seejärel puhastati Py-GC-MS süsteemi. Selleks lisati kvartsist pürolüüseri proovikapillaari (PPK, CDS Analytical) 5 µl tolueni ja heksaani segu (1:1), asetati see automaatsisestajasse ja analüüsiti spetsiaalselt puhastamiseks koostatud Py-GC-MS programmiga. Puhastusprogrammi pürolüüs toimus 400 °C juures 10 sekundit, GC-MS-i kolonni kuumutamine toimus 50 °C kuni 300 °C (temperatuuri tõsteti 20 °C/min). Kui peale puhastust ei olnud pürogrammis piike näha, siis alustati proovide analüüsimist. Kui puhastuse pürogrammis olid piigid, korraldi puhastusprotseduuri.

Proovi analüüsimiseks Py-GC-MS-iga pandi väike tükk tahket proovi (ligikaudu 0,01–0,1 mg) PPK-sse. Seejärel lisati sellele 5 µl derivatiseerimisreagenti (TMAH-i või HMDS-i) ja asetati PPK pürolüüseri automaatsisestajasse. Proove analüüsiti eelnevalt seadistatud pürolüüsise ja GC-MS-i mõõtmismetodikate alusel (vt peatükki 4.1). Pärast igat proovi mõõdeti samadel tingimustel tühiproov (*blank*), kus PPK-s oli ainult derivatiseerimisreagent, et jälgida süsteemi puhtust ning näha, millised piigid on pärit proovist ja millised derivatiseerimisreagentist. Kui tühiproovi pürogrammis olid piigid, mis ei kuulunud derivatiseerimisreagentidele, siis korraldi tolueni ja

heksaani seguga puhastust. Iga mõõtmisseriesia lõpus tehti uuesti tolueni ja heksaaniga puhastus. Vajadusel korrati puhastust kuni saadud pürogrammis piike enam ei esinenud.

Analüüsi tulemusel saadi pürogramm, kus igale piigile vastab kindel komponent. Komponent tehti kindlaks massispektri abil. Pürogramme analüüsiti MSD ChemStation Data Analysis Application programmiga. Töös kasutati kõigepealt NIST-i (*National Institute of Standards and Technology*, 2014. aasta andmebaasi versioon) andmebaasi ja seejärel AMDIS-e (*Automated Mass-Spectral Deconvolution & Identification System*, versioon 2.72) andmebaasi. Andmebaaside antud vasteid võrreldi kirjandusest leitud andmetega ja nende abil tehti kindlaks proovi komponendid. Mõlemad andmebaasid leiavad massispektrite järgi pürogrammi piigile vastava kõige tõenäolisema komponendi. Piikide puhul jälgiti retensiooniaega, andmebaasi pakutud komponenti ja NIST-i puhul ka massispektri kattuvust andmebaasis oleva infoga. Kattuvus NIST-i andmebaasiga pidi olema suurem kui 60%. AMDIS-e puhul andis andmebaas kohe tulemused, millel oli pürogrammi piigile vastava massispektri kattuvus andmebaasis oleva massispektriga suurem kui 60%.

3.5.1 Probleemid Py-GC-MS-iga

Uuringud Py-GC-MS-iga olid raskendatud sellega esinenud probleemide tõttu. Järgnevalt on koondatud probleemid, millega peab mõõtmiste tegemisel arvestama.

Py-GC-MS-i puhtus

Üks esimesi probleeme esines juba pärast paari mõõtmist, kui pürogrammides hakkasid välja tulema piigid, mis vahale ei kuulunud. Seetõttu lisati Py-GC-MS-i mõõtmisseriesia algusesse ning lõppu tolueni ja heksaani segu mõõtmine, mis aitas puhastada pürolüüseri kuumutuskambrit ja GC kolonni. Lisaks lisati igale pürolüüsimise programmile automaatne kuumutuskambri puhastus pärast iga proovi (ka tühiproovi) analüüsimist. Automaatse kuumutuskambri puhastuse käigus kuumutati seda pärast PPK eemaldamist 15 sekundit 1000 °C juures, et kuumutuskambrisse jäänud jäägid eemalduksid.

Samuti võeti vajadusel kasutusele GC kolonni puhastus, mille käigus kuumutati seda 300 °C juures umbes 30 minutit enne mõõtmistega alustamist.

Probleeme oli ka pürolüüseri automaatsisestajaga, kuhu PPK-d aeg-ajalt kinni jäid ja seetõttu esines ka nende purunemist ja mõõtmisseriesiate katkemist. Töö käigus täheldati, et see oli tingitud pürolüüseri automaatsisestaja avade määrdumisest (nt TMAH-iga ettevalmistatud vaha proovid olid automaatsisestajas seistes PPK välisküljele kondenseerunud), mille tõttu need olid kleepuvaks muutunud. Probleemi lahenduseks viidi mõõtmisseriesiasse sisse pürolüüseri automaatsisestaja

aukude puhastus etanooliga. Samuti jälgiti enne iga PPK asetamist automaatsisestaja avasse, et selle välimine külg ei oleks proovi ettevalmistusel määratud. Vajadusel puhastati PPK enne automaatsisestajasse asetamist atsetooniga.

Samuti puhastati pürolüüseri automaatsisestajat ja selle auke regulaarselt tolmust ja klaasikildudest (purunenud PPK-dest) suruõhu abil.

PPK-de puhastus ja taaskasutamine analüüsiks

Probleemiks osutus ka PPK-de taaskasutus ja nende puhastamine. Algselt kasutati PPK-sid ühe korra, kuid kuna ühe PPK hind on 5 eurot ja päevas võis neid kuluda kuni 20 tükki, siis hakati tegema PPK-de puhastust, et neid järgmistes analüüsides taaskasutada. Kõigepealt puhastati pürolüüserist väljunud PPK vati ja atsetooniga. Seejärel lisati PPK-sse tolueeni ja heksaani segu (1:1) ning kuumutati seda pürolüüseris 20 sekundit 1000 °C juures. Selleks kasutati spetsiaalset PPK puhastusprogrammi (pürolüüseri juhtprogrammi lisafunktsioon). Enamus sellise puhastuse läbinud PPK-d olid uuesti kasutatavad. Korduvalt TMAH-i kasutamisest ja PPK kuumutamisest kõrgetel temperatuuridel tekkisid nendesse mikromõrad ja pärast mitmekordset kasutamist purunesid need kergesti. Seetõttu jälgiti, et puhastatud PPK-d ei oleks nähtavate mõradega või muude defektidega ning tuhmid. Täheledati, et ühte PPK-d oli võimalik kasutada 3 – 5 korda.

4 TULEMUSED JA ARUTELU

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli luua Py-GC-MS-i mõõtmismetoodika vahade koostiskomponentide kindlakstegemiseks, mida oleks võimalik kasutada vaha sisaldavate materjalide uurimiseks. Töö käigus testiti erinevaid pürolüüseri ja GC-MS parameetreid ning võrreldi kaht derivatiseerimisreagenti (TMAH-i ja HMDS-i). Väljatöötatud metoodikatega analüüsiti nii värskeid kui vananenud vahasid, mesilasvaha ja karnaubavaha segu, mesilaskärjest eraldatud vahasid ja kolme isevalmistatud pitservaha segu. Väljatöötatud Py-GC-MS mõõtmismetoodikat rakendati kolme kultuuriväärtuslikelt objektidelt pärit proovide koostise uurimiseks. Järgnevalt on esitatud bakalaureusetöö koondatud tulemused.

4.1 Py-GC-MS-i metoodika arendus vahade uurimiseks

Py-GC-MS-i metoodika arendust alustati mesilasvahaga ja derivatiseerimisreagentiks kasutati TMAH-i. Seejärel katsetati väljatöötatud metoodikat karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiini analüüsimiseks, kuna sooviti leida ühte universaalset metoodikat kõikidele vahadele, mis lihtsustaks kultuuriväärtuslikelt objektidelt saadud proovide analüüsimist. Viimaks katsetati teist derivatiseerimisreagenti (HMDS) mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiini analüüsimiseks, et selgitada välja kumb derivatiseerimisreagent toimib vahade puhul paremini.

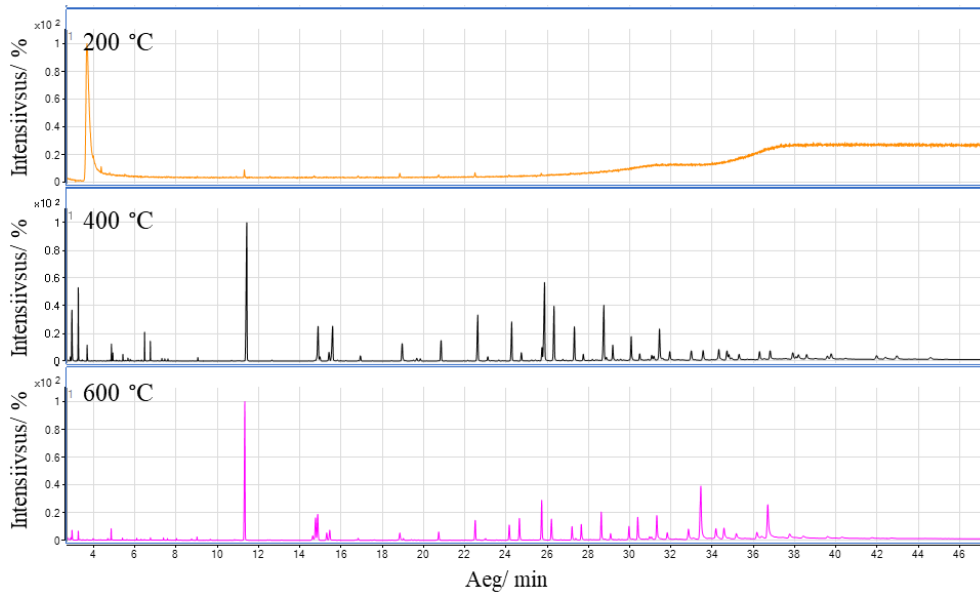
4.1.1 Py-GC-MS metoodika arendus TMAH-iga derivatiseerides

Mesilasvaha

Py-GC-MS metoodika arendust alustati mesilasvaha analüüsimisega. Kõigepealt oli vaja leida sobiv pürolüüsitemperatuur. Kirjanduse andmetel on kasutatud vahade derivatiseerimisel TMAH-iga erinevaid pürolüüsi temperatuure vahemikus 350 °C–600 °C [17]. Seetõttu otsustati katsetada pürolüüsi 400 °C ja 600 °C juures. Lisaks valiti pürolüüsitemperatuuriks veel 200 °C, et kontrollida kirjanduse andmeid ja veenduda, et alla 360 °C ei toimu TMAH-i lisamisel proovi komponentide metüleerimist. Kõikidel katsetatud temperatuuridel viidi pürolüüs läbi 10 sekundi vältel.

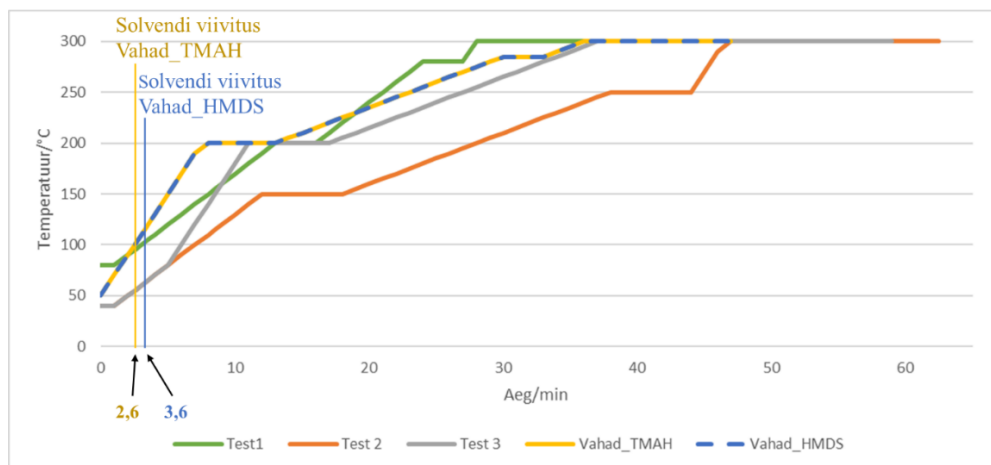
Erinevatel temperatuuridel mesilasvahast registreeritud pürogrammid on toodud Joonisel 5. Nagu Joonisel 5 ülemiselt pürogrammilt on näha, siis 200 °C juures pürolüüsides ei tulnud piisavalt mesilasvaha piike välja ja seega leidis kinnitust, et TMAH vajab proovi derivatiseerimiseks kõrgemat temperatuuri. Pürolüüsides 600 °C juures 10 sekundit tulid pürogrammil välja mesilasvahale iseloomulikud piigid, kuid on näha, et kõik need pole piisavalt lahutunud ja need on madala intensiivsusega (Joonis 5 alumine). Lisaks teostati pürolüüs veel 400 °C juures (Joonis 5

keskmine), mille käigus tulid pürogrammidel välja mesilasvahale omased piigid, mis olid piisavalt lahutunud ja fragmenteerumist esines minimaalselt (erinevalt 600 °C juures saadud tulemusest). Seetõttu otsustati edasistes katsetes jätkata pürolüüsimist 400 °C juures.

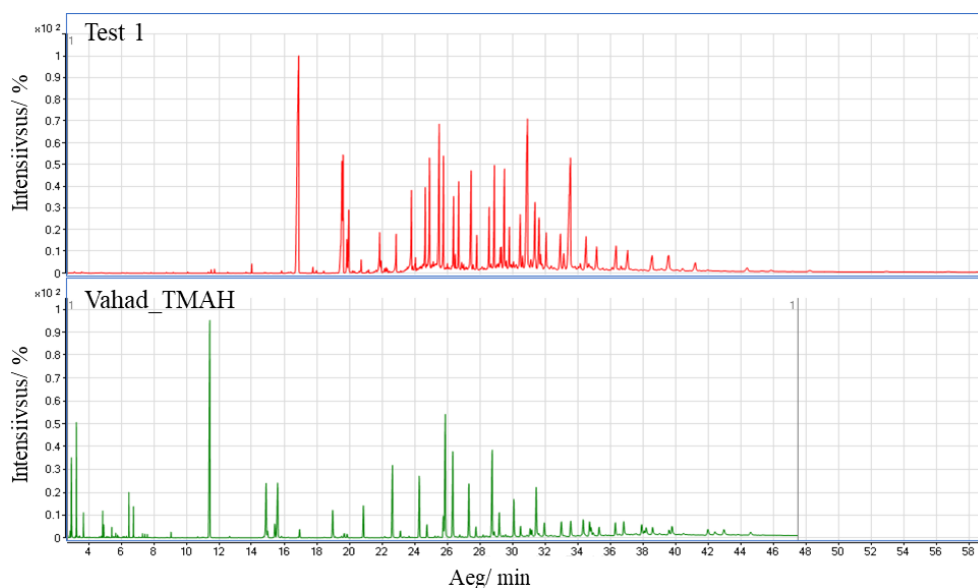


Joonis 5. Mesilasvaha pürogrammid, mis on saadud erinevatel pürolüüseri temperatuuridel (proovi derivatseerimiseks on kasutatud TMAH-i).

Py-GC-MS-i puhul katsetati ka mitut erinevat GC-MS-i kolonni temperatuuriprogrammi (vt Joonist 6). Joonisel 7 on toodud välja algse (Test 1) ja lõpliku (Vahad_TMAH) GC-MS temperatuuri programmiga saadud pürogrammid, mis kirjeldavad kõige paremini tehtud muudatusi. Kolonni temperatuuriprogrammi arendust alustati varem töörühmas loodud lipiidide analüüsimetoodikast, millele hakati vahadest lähtuvalt muudatusi tegema (Test 1). Esimese kolme katsetatud GC-MS metoodikaga (Test 1, Test 2, Test 3) saadud pürogrammidel olid piigid kas liiga koos (Test 1 (Joonis 7 ülemine) ja Test 2) või oli mõõtmiseks kuluv aeg liiga pikk (Test 3). Muutes GC-MS-i kolonni algtemperatuuri kõrgemaks (40 °C asemel 50 °C), võrreldes Test 2-ga ja Test 3-ga (Joonis 6), oli võimalik mõõtmisaeg lühendada. GC-MS-i kolonni kuumutamiskiirust varieerides õnnestus piike üksteisest paremini lahutada (Joonis 7). Neid muudatusi tehes saadi mesilasvahale sobiv metoodika (Vahad_TMAH, Joonis 7 alumine). Selle metoodikaga on võimalik proovi analüüsi teostada 47,5 minutiga, mis võrreldes algse 59 minutiga on oluline ajavõit. Samuti olid selle GC-MS temperatuuriprogrammiga piigid üksteisest lahutatud ja pürogrammis esinesid mesilasvahale karakteristikud piigid (vt peatükki 4.2).



Joonis 6. Testitud GC-MS temperatuuriprogrammide võrdlus.



Joonis 7. Mesilasvaha pürogrammid, mis on saadud algse (Test 1) ja lõpliku (Vaha_TMAH) Py-GC-MS-i meetodikaga (pürolüüs viidi läbi 400 °C juures).

Karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiin

Mesilasvahale väljatöötatud Py-GC-MS-i meetodikat katsetati ka karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiini analüüsimiseks. Pürolüüs teostati 200 °C, 400 °C ja 600 °C (kõigil temperatuuridel kuumutati 10 sekundit) juures. Erinevatel temperatuuridel pürolüüsitud karnaubavaha pürogrammid on toodud Lisas 3 Joonisel 4, kandelillavaha pürogrammid on leitavad Lisas 3 Joonisel 5 ja parafiini pürogrammid Lisas 3 Joonisel 6.

Karnaubavaha pürogrammil 200 °C juures pürolüüsid (Lisa 3, Joonis 4 ülemine) vahale omaseid piike ei esine, 400 °C juures (Lisa 3, Joonis 4 keskmine) on vahale kuuluvad piigid piisavalt

lahutunud ja kõrge intensiivsusega. 600 °C juures pürolüüsidest fragmenteervad vaha komponendid ulatuslikult ja selle tõttu piigid kattuvad (Lisa 3, Joonis 4 alumine).

Kandelillavahal 200 °C juures pürolüüsidest (Lisa 3, Joonis 5 ülemine) pürogrammil piike ei ole. 400 °C juures on pürogrammil (Lisa 3, Joonis 5 keskmine) märgatavalt vähem piike, kui teistel vahadel samal temperatuuril esines. Ka kirjanduses on mainitud, et kandelillavaha ei metüleeru hästi [34]. 600 °C juures (Lisa 3, Joonis 5 alumine) on pürogrammil näha oluliselt rohkem piike, kui 400 °C juures. Sel temperatuuril esineb ulatuslik vaha komponentide fragmenteerumine, mistõttu esineb ka piikide kattumist. Kuna 400 °C juures tulid kandelillavahale omased tunnuspiigid välja, siis otsustati pürolüüsimist jätkata sarnaselt eelmistele vahadele selle temperatuuri juures.

Parafiini koostises on põhiliselt alkaanid, mida TMAH ei derivatiseeri. Töö käigus sooviti parafiini analüüsida siiski ka koos derivatiseerimisreagendiga, et näha kas on võimalik saada derivatiseerides parafiinile iseloomulikke piike pürogrammis. Parafiinil on 200 °C juures pürolüüsidest saadud pürogrammil (Lisa 3, Joonis 6 ülemine) näha väga väikese intensiivsusega alkaanidele vastavaid piike (väike intensiivsus võib olla tingitud väiksest proovi kogusest). Parafiini pürolüüsimisel 400 °C juures (Lisa 3, Joonis 6 keskmine) tulevad pürogrammis esile intensiivsed ühtlaste vahedega piigid, mis tekitavad justkui künka. 600 °C juures pürolüüsidest (Lisa 3, Joonis 6 alumine) on parafiini pürogrammilt näha sarnaselt 400 °C juures saadud tulemusele ühtlaste vahedega piike, kuid 600 °C juures on piike rohkem. Samas esines 400 °C juures pürolüüsidest vähem fragmenteerumisest tulevaid lisa piike, seetõttu otsustati ka parafiini puhul jätkata 400 °C juures pürolüüsimisega.

Kokkuvõtteks

Tehti kindlaks, et TMAH on kõikidele analüüsitavaatele vahadele sobiv derivatiseerimisreagent. Py-GC-MS meetodika arenduse käigus leiti, et nii mesilasvahale, karnaubavahale, kandelillavahale kui parafiinile sobib pürolüüsimise temperatuuriks 400 °C (10 sekundi jooksul). Töötati välja ka kõikidele töös uuritud vahadele sobiv GC-MS-i temperatuuriprogramm, kus kuumutamine toimus järgmiselt: kolonni hoiti alguses 50 °C juures 2 minutit, seejärel kuumutati seda kiirusega 20 °C/min kuni 200 °C -ni. Järgmiseks 200 °C hoiti 6 minutit ja edasi kuumutati kiirusega 5 °C/min kuni 285 °C -ni, kus hoiti temperatuuri 3 minutit. Seejärel jätkati 5 °C/min kuumutamist 300 °C-ni. Viimaks 300 °C hoiti 11 minutit.

Kokkuvõtteks saab öelda, et suudeti välja töötada kõikidele analüüsitavatele vahadele universaalne Py-GC-MS mõõtmismetoodika, mis võimaldab analüüsida väikeseid proove ilma mahuka prooviettevalmistuseta ja saadud pürogrammides on piigid hästi lahutunud, need on informatsioonirikkad võimaldades teha vahet erinevadel vahadel ja tuvastada nende põhilised komponendid (vt peatükk 4.2). Selline universaalne metoodika on kultuuriväärtuslike materjalide analüüsimise seisukohalt kasulik, kuna tihti on nende proovikogused väga väikesed, mistõttu ei saa kasutada mitmeid erinevaid analüüsimeetodeid.

4.1.2 Py-GC-MS-i metoodika arendus HMDS-iga derivatiseerides

Lipiidide, sh vahade derivatiseerimiseks HMDS-iga on kirjanduses toodud väga erinevaid pürolüüsimise temperatuure, mis jäävad vahemikku 480–600 °C [41–43]. Seetõttu valiti käesolevas töös testimiseks pürolüüsimise temperatuuriks 500 °C (20 sekundi vältel). GC-MS-i puhul katsetati TMAH-iga derivatiseerimiseks välja töötatud metoodikat. Selles muudeti ainult solvendi viivitust 2,6 minutilt 3,6 minutile, sest muidu segas derivatiseerimisreagentist tulenev piik pürogrammide interpreteerimist. Kasutatud GC-MS-i temperatuuriprogramm on toodud Joonisel 6 (Vahad_HMDS).

HMDS-iga mesilasvaha derivatiseerimisel saadud pürogrammil (Lisa 4, Joonis 7 alumine) on näha, et piigid on lahus. Kui võrrelda HMDS-iga derivatiseeritud mesilasvaha pürogrammi TMAH-i omaga (Lisa 4, Joonis 7 ülemine), siis viimasel on näha rohkem mesilasvahale omaseid piike. HMDS-iga derivatiseeritud mesilasvaha pürogrammides tulevad esile ainult alkaanid, aga mitte mesilasvahale iseloomulikud pika süsinikahelaga happed ja alkoholid.

HMDS-iga derivatiseeritud karnaubavaha pürogrammil (Lisa 4, Joonis 8 alumine) on näha palju madala intensiivsusega piike, mis on ka mõnes kohas üksteisega kattunud, see on ilmselt tulnud vaha komponentide fragmenteerumisest. HMDS-iga derivatiseeritud karnaubavaha pürogrammiga võrreldes on TMAH-iga derivatiseeritud vaha pürogrammil (Lisa 4, Joonis 8 ülemine) näha oluliselt rohkem kõrge intensiivsusega, üksteisest lahutunud vahale omaseid piike.

HMDS-iga derivatiseeritud kandelillavaha pürogrammil (Lisa 4, Joonis 9 alumine) on vähe piike sarnaselt TMAH-iga derivatiseeritud vaha pürogrammile (Lisa 4, Joonis 9). Siiski on mõlemas pürogrammis olemas kandelillavahale omased piigid.

HMDS-i juuresolekul analüüsitud parafiini pürogrammilt (Lisa 4, Joonis 10 alumine) on näha ühtlaste vahedega piike nagu ka TMAH-iga koos uuritud parafiini pürogrammil (Lisa 4, Joonis 10

ülemine). Pürogrammide võrdlusest on näha, et ka HMDS ei mõjuta parafiini analüüsimist Py-GC-MS-ga.

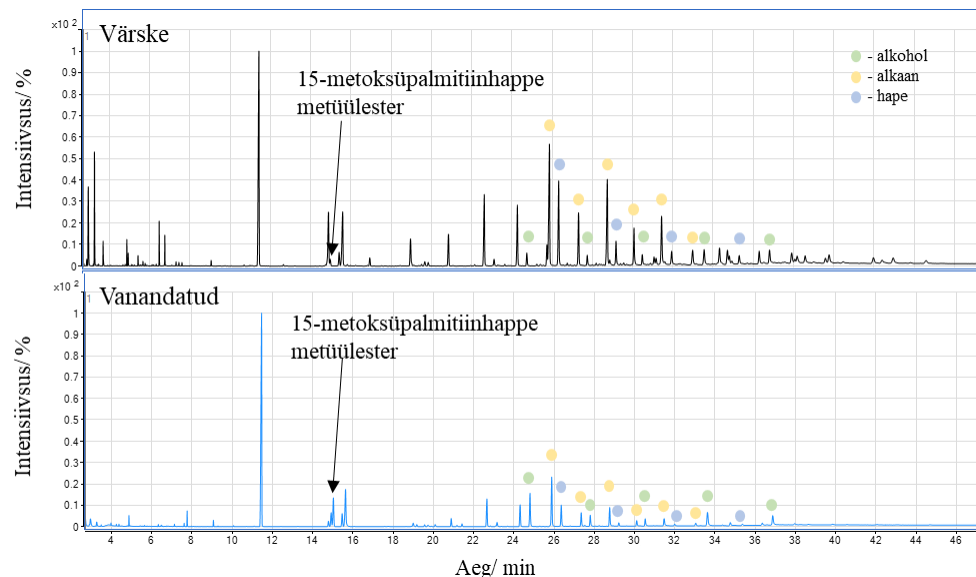
HMDS-iga derivatiseeritud vahade pürogrammidest oli näha, et antud reagent sobib küll vahade silüleerimiseks, aga paremate tulemuste saamiseks on vaja läbi viia põhjalikum Py-GC-MS meetodika arendus (testida erinevaid pürolüüsamise temperatuure ja GC-MS-i temperatuuriprogramme). Kuna esialgsed uuringud näitasid, et ka TMAH on võimekas derivatiseerimisreagent vahade metüleerimiseks ning tulemuseks on pürogrammid, mille põhjal on võimalik vahade koostist analüüsida, siis otsustati tööd jätkata TMAH-iga. Oluliseks põhjuseks TMAH-iga derivatiseerimise jätkamiseks on veel ka asjaolu, et metüleeritud komponentide jaoks leiduv andmebaasides rohkem informatsiooni kui silüleeritud komponentidele.

4.2 Puhaste vahade pürogrammide interpreteerimine

Reaalsete proovide analüüsimisel on suureks abiks referentsmaterjalide mõõtmisandmed. Käesoleva töö käigus analüüsiti nii värskete kui vanandatud vahade proove. Kõikide vahade jaoks kasutati derivatiseerimisreagentina TMAH-i ja loodud Py-GC-MS-i mõõtmismetoodikat (vt peatükki 4.1). Järgnevalt on toodud saadud pürogrammide interpreteerimise tulemused.

Mesilasvaha

Värsked ja vanandatud mesilasvaha pürogrammid on toodud Joonisel 8. Lisas 5 Tabelis 1 on esitatud värsked ja vanandatud mesilasvaha pürogrammide interpreteeringud.



Joonis 8. Värsked ja vanandatud mesilasvaha pürogrammide võrdlus.

Värske mesilasvaha pürogrammis (Joonis 8 ülemine) on näha mitmeid vahale omaseid piike. Näiteks intensiivne piik 11,42 minutil, mis kuulub palmitiinhappe metüülesterile ja 14,97 minutil olev piik, mis kuulub 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestrile. Viimast on ka kirjanduses välja toodud tunnuspiigina mesilasvaha tuvastamiseks [14,34]. Lisaks võib mesilasvaha pürogrammilt näha mustrit, mille moodustavad alkaanid ja pika süsinikahelaga alkoholid ja happed. Joonisel 8 toodud ülemisel pürogrammil hakkab 24,74 minutist korduma muster, millel on järgnev komponentide järjestus: alkohol, alkaan, hape, alkaan jne. Selline muster kordub praktiliselt pürogrammi lõpuni. Tuvastatud alkaanide süsinikahela pikkus on 15 süsinikust kuni 32 süsinikuni. Alkoholide puhul on see C25-st kuni C33-ni ja hapetel C25-st kuni C29-ni. Sellist mustrit on varasemalt kirjeldatud ka kirjanduses [13].

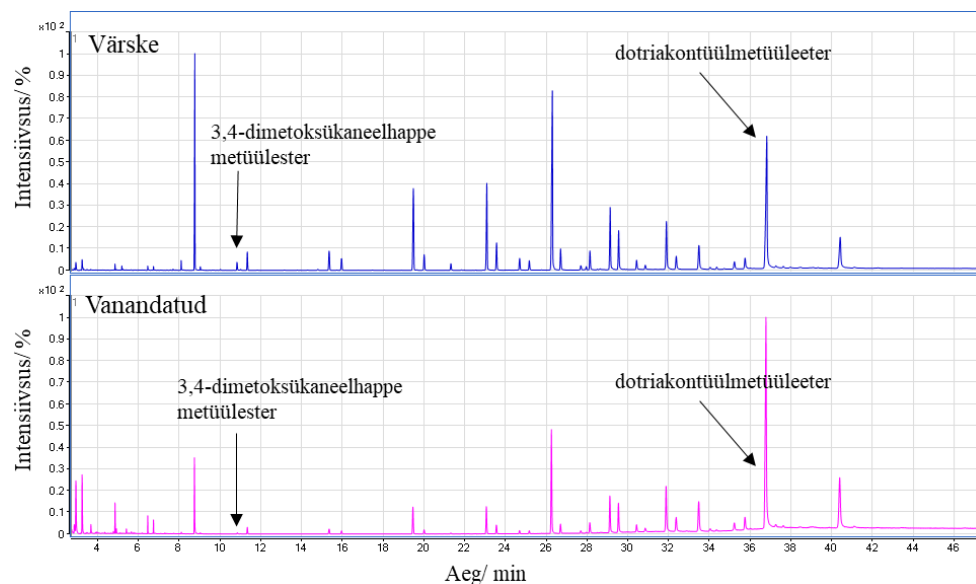
Vananenud ja värskel mesilasvahal koostises märgatavaid muutuseid ei täheldatud (Joonis 8 alumine). Vanandatud mesilasvahal on olemas nii mesilasvaha tunnuspiik 14,97 minuti juures kui ka alkaani, alkoholi ja happe vahelduv muster. Komponentide tabelis (Lisa 5, Tabel 1) esinevad erinevused tulenesid enamjaolt sellest, et analüüsitud proovi kogused on väiksed (0,01–0,1 mg) ja proovi ei ole võimalik alati samas koguses PPK-sse lisada. Seetõttu on piikide intensiivsused pürogrammidel erinevad ja mõned madala intensiivsusega piigid ei tule mõõtmisega välja.

Lisaks kommertsiaalselt saadud mesilasvahale uuriti käesolevas töös ka mesilaskärgedest eraldatud mesilasvaha. Kärgedest saadud pürogrammid on esitatud Lisas 5 Joonisel 11, nende interpreteering on toodud Lisas 5 Tabelis 2. Erinevatest kärgedest eraldatud mesilasvahade pürogrammid olid omavahel sarnased. Erinevus kärgede koostises, mis ei ole põhjustatud intentsiivsuste erinevusest, on ainult pürogrammi alguses olevate piikide juures. Nimelt on kärjes 17,44 minutil pentadekaan, mida kärgedes 2 ja 3 ei ole. Kärgedest saadud vahade pürogrammides olid olemas mesilasvahale iseloomulik 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestri piik (14,95 min) ja eelnevalt mainitud mustri elemente. Erinevalt kommertsiaalsest mesilasvahast oli kärgedest eraldatud mesilasvahas vähem alkaane, kuid mesilasvahale omast mustrit on siiski osaliselt näha.

Kõikides mõõdetud (värske, vanandatud ja kärgedest saadud mesilasvaha) pürogrammides on olemas mesilasvaha tunnuskomponendi - 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestri piik. Lisaks tuli pürogrammidest välja alkaanide, alkoholide ja rasvhapete muster, mis on väga karakteristiklik ja võimaldab reaalses proovides kindlamalt tuvastada mesilasvaha.

Karnaubavaha

Töös analüüsitud värске ja vanandatud karnaubavaha pürogrammid on välja toodud Joonisel 9 ja komponentide tabel Lisas 6 Tabelis 3.



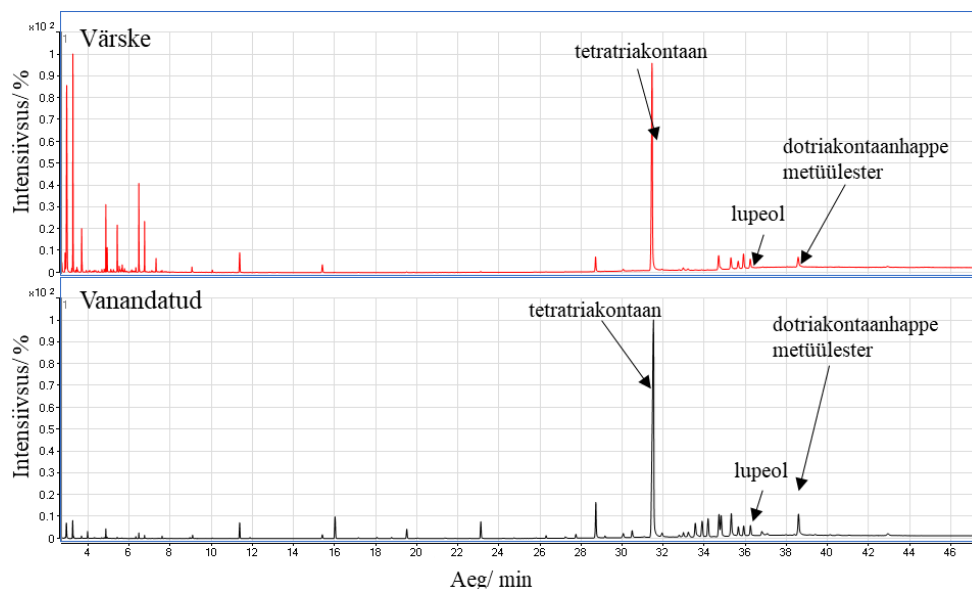
Joonis 9. Värске ja vanandatud karnaubavaha pürogrammide võrdlus.

Värске karnaubavaha pürogrammis (Joonis 9 ülemine) esineb madala intensiivsusega piik 10,84 minutil, mis kuulub 3,4-dimetoksükaneelhape metüülesterile. See piik on välja toodud ka kirjanduses kui karnaubavaha tunnuspiik [17] ning seda töös analüüsitud teiste vahade pürogrammidel ei tuvastatud. Eelmainitud tunnuspiik on leitav ühest värskest ja kahest vanandatud karnaubavaha pürogrammist. Värске proovi pürogrammis, millelt antud komponendi piik puudus võis olla selle intensiivsus nii madal, et seda ei olnud võimalik tuvastada. Karnaubavahale on ka omane 36,91 minutil intensiivne dotriakontüülmetüüleetri piik. Värskest karnaubavahast tuvastati veel pika süsinikahelaga (C11–C32) happeid ja alkohole (C25–C35). Lisaks värsketele karnaubavahale analüüsiti ka vanandatud karnaubavaha (Joonis 9 alumine). Pürogrammil nähtavad piikide erinevused tulevad intensiivsustest, mis on tingitud ilmselt proovi kogusest. Pürogramme lähemalt vaadates komponentides ja piikides erinevusi ei leitud.

Nii värskest kui ka vanandatud proovi pürogrammist on võimalik tuvastada karnaubavahale omane 3,4-dimetoksükaneelhape metüülestri piik ja pika süsinikahelga happeid ja alkohole. Tänu neile on võimalik kultuuriväärtuslikest proovidest tuvastada karnaubavaha.

Kandelillavaha

Kandelillavaha pürogrammid on näha Joonisel 10 ja pürogrammidelt tuvastatud vaha koostise komponendid leiab Lisast 7 Tabelist 4.



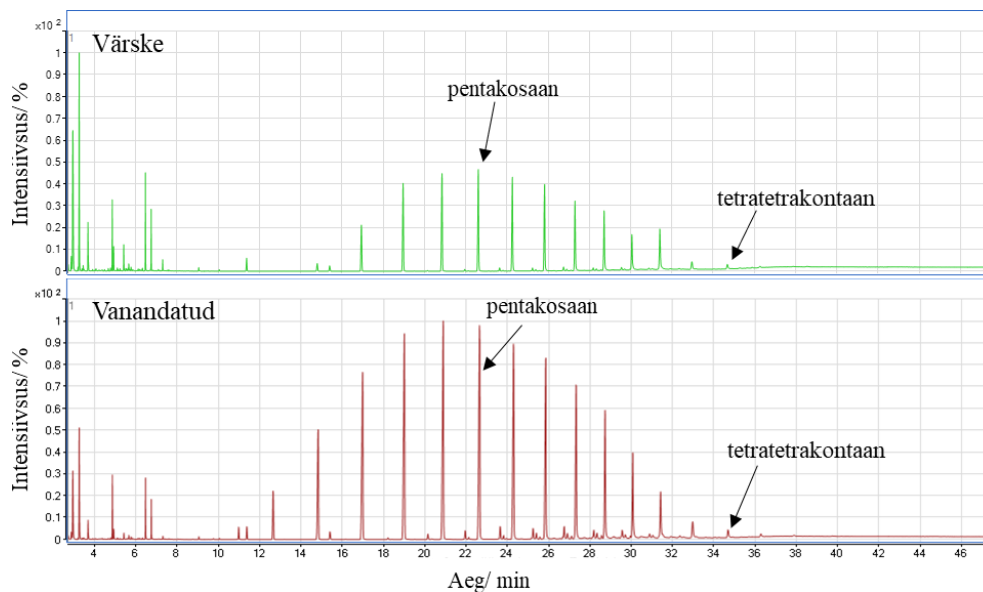
Joonis 10. Värske ja vanandatud kandelillavaha pürogrammide võrdlus.

Erinevalt mesilasvahast, karnaubavahast ja parafiinist on kandelillavahal pürogrammis vähem piike. See tuleneb ilmselt sellest, et selle vaha koostises on komponente, mis ei metüleeru hästi [34]. Värske (Joonis 10 ülemine) ja vanandatud (Joonis 10 alumine) kandelillavaha pürogrammid on väga sarnased. Mõlemal on omane intensiivne piik 31,45 minutil, mis kuulub tetratriakontaanile. Samuti on pürogrammidest näha 36,24 minuti juures olev lupeol, mida üheski teises vahas ei tuvastatud. Kirjanduses on kandelillavaha tunnuspiigiks välja toodud ka dotriakontaanhappe metüülester [13], mida on näha mõõdetud pürogrammidel 38,57 minutil. Vanandatud vaha pürogrammilt on näha 32. minutist kuni 37. minutini rohkem piike võrreldes värske vaha pürogrammiga. Suure tõenäosusega on see tingitud suuremast proovi kogusest (mitte vananemisel toimunud keemilistest muutustest), sest ka enne 31. minutit on vanandatud vaha pürogrammis piikide intensiivsused suuremad.

Värskelt ja vanandatud kandelillavaha pürogrammilt olid leitavad nii kirjanduses mainitud tunnuspiigid, kui ka lupeol. Nende piikide abil on võimalik kandelillavaha teistest selles töös uuritud vahadest eristada ja reaalses proovides kandelilla vaha tuvastada.

Parafiin

Parafiini pürogrammid on Joonisel 11 ja komponentide loetelu on leitav Lisast 8 Tabelist 5.



Joonis 11. Värske ja vanandatud parafiini pürogrammide võrdlus.

Joonisel 11 toodud pürogrammidelt on näha parafiinile iseloomulikke piikide paigutust, kus pika süsinikahelaga alkaanid (C19–C44) asuvad üksteisest võrdsel kaugusel. Neist kõige intensiivsema piigi annab pentakosaan (22,73 min) ja kõige pikema süsinikahelaga alkaan (tetratetrakontaan) asub 34,70 minutil. Pürogrammide alguses on näha ka vähesel määral pika süsinikahelga happeid (C15–C19). Nende tuvastamine on võimalik vaid tänu sellele, et parafiini analüüsimiseks lisati sellele ka TMAH-i. Värske (Joonis 11 ülemine) ja vananenud (Joonis 11 alumine) parafiini pürogrammides on näha, et piikidest künkas on vananenud proovi pürogrammis 10. minutist kuni 16. minutini esile tulnud intensiivsed piigid, mis värskel proovil olid madala intensiivsusega. Kuna vanandatud parafiini pürogrammis piikide intensiivsused on üle terve pürogrammi kõrgemad kui värskel vahast registreeritud pürogrammis, siis võib oletada, et see erinevus tuleneb erinevast proovi kogusest ja vanandamise jooksul parafiiniga keemilisi muutusi pole toimunud.

Analüüsi käigus leiti, et parafiini iseloomustavad pikad alkaanid on pürogrammidel näha, kuid eraldi tunnuspiigiks sobivat alkaani ei ilmnenu. Küll aga täheldati parafiini pürogrammidel üksteisest sarnasel kaugusel asetsevad alkaanide piike. Kuna parafiin on ainuke uuritud proovidest, mis koosneb põhiliselt alkaanidest, siis on võimalik reaalses proovidesväljamistamismeetodiga kindlaks teha, kas proovis võib leida parafiini.

Analüüsitud vahade koostiste võrdlus

Nelja vaha pürogrammide põhjal tuvastatud koostiste võrdlus on toodud Tabelis 1.

Kõigil uuritud vahadel leidusid ühesugused komponendid, mis on märgitud Tabelis 1 roheliselt. Mesilasvahale, karnaubavahale ja kandelillavahale ühised komponendid on Tabelis 1 toodud helerohelisega. Nende kolme vaha ühised piigid on välja toodud, sest erinevalt parafiinist on need läbinud vähem töötlemist ja nende koostis on keerulisem. Võrdlusest on näha, et vahasid eristavad üksteisest mõned üksikud piigid (Tabelis 1 on mesilasvaha tähistatud kollasega, karnaubavaha oranžiga, kandelilla sinisega ja parafiin halliga). Seetõttu on väga oluline reaalses proovides leida vahale omased tunnuspiigid. Kui tundmatus proovis ei ole võimalik tuvastada erinevatele vahadele viitavaid tunnuspiike, aga on olemas näiteks taimsetele ja loomsetele vahadele omased piigid (arahiinhappe metüülester, beheenhappe metüülester jne), siis võib väita, et proovis on vaha. Kokkuvõtvalt võib välja tuua, et mesilasvahas peavad leiduma pika süsinikahelaga alkaanid, alkoholid ja happed. Karnaubavaha puhul peavad ilmenema pika süsinikahelaga alkoholid ja happed. Kandelillavahas on esindatud põhiliselt pika süsinikahelaga happed ja vähesel määral alkaanid. Parafiinis on pika süsinikahelaga alkaanid ja vähesel määral rasvhappeid.

Tabel 1. Nelja vaha koostise võrdlus.

Kollasega on tähistatud mesilasvahale, oranžiga karnaubavahale, sinisega kandelillavahale ja halliga parafiinile omased piigid. Kõikidele vahadele omased piigid on märgitud roheliselt ning helerohelisega on esile toodud taimsete ja loomsete vahade piigid. Piikide retentsiooniaeg kõikus pürogrammide vahel komakohades, seetõttu on tabelis esitatud retentsiooniajad kahe komakohaga.

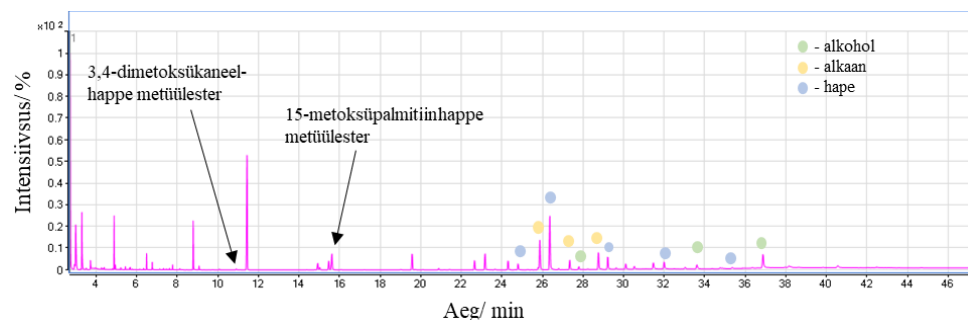
t_R /min	Nimi	Brutovalem	Mesilasvaha	Karnaubavaha	Kandelillavaha	Parafiin
7,60	lauriinhappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	x		x	
7,75	dikarboksüülhappe metüülester	$C_{11}H_{20}O_4$	x		x	
8,74	p-metoksükaneelhappe metüülester	$C_{11}H_{12}O_3$		x		
9,04	müristiinhappe metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	x		x	x
10,05	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	x	x	x	x
10,84	3,4-dimetoksükaneelhappe metüülester	$C_{12}H_{14}O_4$		x		
11,42	palmitiinhappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	x	x	x	x
14,80	heneikosaan	$C_{21}H_{44}$				x
14,96	metüüloleaat	$C_{19}H_{36}O_2$	x			
14,97	15-metoksüpalmitiinhappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x			
15,41	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	x	x	x	x
16,93	dokosaan	$C_{22}H_{46}$	x			x
18,96	heneikosaan	$C_{21}H_{44}$	x			x
19,47	arahiinhappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	x	x	x	
20,85	tetrakosaan	$C_{24}H_{50}$	x			x
21,96	2-metüültetrakosaan	$C_{25}H_{52}$				x
22,62	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	x			x

Tabel 1 jätkub

t_R /min	Nimi	Brutovalem	Mesilasvaha	Karnaubavaha	Kandelillavaha	Parafiin
23,11	beheenhape metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	X	X	X	
24,26	heksakosaan	$C_{26}H_{54}$	X			X
24,74	metüül tetrakosüüleeter	$C_{25}H_{52}O$	X	X		
25,40	3-metüülheksakosaan	$C_{27}H_{56}$				X
25,83	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	X			X
26,29	lignotseriinhappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	X	X	X	
26,75	2-metüülheptakosaan	$C_{28}H_{58}$	X			X
26,90	3-metüülheptakosaan	$C_{28}H_{58}$				X
27,30	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	X			X
28,34	3-metüül-oktakosaan	$C_{29}H_{60}$	X			X
28,71	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$				X
28,74	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	X		X	X
29,17	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	X	X	X	
29,55	2-metüül-nonakosaan	$C_{30}H_{62}$	X			X
30,06	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$			X	X
31,42	heksatriakontaan	$C_{36}H_{74}$	X			X
31,45	tetratriakontaan	$C_{34}H_{70}$			X	
31,94	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	X	X	X	
33,56	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	X	X	X	
34,70	tetratetrakontaan	$C_{44}H_{90}$				X
34,70	heksatriakontaan	$C_{36}H_{74}$	X		X	
35,30	melissiinhappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	X	X	X	
36,24	lupeol	$C_{30}H_{50}O$			X	
36,81	dotriakontüül metüülester	$C_{33}H_{68}O$	X	X	X	
38,57	dotriakontaanhappe metüülester	$C_{33}H_{66}O_2$			X	

4.3 Mesilasvaha ja karnaubavaha segu pürogrammi interpreteering

Töö käigus uuriti ka mesilasvaha ja karnaubavaha segu eemärgiga näha, kas erinevatele vahadele omaseid piike on võimalik tuvastada ka segudes. Töös uuritud mesilasvaha ja karnaubavaha segu oli vanandatud 50 °C juures alates 2019. aasta suvest. Mesilasvaha ja karnaubavaha segu pürogramm on toodud Joonisel 13. Segus tuvastatud komponendid on Lisas 9 Tabelis 6.



Joonis 13. Mesilasvaha ja karnaubavaha segu pürogramm.

Vanandatud mesilasvaha ja karnaubavaha segu analüüsimisel leiti pürogrammilt nii mesilasvahale kui ka karnaubavahale karakteristlikke piike. Mesilasvaha on võimalik tuvastada 15,02 minutil

oleva 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestri piigi järgi. Ka mesilasvahale omast piikide mustrit on vähesel määral pürogrammis näha, kuid selle lõpus esineb alkaane vähem kui värskel või vanandatud mesilasvahal. See võib olla tingitud sellest, et alkaanide intensiivsused olid segus madalad (vähese proovi koguse tõttu) ja ei tulnud pürogrammis esile. Karnaubavahale iseloomulik 3,4-dimetoksükaneelhappe metüülestri piik on näha 10,90 minutil. Samuti on näha ka karnaubavahale omast metüültetratriakontüületrit (40,56 min).

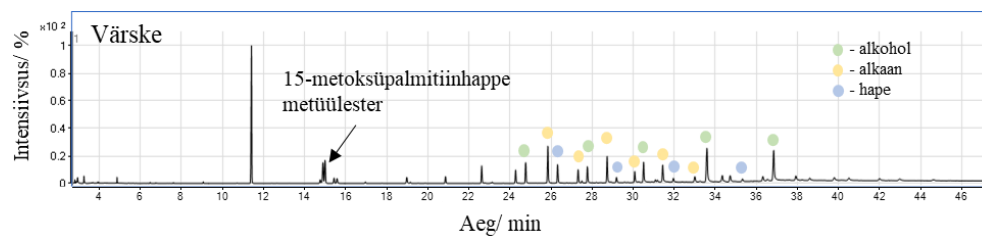
Tulemus andis kinnitust, et vahade segust on võimalik eristada erinevaid vahasid, kui on olemas sobiv analüüsimetoodika ja teada vahade tunnuspigid.

4.4 Pitservaha segude pürogrammide interpreteering

Isetehtud pitservahasid valmistati antud töö käigus selleks, et näha, kas pürogrammides on vahadele iseloomulikke piike segudes pigmendi (kinaver) ja vaiguga (kampol) näha. Lisaks on ajaloolilise pitservaha retsepti järgi valmistatud proovi pürogrammi võimalik kasutada referentsina reaalsetes pitseri proovides vahade tuvastamiseks.

Segu 1

Segu 1 koosnes mesilasvahast (95%) ja kinaverist (5%). Antud segust registreeritud pürogramm on Joonisel 14 ja interpreteerimine on toodud Lisas 10 Tabelis 7 ja värsked ja vanandatud proovide pürogrammid on Lisas 10 Joonisel 12.



Joonis 14. Värsk segu 1 pürogramm.

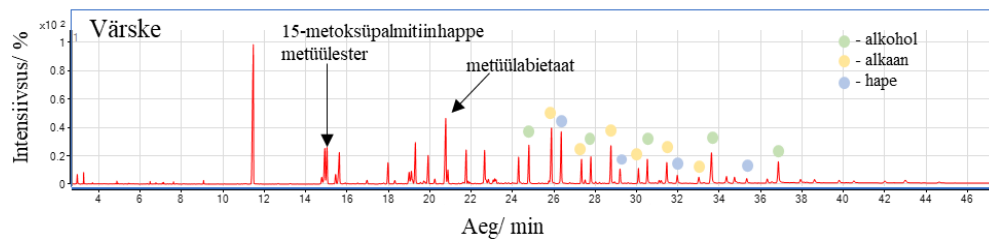
Segu 1 pürogramm on sarnane puhta mesilasvaha pürogrammiga, kinaverile (HgS) viitavaid piike pürogrammis ei tuvastatud. See on ka ootuspärane, sest kinaver on anorgaaniline pigment, mida Py-GC-MS-iga ei ole võimalik analüüsida. Segu 1 pürogrammil on olemas mesilasvahale omane 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestri tunnuspik (14,99 min). Lisaks tunnuspigile on olemas teised piigid, mis moodustavad mesilasvahale omase mustri. Sarnaselt värsketele ja vanandatud mesilasvahale, eri nädalatel Segust 1 mõõdetud pürogrammides erinevusi ei esinenud (Lisa 10, Joonis 12). Segu 1 analüüsimine andis seega kinnituse, et anorgaaniline pigment mesilasvaha

piikide esinemist pürogrammis ei mõjuta ja vaha on võimalik välja töötatud meetodikaga tuvastada.

Segu 2

Segu 2 koostises oli mesilasvaha (79%), kinaver (4%) ja kampil (17%). Proovis olevat kampilit analüüsti ka eraldi vahade jaoks välja töötatud Py-GC-MS-i meetodikaga. Saadud kampoli pürogramm on toodud Lisas 11 Joonisel 13 ja tuvastatud koostise tabel on Lisas 11 Tabelis 8.

Segu 2 pürogramm on joonisel 15 ja interpreteering on toodud Lisas 11 olevas Tabelis 9.



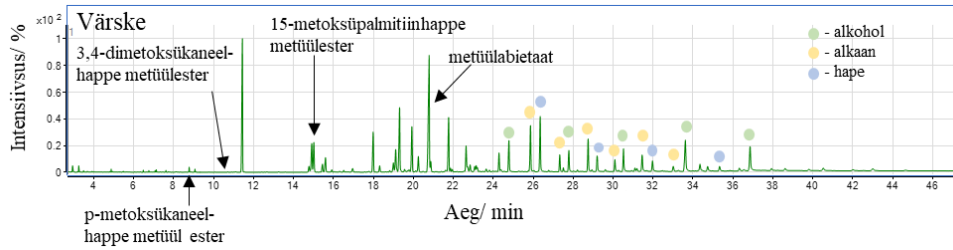
Joonis 15. Värske segu 2 pürogramm.

Erinevalt segu 1-st koosneb segu 2 kolmest komponendist, seetõttu on ka pürogrammidel piike üksteisest raskem eristada. Värske ja vanandatud proovi pürogrammid olid sarnased (Lisa 11, Joonis 14). Värskest segust mõõdetud pürogrammil (Joonis 15) on mõned piigid, mida 1. ja 6. nädalal pärast valmistamist analüüsitud proovi pürogrammides näha ei ole (Lisa 11, Joonis 14 keskmine ja alumine). Need piigid tulenevad ilmselt sellest, et värske proovi puhul analüüsiti suuremat proovi kogust, mis tõstab madalamate piikide intensiivsust.

Segu 2 pürogrammidelt on leitavad nii mesilasvaha kui ka kampoli piike. Mesilasvahast on näha nii tunnuspiik (15-metoksüpalmitiinhappe metüülester, 15,03 min) kui ka pürogrammi lõpus olevat mustrit. Kampil tunnuspiigiks on metüülabietaat (20,78 min) [2]. Segu 2 analüüsimise tulemusel on näha, et töös arendatud Py-GC-MS meetodikaga on võimalik tuvastada lisaks vahale ka kampilvaiku. Mõlemale materjalile omased piigid on pürogrammidel näha ja need ei ole omavahel kattunud.

Segu 3

Segu 3 on tehtud mesilasvahast (71%), kinaverist (5%), kampilist (18%) ja karnaubavahast (6%). Joonisel 16 on värske segu 3 pürogramm ja Lisas 12 Tabelis 10 on toodud pürogrammil tuvastatud komponendid.



Joonis 16. Värske segu 3 pürogramm.

Värske ja vanandatud segu 3 pürogrammidelt (vanandatud segu 3 pürogrammid on Lisas 12 Joonisel 15) on hästi leitavad nii mesilasvaha tunnuspiik (15-metoksüpalmitiinhappe metüülester, 15,01 min) kui ka iseloomulik muster. Samuti on võimalik pürogrammidel tuvastada kampoli piike, näiteks selle tunnuspiik metüülalbietaat 20,78 minutil. Karnaubavaha tunnuspiik (3,4-dimetoksükaneel-happe metüülester) tuleb välja ainult värskest proovist mõõdetud pürogrammil. See võib olla tingitud nii väiksemast proovi kogusest kahe vanandatud proovi mõõtmisel. Sarnaselt värske ja vanandatud karnaubavaha proovidega esines ka selles segus kõikidel mõõtmistel p-metoksükaneel-happe metüülesteri piik (8,76 min), mis kirjanduse järgi on karnaubavahale omane [2]. Pürogrammilt (Joonis 16) oli näha, et võrreldes teise kahe seguga olid piigid rohkem lähestikku, sest segu koosneb rohkematest materjalidest. Kolmel eri ajal mõõdetud proovide pürogrammides on erinevusi vähe ja muutused on tingitud ilmselt proovi koguse muutusest (Lisa 12, Joonis 15).

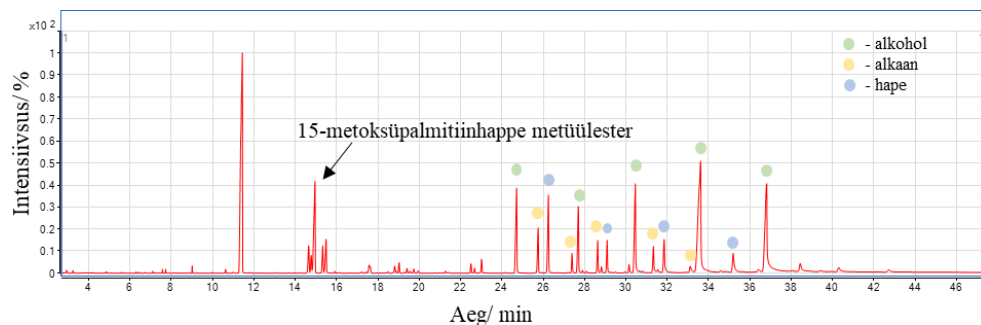
Segu 3 tulemustest on näha, et sellest on võimalik tuvastada nii mesilasvaha kui ka kampolit ja karnaubavaha. Lisaks on pürogrammidelt näha, et mida keerulisema koostisega on segu, seda rohkem on piigid üksteisega koos ja piikide eristamine on keerulisem.

4.5 Reaalsete proovide analüüsimine

Töö käigus rakendati väljatöötatud Py-GC-MS-i meetodikat kultuuriväärtuslikelt objektidelt saadud proovide analüüsimiseks. Reaalsete proovide analüüsimise eesmärgiks oli teada saada, kas arendatud Py-GC-MS-i meetodika sobib kultuuriväärtuslike objektide uurimiseks ning neis sisalduvate vahade tuvastamiseks. Reaalseteks proovideks olid kaks 13. sajandist pärit vahapitsrit ja üks skulptuuri proov.

1270. aastast pärineva Magnus Ladulås'i pitseri proovi analüüs

Magnus Ladulås'i pitseri uurimisega sooviti teada, millisest vahast uuritud proov tehtud on. Pitsrit uuriti kõigepealt mikroskoobiga, mille pilt on toodud Lisas 13 Joonisel 16, pürogramm Joonisel 17 ja koostise tabel Lisas 13 Tabelis 11.

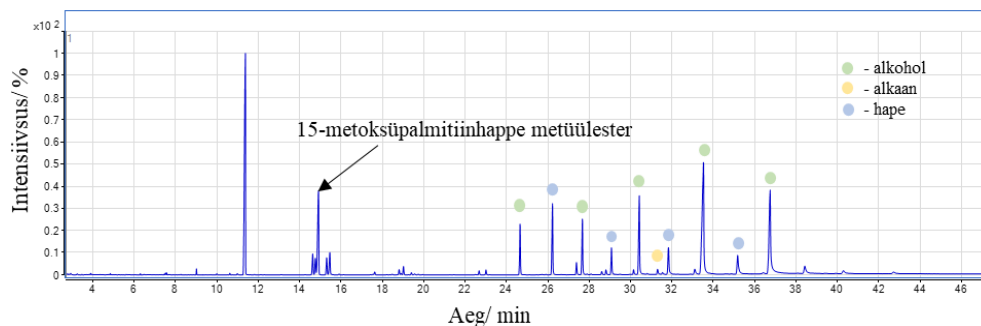


Joonis 17. Magnus Ladulås'i pitseri proovi pürogramm.

Lisas 13 Joonisel 16 toodud mikroskoobi pildilt on näha, et proov tundub ühtlane ja kollane. Py-GC-MS-i kordusmõõtmise jaoks lõigati skalpelliga pildil olev proovitükk kaheks. Proov mõõdeti väljatöötatud Py-GC-MS-i meetodikaga, kasutades derivatiseerimiseks TMAH-i (5 µl). Töös on välja toodud kahest paralleelmõõtmisest kvaliteetsem pürogramm. Pürogrammilt (Joonis 17) ja komponentide tabelist (Lisa 13, Tabel 11) on näha mesilasvahale omast 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestri tunnuspiiki (14,95 min). Lisaks tunnuspiigile on proovi pürogrammil näha mesilasvahale omast mustrit pürogrammi lõpus. Kahe mesilasvahale omase tunnuse järgi võib öelda, et vahapitser sisaldab mesilasvaha.

1282. aastast pärineva Taani kuninga Erik Klipping'i pitseri proovi analüüs

Erik Klipping'i vahapitseri uurimisega sooviti, sarnaselt Magnus Ladulås'i pitserile, teada, millisest vahast on see tehtud. Lisas 14 Joonisel 17 on toodud uuritud proovi mikroskoobipilt, pürogramm on esitatud Joonisel 18 ja tuvastatud koostise komponendid on Lisas 14 olevas Tabelis 12.



Joonis 18. Erik Klipping'i pitseri proovi pürogramm.

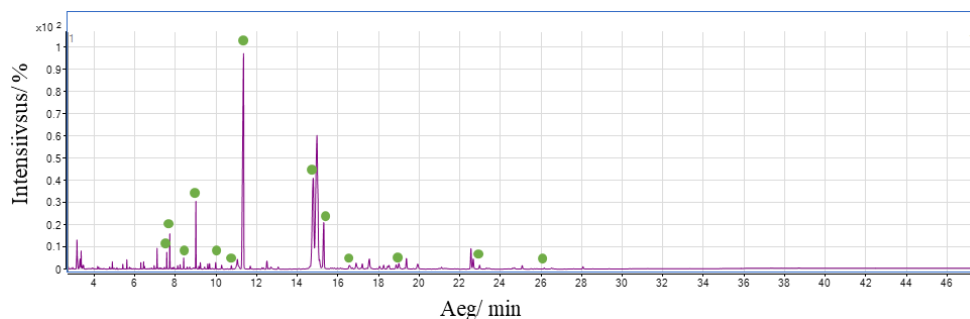
Analüüsitud vahapitseri proov oli mikroskoobi all (suurendus 32x) vaadeldes hallikas. Proovis oli näha ka kiude, mis proovist välja ulatusid, mis võivad pärineda nõorist, millega oli pitseri dokumendi külge lisatud. Pildil olev proovitükk lõigati skalpelliga Py-GC-MS-i mõõtmise jaoks

kaheks. Paralleelmõõtmistest toodi selles töös välja parim pürogramm. Proov pandi PPK-sse ja lisati juurde 5 µl TMAH-i. Proov mõõdeti vahade jaoks väljatöötatud Py-GC-MS-i meetodikaga. Saadud pürogrammilt (Joonis 18) võib leida mesilasvaha tunnuspiigi 15-metoksüpalmitiinhappe metüülestri (14,88 min). Proovi pürogrammis ei tulnud hästi välja mesilasvahale iseloomulik muster 24-38 min vahel. Muustrist on vähem esile tulnud alkaane, sarnaselt kõrgelest eraldatud vahadele. See võib viidata, et Erik Klipping'i vahapitseri vaha oli võrreldes kommertsiaalse mesilasvahaga teisiti töödeldud.

Proovis olevat vaha on tänu mesilasvahale omasele tunnuskomponendile võimalik siiski liigitada mesilasvahaks. Selleks, et kindlaks teha kas vaha on vähem töödeldud või sisaldab mingeid lisandeid, tuleks teostada täiendavaid uuringuid nii Py-GC-MS-i või mõne teise analüüsimeetodiga.

Amandus Heinrich Adamsoni skulptuuri “Kalevipoeg ja vanasarvik” proovi analüüs

1896. aastast pärinevat Amandus Heinrich Adamsoni skulptuuri proovi analüüsidest sooviti teada, kas skulptuuris oleva plastiliini koostises on vaha ja kas seda on võimalik tuvastada. Proovist tehtud mikroskoobi pilt on Lisas 15 Joonisel 18, pürogramm Joonisel 19 ja pürogrammi interpreteering Lisas 15 Tabelis 13.



Joonis 19. Amandus Heinrich Adamsoni skulptuurilt “Kalevipoeg ja vanasarvik” saadud proovi pürogramm. Roheliste täppidega on märgitud vahadele omased piigid.

Skulptuuri proovi vaadeldi esmalt mikroskoobiga (14,6x suurendus). Lisas 15 Joonisel 18 toodud pildilt on näha, et uuritav proov on kollakaspruun ja ebahütlane. Proov pandi pärast mikroskoobiga vaatlust PPK-sse ja sinna lisati 5 µl TMAH-i. Py-GC-MS-iga mõõtmiseks kasutati vahade jaoks tehtud meetodikat. Saadud pürogrammist ja Lisas 15 toodud Tabelist 13 on näha loomsetele ja taimsetele vahadele kuuluvaid piike, näiteks on vahadele omased piigid 9,97 minutil pentadekaanhappe metüülester, 22,97 minutil beheenhappe metüülester jne (Joonisel 19 tähistatud rohelistega). Ainult kandelilla-, karnauba- ja mesilasvahale omaseid tunnuspiike pürogrammil ei

ole. Proovis on lisaks vahadele omastele piikidele ka teistele materjalidele vastavaid piike, kuid teisi materjale selles töös põhjalikumalt ei interpreteeritud. Lisades olevas tabelis on ära märgitud vaid vahadele omased piigid.

Taimsetele ja loomsetele vahadele omaste piikide järgi võib öelda, et proovis võib leiduda vaha, kuid kindla vaha määramiseks tunnuspiike pürogrammis ei leitud.

4.6 Järeldused

Käesolevas töös näidati, et Py-GC-MS on võimekas meetod vahade analüüsimiseks, millega saab edukalt kultuuriväärtuslikke proove uurida. Järgnevalt on välja toodud Py-GC-MS-ga vahade analüüsimise eelised ja puudused.

Eelised:

- Erinevaid vahasid on võimalik uurida universaalse Py-GC-MS-i metoodikaga.
- Erinevatel vahadel on pürogrammides neile iseloomulikud komponentide piigid ning neid on võimalik segudes eristada.
- Analüüsiks vajalik proovikogus on väike (0,01- 0,1 mg).
- Proovi on lihtne ettevalmistada.
- Mõõtmiste tulemustest saab palju kasulikku informatsiooni vahade koostise kohta.

Puudused:

- Vahade analüüsiks on vaja põhjalikku Py-GC-MS-i puhastust.
- Pürogrammid on keerulised ja nende interpreteerimiseks on vaja spetsiaalseid andmebaase, milles olev info võib olla puudulik.
- Keerulisemates proovides, kus on palju erinevaid komponente, võib vaha tüübi määramisega tekkida probleeme (pürogrammis võib esineda piikide kattumisi või on vahale iseloomulikud piigid liiga madala intensiivsusega).

5 KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja töötada Py-GC-MS-i meetodika vahade koostiskomponentide tuvastamiseks eesmärgiga seda rakendada kultuuriväärtuslikelt objektidelt pärit proovide analüüsimiseks.

Py-GC-MS meetodika arendust teostati nelja värsket vahaga: mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiin. Arendustöö käigus katsetati erinevaid pürolüüseri temperatuure (200 °C, 400 °C, 600 °C, millest sobivamaks osutus 400 °C) ja GC-MS parameetreid (testiti 4 erinevat temperatuuriprogrammi) ja leiti vahadele analüüsimiseks sobiv ühtne universaalne mõõtmismetoodika. Samuti katsetati kahte erinevat derivatiseerimisreagenti (TMAH-i ja HMDS-i), millest parimaks osutus TMAH (pürogrammidel olid vahade piigid lahus ja kõik vahadele iseloomulikud komponentide piigid esindatud).

Välja töötatud Py-GC-MS meetodikat kasutati erinevate vahade ja vaha sisaldavate materjalide analüüsimiseks. Töös analüüsiti põhjalikult nii värskete kui vananenud mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha ja parafiini koostist ning tuvastati nende tunnuskomponendid. Lisaks mõõdeti kolmest mesilaskärjest saadud vaha ja valmistati Vatikani arhiivist pärit retseptide põhjal kolm erinevat pitservaha segu. Töö käigus registreeriti nende proovide pürogrammid ja tuvastati segudes edukalt vahale iseloomulikud komponendid. Kõiki neid pürogramme saab võrdlusena kasutada reaalse proovide analüüsimisel.

Töö käigus väljatöötatud Py-GC-MS meetodikat rakendati edukalt kolme kultuuriväärtuslikult objektilt (kahe 13. sajandist pärit pitseri ja ühe 19. sajandi lõpust pärit skulptuuri) pärit proovide uuringuteks.

Bakalaureusetöoga saadi kõik eesmärgid täidetud ning nüüdsest on olemas sobiv Py-GC-MS meetodika erinevate vahade koostise analüüsimiseks.

6 SUMMARY

DEVELOPMENT OF PYROLYSER-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY METHODOLOGY FOR THE ANALYSIS OF WAXES FROM CULTURAL HERITAGE SAMPLES

Lola Söukand

The objective of this bachelor's thesis was to develop a Py-GC-MS (Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry) methodology for identifying the components of waxes, with the intention of applying it to the analysis of samples derived from objects of cultural value.

The development of the Py-GC-MS methodology was conducted with four fresh waxes: beeswax, carnauba wax, candelilla wax, and paraffin. In the course of the development, various pyrolyzer temperatures (200 °C, 400 °C, 600 °C, with 400 °C proving to be the most suitable) and GC-MS parameters (four different temperature programs were tested) were trialed to find a universally applicable measurement methodology suitable for wax analysis. In addition, two different derivatization reagents were tested (TMAH and HMDS), with TMAH proving to be the superior option (pyrograms showed separated wax peaks and all characteristic wax component peaks were represented).

The developed Py-GC-MS methodology was utilized for the analysis of various waxes and wax-containing materials. This study extensively analyzed the composition of both fresh and aged beeswax, carnauba wax, candelilla wax, and paraffin, and identified their characteristic components. Additionally, wax derived from three beehives was measured, and three different sealing wax mixtures were prepared based on recipes sourced from the Vatican archives. The pyrograms of these samples were recorded and the characteristic components of the waxes in the mixtures were successfully identified. All these pyrograms can be used as references for analyzing real samples.

The developed Py-GC-MS methodology was successfully applied to the study of samples taken from three culturally significant objects (two seals from the 13th century and a sculpture from the late 19th century).

All objectives of the bachelor's thesis were achieved, and a suitable Py-GC-MS methodology for analyzing the composition of different waxes is now available.

7 KASUTATUD KIRJANDUS

1. U. Wolfmeier, H. Schmidt, F.-L. Heinrichs, G. Michalczyk, W. Payer, W. Dietsche, K. Boehlke, G. Hohner, and J. Wildgruber, "Waxes," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000), p. a28_103.
2. J. S. Mills and R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Second edition, first issued in hardback, Butterworth-Heinemann Series in Conservation and Museology (Routledge, 2015).
3. J. Riis, "Mesindussaadused," in *Eesti Meeraamat* (AS FormaMedia AS, 2007).
4. S. Vahur, "FT-IR spektroskoopia võimalused ja piirangud kunstiobjektide uurimisel," (2005).
5. W. F. Tinto, T. O. Elufioye, and J. Roach, "Waxes," in *Pharmacognosy* (Elsevier, 2017), pp. 443–455.
6. S. Bogdanov, "Beeswax: History, Uses, Trade," *Bee Product Science* (2016).
7. F. d'Errico, L. Backwell, P. Villa, I. Degano, J. J. Lucejko, M. K. Bamford, T. F. G. Higham, M. P. Colombini, and P. B. Beaumont, "Early evidence of San material culture represented by organic artifacts from Border Cave, South Africa," *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 13214–13219 (2012).
8. K. T. Gallagher, "Discoveries in Encaustic : A Look through History," in (2012).
9. J. Cuní, P. Cuní, B. Eisen, R. Savizky, and J. Bové, "Characterization of the binding medium used in Roman encaustic paintings on wall and wood," *Analytical Methods* **4**, 659–669 (2012).
10. K. Konsa, *Arhivaalide ja trükiste säilitamine* (Ajaloosihtasutus Kleio, 2008).
11. S. Bogdanov, "Beeswax: quality issues today," *Bee World* **85**, 46–50 (2004).
12. S. Bogdanov, "Beeswax: Production, Properties, Composition, Control," *Bee Product Science* (2016).
13. L. Bergamonti, M. Cirlini, C. Graiff, P. P. Lottici, G. Palla, and A. Casoli, "Characterization of Waxes in the Roman Wall Paintings of the Herculaneum Site (Italy)," *Applied Sciences* **12**, 11264 (2022).
14. M. P. Colombini and F. Modugno, *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology / Wiley Online Books* (2009).

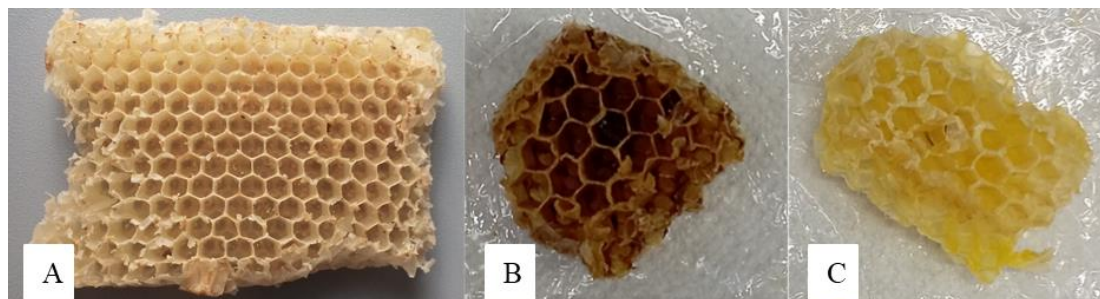
15. R. J. Gettens and G. L. Stout, *Painting Materials: A Short Encyclopedia*, New edition (Dover Publications, 2011).
16. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), "Scientific Opinion on the re-evaluation of carnauba wax (E 903) as a food additive," *EFSA Journal* **10**, 2880 (2012).
17. A. Asperger, W. Engewald, and G. Fabian, "Advances in the analysis of natural waxes provided by thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) in combination with GC/MS," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **52**, 51–63 (1999).
18. C. Tunnell, *Wax, Men, and Money, A Historical and Archaeological Study of Candelilla Wax Camps along the Rio Grande Border of Texas* (1981).
19. D. E. Schneider, "Trade survey study on succulent Euphorbia species protected by CITES and used as cosmetic, food and medicine, with special focus on Candelilla wax," (2008).
20. R. F. Hare and A. P. Bjerregaard, "Examination of Candelilla Wax.," *J. Ind. Eng. Chem.* **2**, 203–205 (1910).
21. "Analytical pyrolysis in cultural heritage," *Anal. Methods* **10**, 5463–5467 (2018).
22. K. L. Sobeih, M. Baron, and J. Gonzalez-Rodriguez, "Recent trends and developments in pyrolysis–gas chromatography," *Journal of Chromatography A* **1186**, 51–66 (2008).
23. Y. Picó and D. Barceló, "Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry in environmental analysis: Focus on organic matter and microplastics," *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **130**, 115964 (2020).
24. K. D. Sam and T. P. Wampler, *Analytical Pyrolysis Handbook* (2021).
25. H.-J. Hübschmann, *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*, 2nd ed. (Wiley-VCH, 2009).
26. K. Janssens and R. V. Grieken, *Non-Destructive Micro Analysis of Cultural Heritage Materials* (Elsevier, 2004).
27. "CDS Analytical | Pyrolyzer | 6200," <https://www.cdsanalytical.com/pyrolysis-6200>.
28. F. L. US, "Frontier Lab, Pyrolysis," <https://flab-us.com/py-gc%2Fms>.
29. F. W. Karasek and R. E. Clement, *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques* (Elsevier ; Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co, 1988).

30. H. G. M. Edwards and P. Vandenabeele, *Analytical Archaeometry: Selected Topics* (Royal Society of Chemistry, 2012).
31. J. M. Thompson, *Mass Spectrometry* (Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2018).
32. F. Orata, "Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis," in *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, M. Ali Mohd, ed. (InTech, 2012).
33. D. P. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*
34. A. Asperger, W. Engewald, and G. Fabian, "Thermally assisted hydrolysis and methylation – a simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes," *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **61**, 91–109 (2001).
35. P. Kusch, ed., *Gas Chromatography: Derivatization, Sample Preparation, Application* (Intechopen, 2019).
36. Y. He, A. Buch, C. Szopa, A. J. Williams, M. Millan, M. Guzman, C. Freissinet, C. Malespin, D. P. Glavin, J. L. Eigenbrode, D. Coscia, S. Teinturier, Pin lu, M. Cabane, and P. R. Mahaffy, "The search for organic compounds with TMAH thermochemolysis: From Earth analyses to space exploration experiments," *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **127**, 115896 (2020).
37. F. C. Izzo, "20th Century Artist's Oil Paints; A Chemical-Physical Survey," (2011).
38. K. Sutherland, "Derivatisation using m-(trifluoromethyl)phenyltrimethylammonium hydroxide of organic materials in artworks for analysis by gas chromatography–mass spectrometry: Unusual reaction products with alcohols," *Journal of Chromatography A* **1149**, 30–37 (2007).
39. H. Han, S. Wei, J. Yang, L. Guan, and W. Li, "Characterization of the residues in Han Dynasty bronze lamps by pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry," *Herit Sci* **7**, 37 (2019).
40. E. Tammekivi, "Õlivärvide sideaine määramine GC-MS meetodil," Thesis, Tartu Ülikool (2017).
41. I. Bonaduce and M. P. Colombini, "Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry procedures," *Journal of Chromatography A* **1028**, 297–306 (2004).
42. M. P. Colombini, E. Ribechini, M. Rocchi, and P. Selleri, "Analytical pyrolysis with in-situ silylation, Py(HMDS)-GC/MS, for the chemical characterization of archaeological and historical amber objects," *Heritage Science* **1**, 6 (2013).

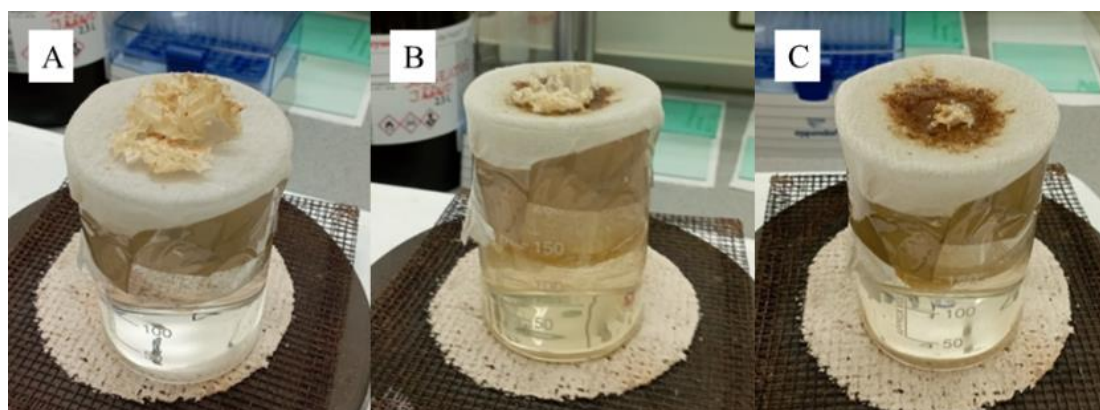
43. A. Andreotti, I. Bonaduce, M. P. Colombini, F. Modugno, and E. Ribechini, "A diagnosis of the yellowing of the marble high reliefs and the black decorations in the chapel of the tomb of Saint Anthony (Padua, Italy)," *International Journal of Mass Spectrometry* **284**, 123–130 (2009).

8 LISAD

Lisa 1

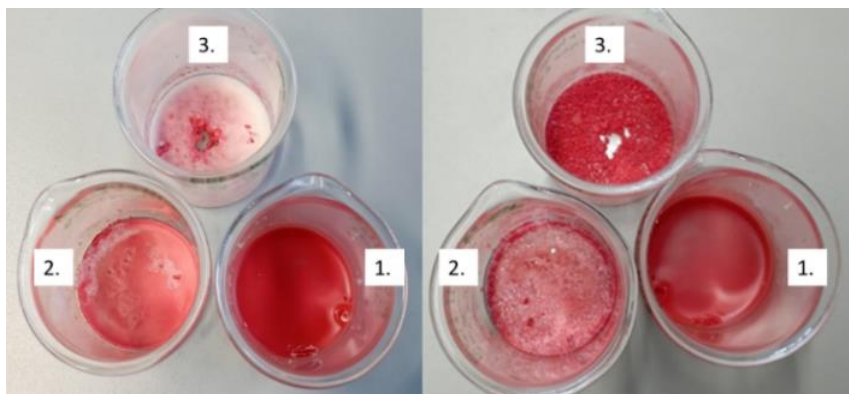


Joonis 1. Mesilaskärg 1 (A), mesilaskärg 2 (B), mesilaskärg 3 (C).



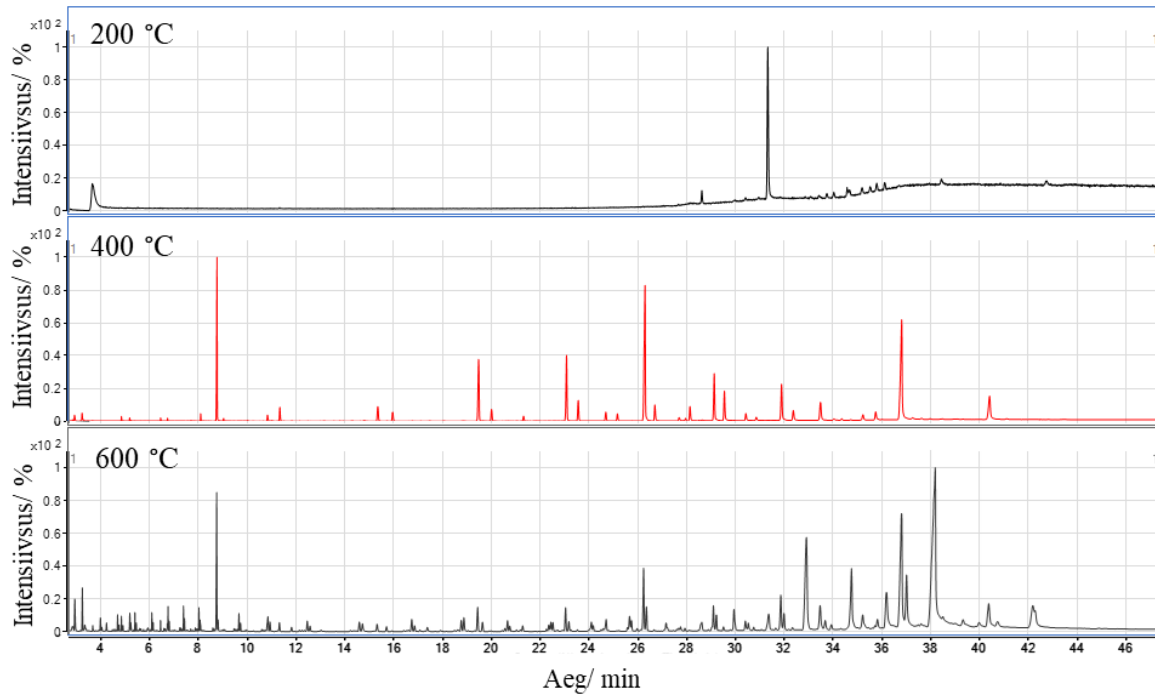
Joonis 2. Kärg 2 enne kuumutamist (A), kuumutamise ajal (B) ja kuumutamise lõpus (C).

Lisa 2

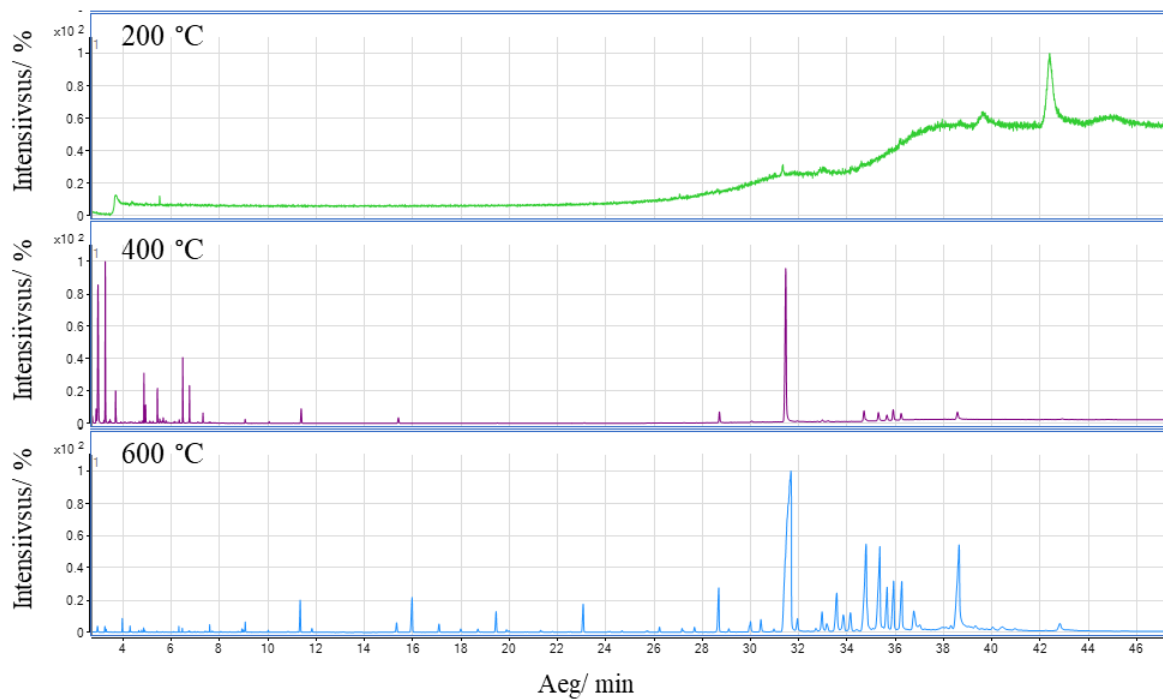


Joonis 3. Segud pärast valmistamist (vasakul) ja nädala aega 50 °C juures vanandatult (paremal).

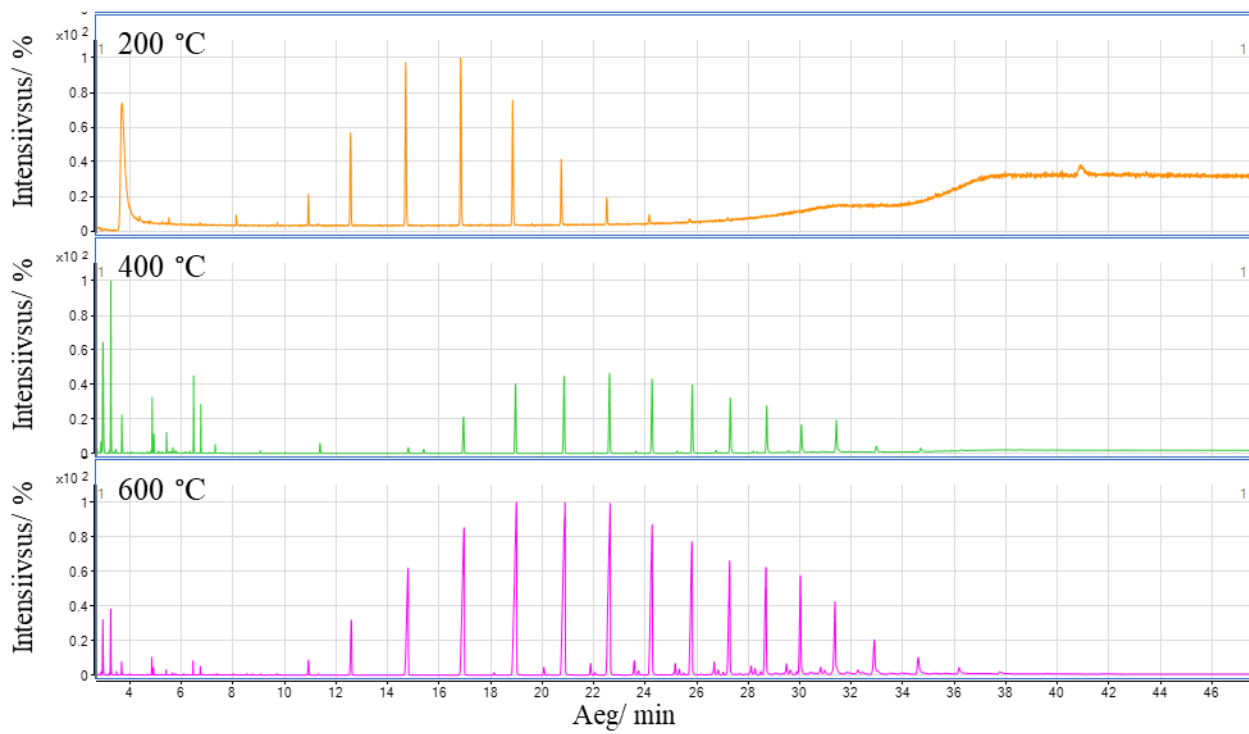
Lisa 3



Joonis 4. Karnaubavaha pürogrammid, mis on saadud erinevatel pürolüüsimise temperatuuridel (derivatiseerimisreagent TMAH).

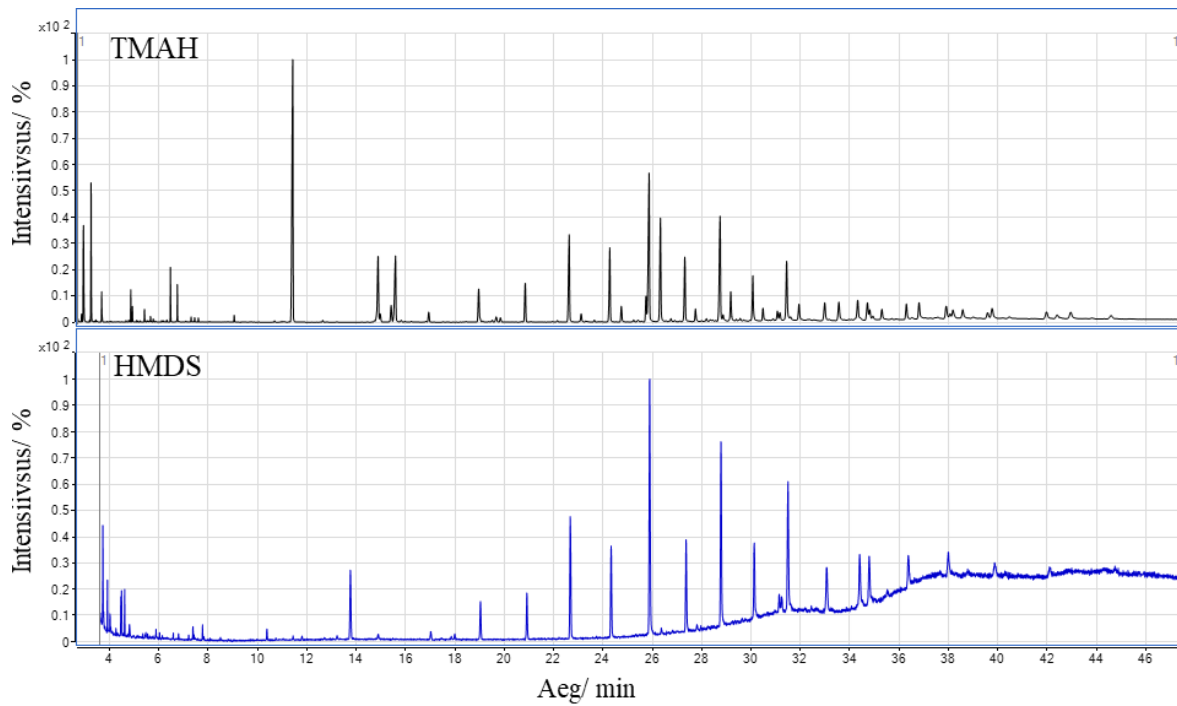


Joonis 5. Kandelillavaha pürogrammid, mis on saadud erinevate pürolüüsimise temperatuuridel (derivatiseerimisreagent TMAH).

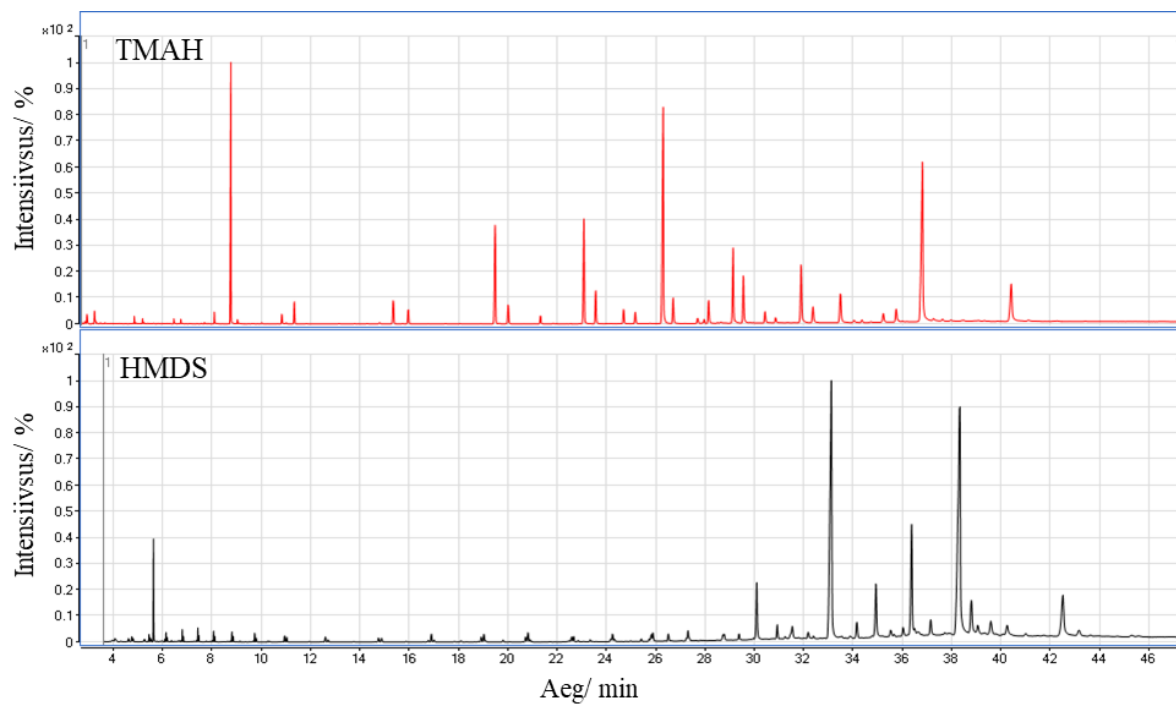


Joonis 6. Parafiini pürogrammid, mis on saadud erinevate pürolüüsimise temperatuuridel (derivatiseerimisreagent TMAH).

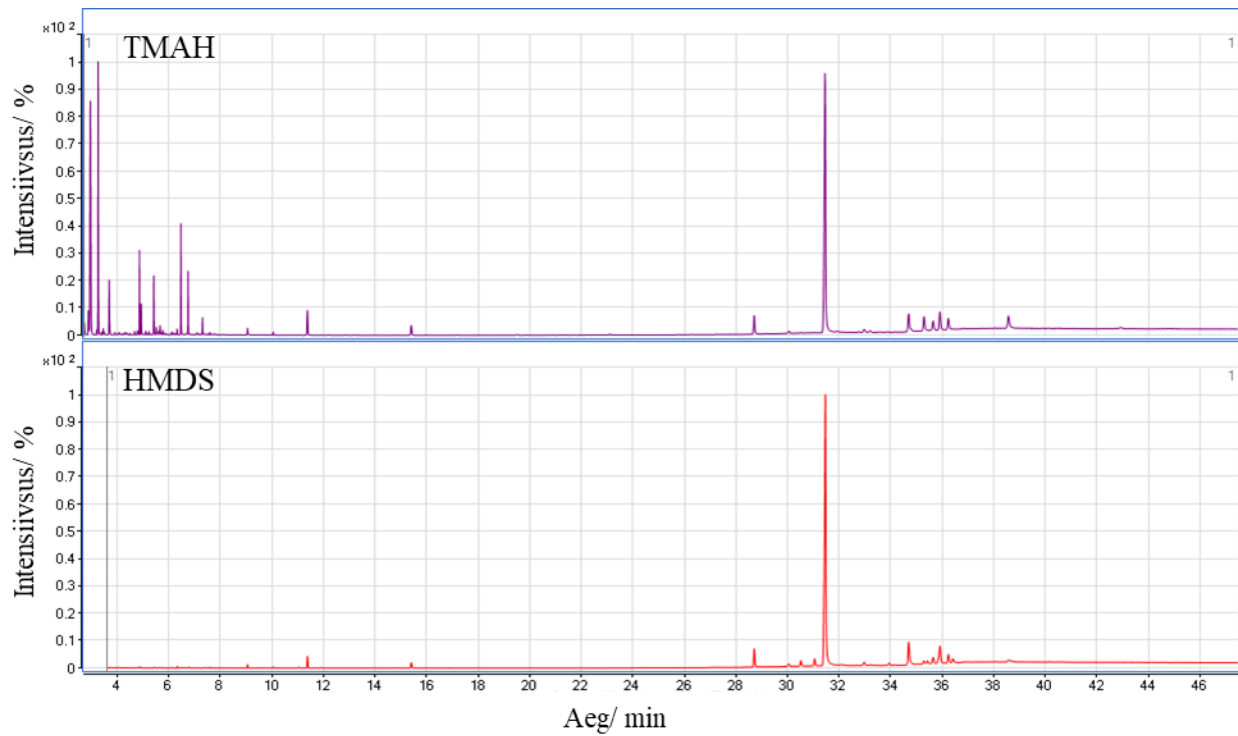
Lisa 4



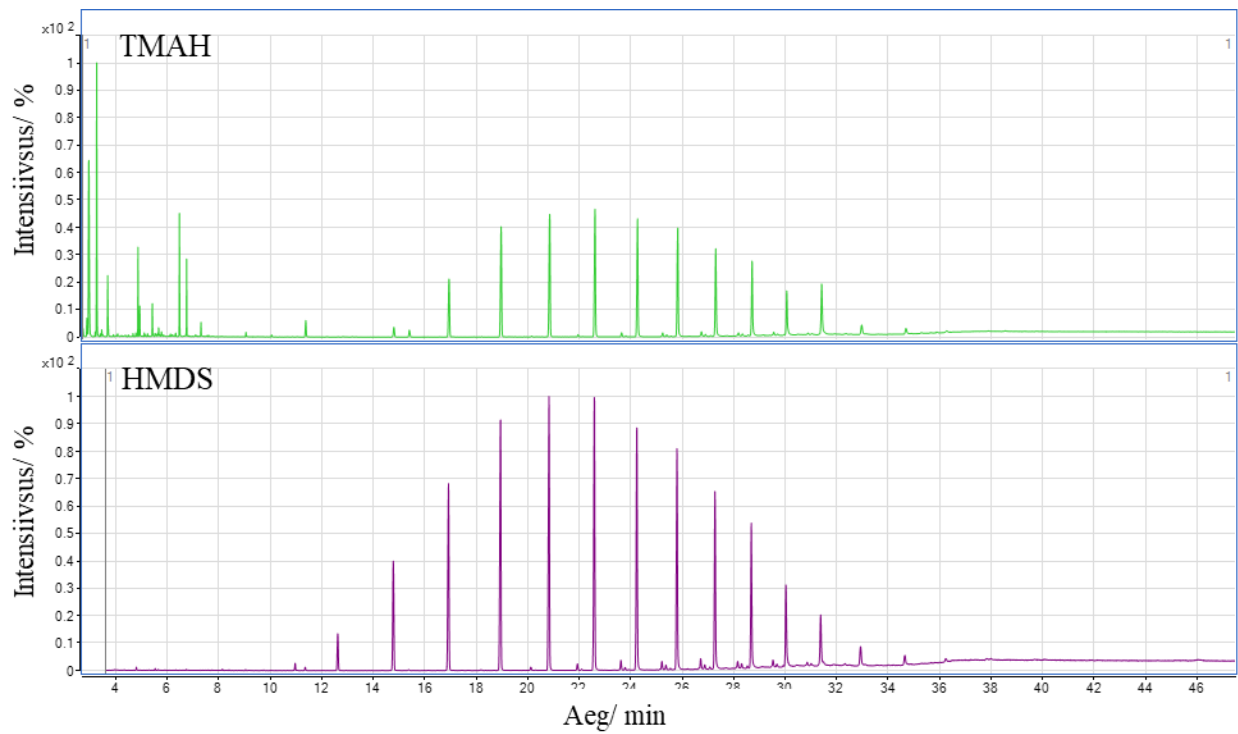
Joonis 7. Mesilasvaha pürogrammid, mis on saadud vastavalt TMAH-i ja HMDS-iga derivatiseerides.



Joonis 8. Karnaubavaha pürogrammid, mis on saadud vastavalt HMDS-i ja TMAH-iga derivatiseerides.



Joonis 9. Kandelillavaha pürogrammid, mis on saadud vastavalt HMDS-i ja TMAH-iga derivatiseerides.



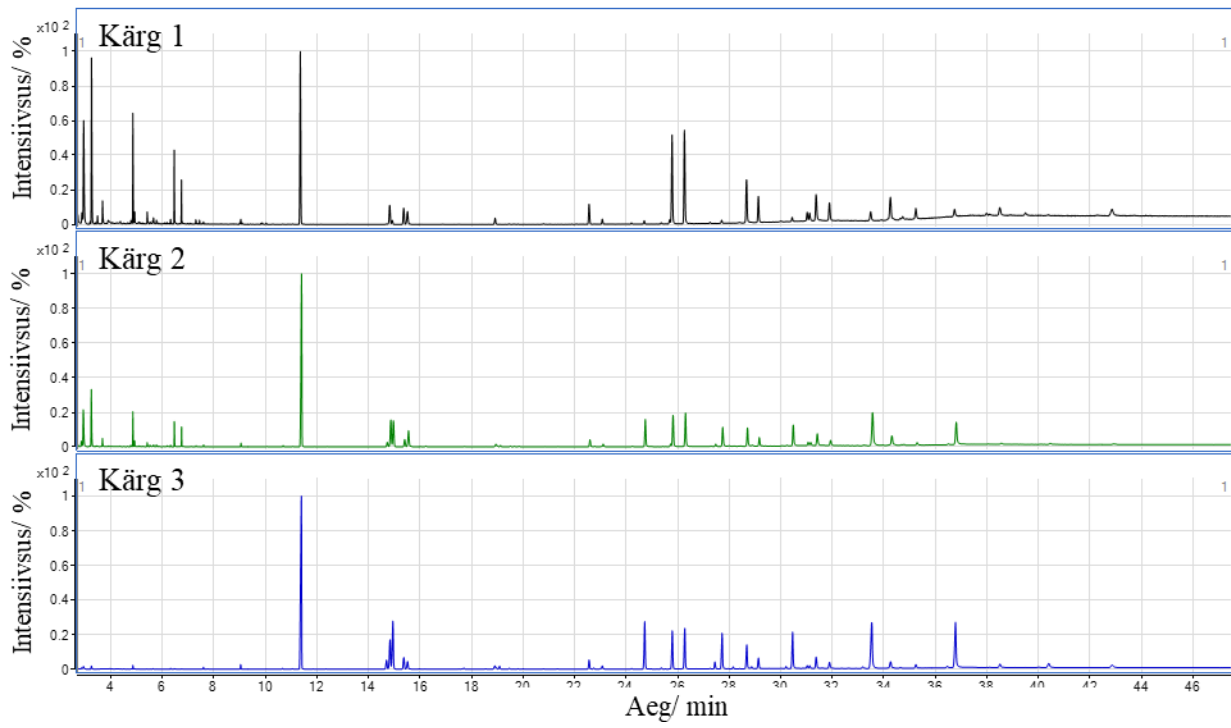
Joonis 10. Parafiini pürogrammid, mis on saadud vastavalt HMDS-i ja TMAH-i lisamisel vahale.

Lisa 5

Tabel 1. Mesilasvaha pürogrammide interpreteering.

Alkaanid on märgitud kollasega, happed sinisega ja alkoholid rohelisega. Nii värske kui vanandatud proovi (värske 1 ja vana 1) puhul tehti kordusmõõtmised (tabelis tähistatud vastavalt värske 2 ja vana 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske 2 proovi pürogrammi järgi, kõikide teiste pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Molaarmass	Värske 1	Värske 2	Vana 1	Vana 2
0-7	TMAH/HMDS			x	x	x	x
7,44	pentadekaan	$C_{15}H_{32}$	212		x		x
7,60	lauriinhape metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	214	x	x	x	x
7,75	dikarboksüülhappe metüülester	$C_{11}H_{20}O_4$	216		x	x	x
9,04	müristiinhape metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	242	x	x	x	x
10,05	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	256		x	x	x
11,28	metüülpalmitoleaat	$C_{17}H_{32}O_2$	268		x		
11,42	palmitiinhape metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	x	x	x	x
12,64	eikosaan	$C_{20}H_{42}$	283		x		
14,73	14-metoksüpalmitiinhape metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	300	x	x	x	
14,96	oleiinhape metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	296	x	x	x	x
14,97	15-metoksüpalmitiinhape metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	300	x	x	x	x
15,41	metüülestearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	299	x	x	x	x
19,51	arahiinhape metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	327		x	x	x
20,85	tetrakosaan	$C_{24}H_{50}$	339		x	x	x
22,62	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	367	x	x	x	x
23,11	beheenhape metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	355		x	x	x
24,74	metüül tetrakosüüleeter	$C_{25}H_{52}O$	369	x	x	x	x
25,87	heptakosaan	$C_{27}H_{56}$	381	x	x	x	x
26,33	lignotseriinhape metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	383	x	x	x	x
27,31	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395		x	x	x
27,75	heksakosüülmetüüleeter	$C_{27}H_{56}O$	397		x	x	
28,74	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	409	x	x	x	x
29,17	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	411	x	x	x	x
30,07	trikontaan	$C_{30}H_{62}$	423		x	x	x
30,48	oktakosanol	$C_{28}H_{58}O$	411	x	x	x	
31,44	hentriakontaan	$C_{31}H_{64}$	437	x	x	x	x
31,94	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	439		x	x	x
32,98	dotriakontaan	$C_{32}H_{66}$	451		x	x	x
33,56	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	453	x	x	x	
35,30	melissiinhape metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	467	x	x	x	x
36,81	dotriakontüülmetüüleeter	$C_{33}H_{68}O$	481	x	x	x	



Joonis 11. Kärgede pürogrammid.

Tabel 2. Mesilaskärgedest eraldatud vahade pürogrammide interpretatsioon.

Kärgede (kärg 1.1, kärg 2.1, kärg 3.1) puhul tehti kordusmõõtmised (tabelis tähistatud vastavalt kärg 1.2, kärg 2.2 ja kärg 3.2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud Kärg 3.2 proovi pürogrammide järgi, kõikide teiste pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R/min	Komponendi nimi	Kärg 1.1	Kärg 1.2	Kärg 2.1	Kärg 2.2	Kärg 3.1	Kärg 3.2
0-7	TMAH	x	x	x	x	x	x
7,44	pentadekaan	x	x				
7,60	lauriinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
9,04	müristiinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
10,05	pentadekaanahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
11,28	metüülpalmitoleaat	x		x	x	x	x
11,42	palmitiinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
14,73	14-metoksüpalmitiinahappe metüülester	x		x	x	x	x
14,96	oleiinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
14,97	15-metoksüpalmitiinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
15,41	metüülestearaat	x	x	x	x	x	x
19,51	arahiinahappe metüülester	x		x	x	x	x
22,62	pentakosaan	x	x	x	x	x	x
23,11	beheenahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
24,74	metüültetrakosüülester	x	x	x	x	x	x
25,87	heptakosaan	x	x	x	x	x	x
26,33	lignotseriinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
27,31	oktakosaan				x	x	x
27,75	heksakosüülmütüülester	x	x	x	x	x	x
28,74	nonakosaan	x	x	x	x	x	x
29,17	heksakosaanhappe metüülester	x	x	x	x	x	x
30,48	oktakosanol	x	x	x	x	x	x
31,44	hentriakontaan	x	x	x	x	x	x
31,94	oktakosaanhappe metüülester	x	x	x	x	x	x
33,56	metüültriakontüülester	x	x	x	x	x	x
35,30	melissiinahappe metüülester	x	x	x	x	x	x
36,81	dotriakontüülmütüülester	x	x	x	x	x	x

Lisa 6

Tabel 3. Karnaubavaha pürogrammide interpreteering.

Värske ja vanandatud proovi (värske 1 ja vana 1) puhul tehti kordusmõõtmised (tabelis tähistatud vastavalt värske 2 ja vana 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske 1 proovi pürogrammi järgi, kõikide teiste pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Molaarmass	Värske 1	Värske 2	Vana 1	Vana 2
0-7	TMAH			x	x	x	x
8,74	p-metoksükaneelhappe metüülester	$C_{11}H_{12}O_3$	192	x	x	x	x
9,02	12-metüültridekaanhappe metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	242	x	x		
10,02	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	256		x	x	
10,84	3,4-dimetoksükaneelhappe metüülester	$C_{12}H_{14}O_4$	222		x	x	x
11,33	palmitiinhappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	x	x	x	x
15,35	metüülestearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	299	x	x	x	x
19,47	arahiinhappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	327	x	x	x	x
20,00	18-metoksüoktadekaanhappe metüülester	$C_{20}H_{40}O_3$	329	x	x		x
23,08	beheenhappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	355	x	x	x	x
24,69	metüül tetrakosüüleeter	$C_{25}H_{52}O$	369		x		
26,29	lignotseriinhappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	383	x	x	x	x
26,70	eruukahappe metüülester	$C_{23}H_{44}O_2$	353	x	x		x
27,70	heksakosüülmetüüleeter	$C_{27}H_{56}O$	397		x		
29,13	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	411	x	x	x	x
29,55	15-tetrakoseenhappe metüülester, (Z)-	$C_{25}H_{48}O_2$	381	x	x		x
30,43	metüüloktakosüüleeter	$C_{29}H_{60}O$	425		x		x
31,90	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	439	x	x	x	x
33,51	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	453	x	x	x	x
35,24	melissiinhappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	467	x	x	x	x
35,78	triakontaandihappe dimetüülester	$C_{32}H_{62}O_4$	511	x	x		x
36,91	dotriakontüülmetüüleeter	$C_{33}H_{68}O$	481	x	x	x	x
40,39	metüültetratriakontüüleeter	$C_{35}H_{72}O$	509	x			x

Lisa 7

Tabel 4. Kandelillavaha pürogrammide interpreteering.

Värske ja vanandatud proovi (värske 1 ja vana 1) puhul tehti kordusmõõtmised (tabelis tähistatud vastavalt värske 2 ja vana 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske 1 proovi pürogrammi järgi, kõikide teiste pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Molaarmass	Värske 1	Värske 2	Vana 1	Vana 2
0-7	TMAH			x	x	x	x
7,62	lauriinhape metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	214	x	x	x	x
7,75	dikarboksüülhappe metüülester	$C_{11}H_{20}O_4$	216	x	x	x	x
9,05	müristiinhape metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	242		x	x	x
10,04	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	256	x	x	x	x
11,37	palmitiinhape metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	x	x	x	x
15,40	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	299	x	x	x	x
19,51	arahiinhape metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	327	x	x	x	x
23,11	beheenhape metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	355	x	x	x	x
26,29	lignotseriinhape metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	383	x	x	x	x
28,71	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	409	x	x	x	x
29,25	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	411	x	x	x	x
30,06	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
31,45	tetratriakontaan	$C_{34}H_{70}$	479	x	x	x	x
32,05	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	439	x	x	x	x
33,67	metüültriakontüülester	$C_{31}H_{64}O$	453	x		x	x
34,70	heksatriakontaan	$C_{36}H_{74}$	507	x	x	x	x
35,30	melissiinhape metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	467	x	x	x	x
36,24	lupeol	$C_{30}H_{50}O$	427	x	x	x	x
38,57	dotriakontaanhappe metüülester	$C_{33}H_{66}O_2$	495	x	x	x	x

Lisa 8

Tabel 5. Parafiini pürogrammide interpreteering.

Värske ja vanandatud proovi (värske 1 ja vana 1) puhul tehti kordusmõõtmised (tabelis tähistatud vastavalt värske 2 ja vana 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud vana 2 proovi pürogrammi järgi, kõikide teiste pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutoalem	Molaarmass	Värske 1	Värske 2	Vana 1	Vana 2
0-7	TMAH			x	x	x	x
9,04	müristiinhappe metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	242	x	x	x	x
10,05	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	256		x	x	x
11,03	nonadekaan	$C_{19}H_{40}$	269	x			x
11,37	palmitiinhappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	x	x	x	x
12,72	eikosaan	$C_{20}H_{42}$	283	x		x	x
14,80	heneikosaan	$C_{21}H_{44}$	297	x	x	x	x
15,40	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	299	x	x	x	x
16,94	eikosaan	$C_{20}H_{42}$	283	x	x	x	x
18,96	heneikosaan	$C_{21}H_{44}$	297	x	x	x	x
20,85	tetrakosaan	$C_{24}H_{50}$	339	x	x	x	x
21,96	2-metüültetrakosaan	$C_{25}H_{52}$	353	x	x	x	x
22,73	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	353	x	x	x	x
24,26	heksakosaan	$C_{26}H_{54}$	367	x	x	x	x
25,40	3-metüülheksakosaan	$C_{27}H_{56}$	381	x	x	x	x
25,83	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
26,75	2-metüülheptakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
26,90	3-metüülheptakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
27,30	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
28,34	3-metüülloktakosaan	$C_{29}H_{60}$	409	x	x	x	x
28,71	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
29,55	2-metüülnonakosaan	$C_{30}H_{62}$	423	x	x	x	x
30,06	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	x	x	x
31,42	heksatriakontaan	$C_{36}H_{74}$	507	x	x	x	x
34,70	tetratetrakontaan	$C_{44}H_{90}$	619	x	x	x	x

Lisa 9

Tabel 6. Mesilasvaha ja karnaubavaha segu pürogrammide interpretatsioon.

Segu (proov 1) puhul tehti kordusmõõtmine (tabelis tähistatud proov 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud proov 1 pürogrammi järgi, proov 2 pürogrammi retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

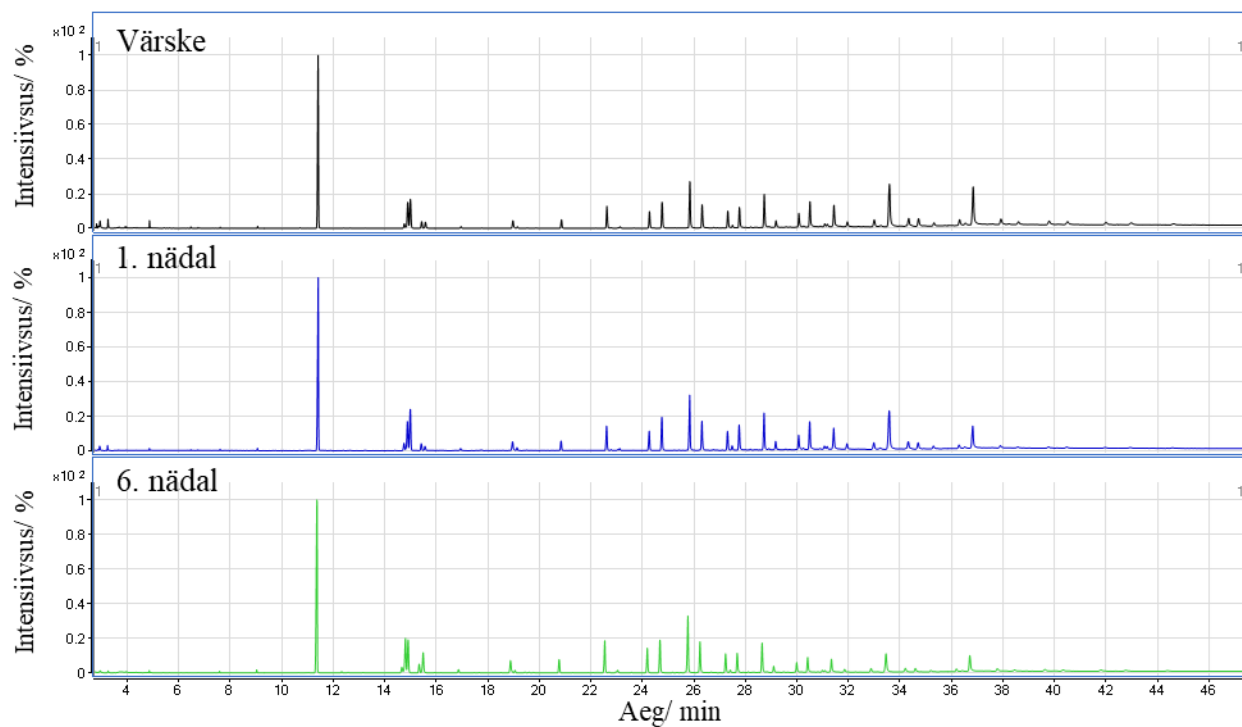
t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Molaarmass	Proov 1	Proov 2	MV-mesilasvaha KU-karnauba
0-7	TMAH			x	x	
7,13	oktaandihappe dimetüülester	$C_{10}H_{18}O_4$	202	x	X	
7,46	pentadekaan	$C_{15}H_{32}$	212	x	X	MV
7,61	lauriinuhappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	214	x	X	MV
7,76	dikarboksüülhappe metüülester	$C_{11}H_{20}O_4$	216	x	X	MV
8,78	p-metoksükaneeluhappe metüülester	$C_{11}H_{12}O_3$	192	x	X	KU
9,07	metüülmüristaat	$C_{15}H_{30}O_2$	242	x	X	MV
10,07	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	256	x	X	MV, KU
10,90	3,4-dimetoksükaneeluhappe metüülester	$C_{12}H_{14}O_4$	222	x		KU
11,08	7-heksadekeenuhappe metüülester, (Z)-	$C_{17}H_{32}O_2$	268	x	X	MV
11,43	palmitiinhappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	270	x	X	MV, KU
14,79	14-metoksüpalmitiinhappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	300	x		MV
14,92	oleiinhappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	296	x	X	MV
15,02	15-metoksüpalmitiinhappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	300	x	X	MV
15,46	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	299	x	X	MV, KU
19,57	arahiinhappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	327	x	X	MV, KU
21,42	heneikosaanhappe metüülester	$C_{22}H_{44}O_2$	341	x		MV
22,65	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	353	x	X	MV
23,17	beehenuhappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	355	x	X	MV, KU
24,79	trikosaanhappe metüülester	$C_{24}H_{48}O_2$	369	x	X	
25,87	heptakosaan	$C_{27}H_{56}$	381	x	X	MV
26,36	lignotseriinhappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	383	x	X	MV, KU
27,34	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	395	x	X	MV
27,80	metüülheksakosüülester	$C_{27}H_{56}O$	397	x	X	MV, KU
28,76	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	409	x	X	MV
29,22	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	411	x	X	MV, KU
31,99	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	439	x	X	MV, KU
33,61	metüültriakontüülester	$C_{31}H_{64}O$	453	x	X	MV, KU
35,36	melissiinhappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	467	x	X	MV, KU
36,87	metüüldotriakontüülester	$C_{33}H_{68}O$	481	x	X	MV, KU
40,56	metüültetriakontüülester	$C_{35}H_{72}O$	509	x	X	KU

Lisa 10

Tabel 7. Isetehtud pitsrivaha segu 1 pürogrammide interpretatsioon.

Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske proovi pürogrammi järgi, teiste proovide pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Värske	1 nädal vanandatud	6 nädalt vandandatud	MV- mesilasvaha
0-7	TMAH		x	x	x	
7,60	lauriinahappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	x	x	x	MV
9,05	metüülmüristaat	$C_{15}H_{30}O_2$	x	x	x	MV
11,40	palmitiinahappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	x	x	x	MV
12,66	3-metüülundekaan,	$C_{12}H_{26}$	x	x	x	MV
14,75	14-metoksupalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x	x	x	MV
14,88	oleiinahappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	x	x	x	MV
14,99	15-metoksupalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x	x	x	MV
15,43	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	x	x	x	MV
16,96	dokosaan	$C_{22}H_{46}$	x	x	x	MV
18,97	trikosaan	$C_{23}H_{48}$	x	x	x	MV
19,54	arahiinahappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	x	x	x	MV
20,85	tetrakosaan	$C_{24}H_{50}$	x	x	x	MV
22,62	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	x	x	x	MV
23,13	beheenahappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	x	x	x	MV
24,76	metüültetrakosüüleeter	$C_{25}H_{52}O$	x	x	x	MV
25,84	heptakosaan	$C_{27}H_{56}$	x	x	x	MV
26,31	lignotseriinahappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	x	x	x	MV
27,31	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	x	x	x	MV
27,77	metüülheksakosüüleeter	$C_{27}H_{56}O$	x	x	x	MV
28,73	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	x	x	x	MV
29,19	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	x	x	x	MV
30,07	hentriakontaan	$C_{31}H_{64}$	x	x	x	MV
30,50	metüüloktakosüüleeter	$C_{29}H_{60}O$	x	x	x	MV
31,43	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	x	x	x	MV
31,96	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	x	x	x	MV
33,59	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	x	x	x	MV
35,32	melissiinahappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	x	x	x	MV
36,84	metüüldotrikontüüleeter	$C_{33}H_{68}O$	x	x	x	MV
37,92	tetratetrakontaan	$C_{44}H_{90}$	x	x	x	MV



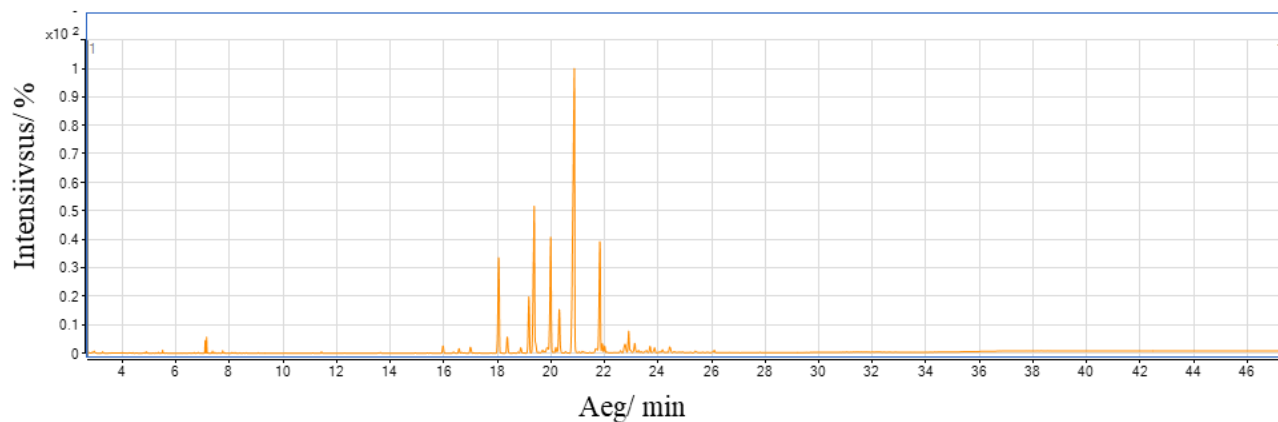
Joonis 12. Segu 1 pürogrammid, mis on registreeritud värskest ning üks ja kuus nädalat vanandatud proovist.

Lisa 11

Tabel 8. Kampoli pürogrammide interpretimine.

Kampoli (värske 1) puhul tehti ka kordusmõõtmine (tabelis tähistatud värske 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske 1 proovi pürogrammi järgi, värske 2 proovi pürogrammi retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Molaarmass	Värske 1	Värske 2
0-7	TMAH			x	x
7,08	longifoleen	$C_{15}H_{24}$	204	x	x
7,14	kariüofülleen	$C_{15}H_{24}$	204	x	
7,35	humuleen	$C_{15}H_{24}$	204	x	
7,74	kadineen	$C_{15}H_{24}$	204	x	
18,36	metüül sandarokopimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	316	x	x
19,17	metüülisopimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	316	x	x
19,85	metüül-6-dehüdrodehüdroabietaat	$C_{21}H_{28}O_2$	312	x	x
19,99	metüüldehüdroabietaat	$C_{21}H_{30}O_2$	314	x	x
20,87	metüülabietaat	$C_{21}H_{32}O_2$	316	x	x
21,82	neoabietaat	$C_{21}H_{32}O_2$	316	x	x
22,00	7-metoksütetradehüdroabietiinhape metüülester	$C_{22}H_{30}O_3$	342	x	
22,60	dehüdroabietiinhape metüülester	$C_{22}H_{32}O_3$	344	x	
22,90	15-metoksüdehüdroabietiinhape metüülester	$C_{22}H_{32}O_3$	344	x	x



Joonis 13. Kampoli pürogramm.

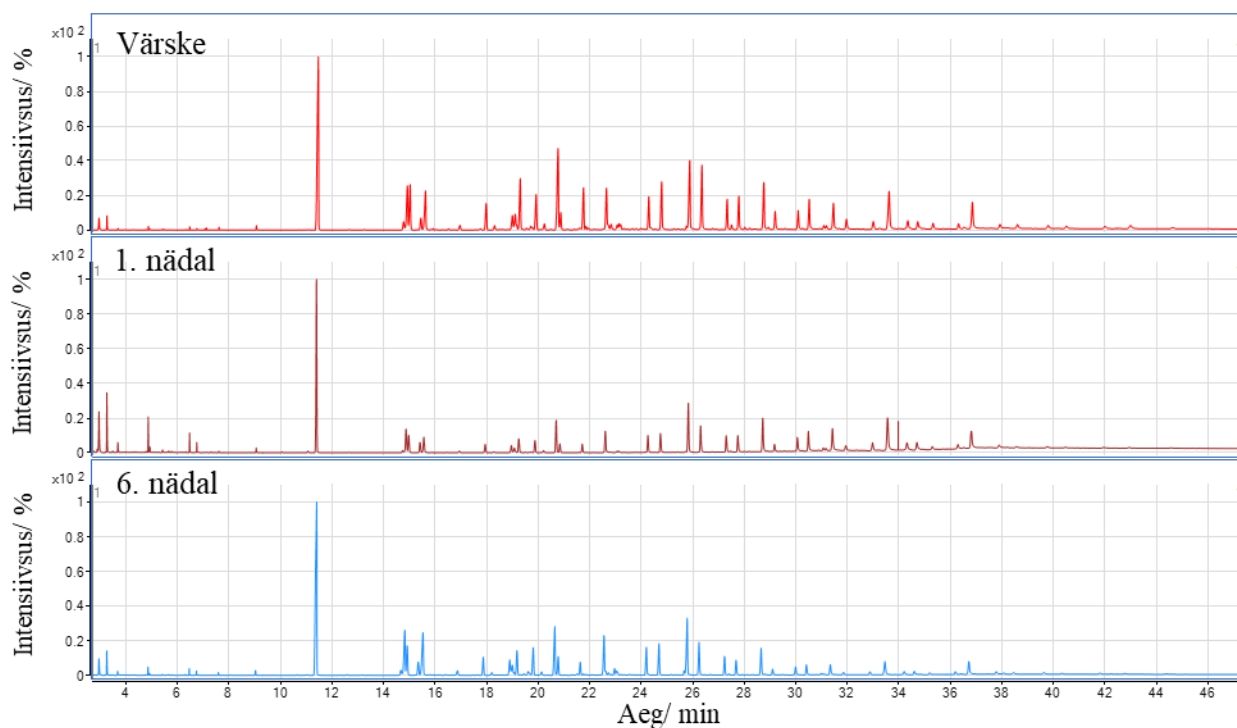
Tabel 9. Isetehtud pitserivaha segu 2 pürogrammide interpretatsioon.

Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske proovi pürogrammi järgi, teiste proovide pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Värske	1 nädal vanandatud	6 nädalat vanandatud	MV- mesilasvaha, K-kampol
0-7	TMAH		x	x	x	
7,06	longifoleen	$C_{15}H_{24}$	x			K
7,12	karüofülleen	$C_{15}H_{24}$	x			K
7,60	lauriinahappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	x	x	x	MV
9,05	metüülmüristaat	$C_{15}H_{30}O_2$	x	x	x	MV,
11,10	metüülpalmitoleaat	$C_{17}H_{32}O_2$	x	x		MV
11,46	palmitiinahappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	x	x	x	MV,
12,66	eikosaan	$C_{20}H_{42}$	x		x	MV
14,77	14-metoksüpalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x	x	x	MV
14,92	oleiinahappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	x	x	x	MV
15,03	15-metoksüpalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x	x	x	MV
15,43	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	x	x	x	MV
16,96	dokosaan	$C_{22}H_{46}$	x	x	x	MV
17,98	metüülpimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
18,31	metüül sandarokopimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
18,99	trikosaan	$C_{23}H_{48}$	x	x	x	MV
19,11	metüülisopimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
19,54	arahiinahappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	x	x	x	MV
19,78	metüül-6-dehüdrodehüdroabietaat	$C_{21}H_{28}O_2$	x	x	x	K
19,92	metüüldehüdroabietaat	$C_{21}H_{30}O_2$	x	x	x	K
20,76	metüülabietaat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
20,87	tetrakosaan	$C_{24}H_{50}$	x	x	x	MV
21,75	metüülneoabietaat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
21,95	7-metoksütetradehüdroabietaatmetüülester	$C_{22}H_{30}O_3$	x		x	K
22,65	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	x	x	x	MV
22,82	15-metoksüdehüdroabietaatmetüülester	$C_{22}H_{32}O_3$	x	x	x	K
23,14	beheenahappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	x	x	x	MV
23,20	15-hüdroksüdehüdroabietaatmetüülester	$C_{21}H_{30}O_3$	x			K
24,29	heksakosaan	$C_{26}H_{54}$	x	x	x	MV
24,79	metüültetrakosüüleeter	$C_{25}H_{52}O$	x	x	x	MV
25,88	heptakosaan	$C_{27}H_{56}$	x	x	x	MV
26,35	lignotseriinahappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	x	x	x	MV
27,34	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	x	x	x	MV
27,78	metüülheksakosüüleeter	$C_{27}H_{56}O$	x	x	x	MV
28,76	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	x	x	x	MV
29,20	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	x	x	x	MV
30,09	trikontaan	$C_{30}H_{62}$	x	x	x	MV
30,52	metüül-oktakosüüleeter	$C_{29}H_{60}O$	x	x	x	MV
31,46	hentriakontaan	$C_{31}H_{64}$	x	x	x	MV
31,97	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	x	x	x	MV
33,01	dotriakontaan	$C_{32}H_{66}$	x	x	x	MV
33,63	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	x	x	x	MV

Tabel 9 jätkub

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Värske	1 nädal vanandatud	6 nädalat vanandatud	MV- mesilasvaha, K-kampol
34,73	tritriakontaan	$C_{33}H_{68}$	X	X		MV
35,33	melissihappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	X	X	X	MV
36,32	tetratriakontaan	$C_{34}H_{70}$	X	X	X	MV
36,85	metüüldotriakontüüleeter	$C_{33}H_{68}O$	X	X	X	MV
40,51	metüültetratriakontüüleeter	$C_{35}H_{72}O$	X		X	MV



Joonis 14. Segu 2 pürogrammid, mis on registreeritud värskest ning üks ja kuus nädalat vanandatud proovist.

Lisa 12

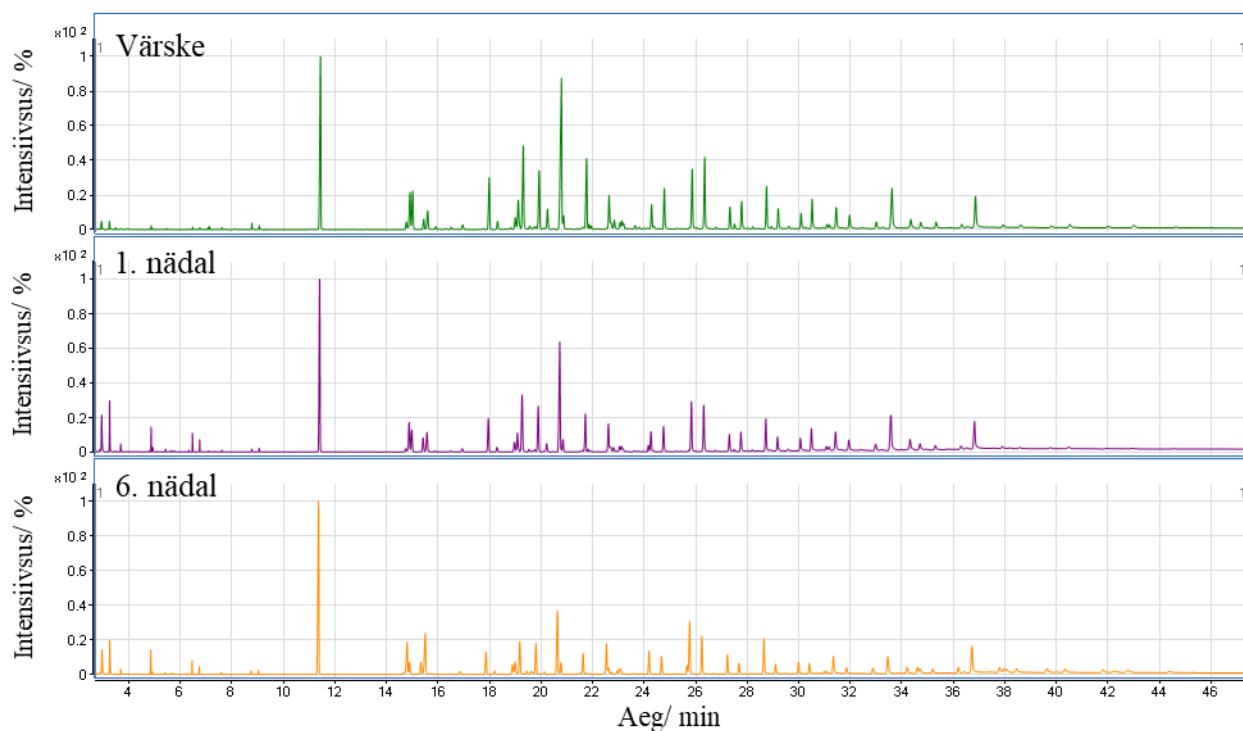
Tabel 10. Isetehtud pitserivaha segu 3 pürogrammide interpretatsioon.

Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud värske proovi pürogrammi järgi, teiste proovide pürogrammide retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Värske	1 nädal vanandatud	6 nädalat vanandatud	MV-mesilasvaha, K-kampol, KU- karnaubavaha
0-7	TMAH		x	x	x	
7,06	longifoleen	$C_{15}H_{24}$	x	x		K
7,12	karüofülleen	$C_{15}H_{24}$	x	x		K
7,34	humuleen	$C_{15}H_{24}$	x			K
7,60	lauriinahappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	x	x	x	MV
7,72	kadineen	$C_{15}H_{24}$	x			K
8,76	p-metoksükaneelhappe metüülester	$C_{11}H_{12}O_3$	x	x	x	KU
9,05	metüülmüristaat	$C_{15}H_{30}O_2$	x	x	x	MV
10,07	pentadekaanahape metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	x	x	x	MV, KU
10,90	3,4-dimetoksükaneelhappe metüülester	$C_{12}H_{14}O_4$	x			KU
11,43	palmitiinahappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	x	x	x	MV, KU
12,67	pentadekaan	$C_{15}H_{32}$	x		x	MV
13,26	1-oktadekanoolmetüülester	$C_{19}H_{40}O$	x	x		MV
14,77	14-metoksüpalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x	x	x	MV
14,90	oleiinahappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	x	x	x	MV
15,01	15-metoksüpalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	x	x	x	MV
15,43	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	x	x	x	MV, KU
17,98	metüülpimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
18,31	metüül sandarokopimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
18,99	trikosaan	$C_{23}H_{48}$	x	x	x	MV
19,11	metüülisopimaraat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
19,55	arahiinahappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	x	x	x	MV, KU
19,92	metüüldehüdroabietaat	$C_{21}H_{30}O_2$	x	x	x	K
20,78	metüülabietaat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
20,87	tetrakosaan	$C_{24}H_{50}$	x	x	x	MV
21,76	metüülneoabietaat	$C_{21}H_{32}O_2$	x	x	x	K
21,95	7-metoksütetradehüdroabietiinhappe metüülester	$C_{22}H_{30}O_3$	x	x		K
22,64	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	x	x	x	MV
22,84	15-metoksüdehüdroabietiinhappe metüülester	$C_{22}H_{32}O_3$	x	x	x	K
23,14	beheenahape metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	x	x	x	MV, KU
23,20	15-hüdroksüdehüdroabietiinhappe metüülester	$C_{21}H_{30}O_3$	x			K
24,78	metüültetrakosüülester	$C_{25}H_{52}O$	x	x	x	MV, KU
25,86	heptakosaan	$C_{27}H_{56}$	x	x	x	MV
26,35	lignotseriinahappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	x	x	x	MV, KU
27,32	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	x	x	x	MV
27,78	metüülheksakosüülester	$C_{27}H_{56}O$	x	X	x	MV, KU
28,75	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	x	X	x	MV
29,20	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	x	X	x	MV, KU
30,09	trikontaan	$C_{30}H_{62}$	x	X	x	MV
30,52	metüül-oktakosüülester	$C_{29}H_{60}O$	x	X	x	MV, KU
31,45	hentriakontaan	$C_{31}H_{64}$	x	X	x	MV

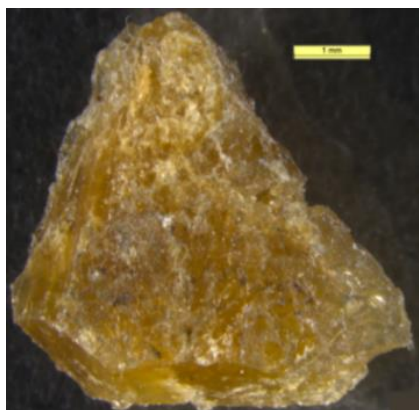
Tabel 10 jätkub

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Värske	1 nädal vanandatud	6 nädalat vanandatud	MV-mesilasvaha, K-kampol, KU- karnaubavaha
31,97	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	x	X	x	MV, KU
33,02	dotriakontaan	$C_{32}H_{66}$	x	X	x	MV
33,62	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	x	X	x	MV, KU
35,34	melissiinhappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	x	X	x	MV, KU
36,85	metüüldotriakontüüleeter	$C_{33}H_{68}O$	x	X	x	MV, KU
40,54	metüültetriakontüüleeter	$C_{35}H_{72}O$	x	X	x	KU



Joonis 15. Segu 3 pürogrammid, mis on registreeritud värskest ning üks ja kuus nädalat vanandatud proovist.

Lisa 13



Joonis 16. Magnus Ladulås'i pitseri proovitüki mikroskoobi pilt (20x suurendus).

Tabel 11. Magnus Ladulås'i pitseri proovi pürogrammide interpreteering.

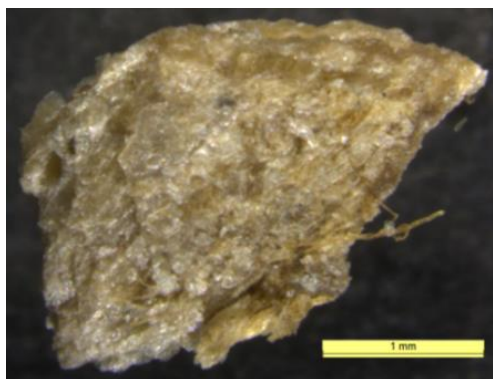
Proovile 1 tehti ka paralleelmõõtmine (tabelis tähistatud proov 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud proov 1 pürogrammi järgi, proov 2 pürogrammi retentsiooniajad erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Proov 1	Proov 2	MV- mesilasvaha
0-7	TMAH		X	X	
7,09	suberiinhappe dimetüülester	$C_{10}H_{18}O_4$	X	X	
7,22	dimetüülfalaat	$C_{10}H_{10}O_4$	X	X	
7,57	lauriinhappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	X	X	MV
7,72	dikarboksüülhappe metüülester	$C_{11}H_{20}O_4$	X	X	MV
9,00	müristiinhappe metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	X	X	MV
9,99	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	X	X	MV
10,98	metüülpalmitoleaat	$C_{17}H_{32}O_2$	X	X	MV
11,43	palmitiinhappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	X	X	MV
13,66	tetradekaandihappe dimetüülester	$C_{16}H_{30}O_4$	X	X	
14,64	14-metoksüpalmitiinhappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	X	X	MV
14,77	oleiinhappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	X	x	MV
14,95	15-metoksüpalmitiinhappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	X	x	MV
15,32	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	X	x	MV
19,40	arahiinhappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	X	x	MV
21,26	heneikosaanhappe metüülester	$C_{22}H_{44}O_2$	X	x	MV
22,50	pentakosaan	$C_{25}H_{52}$	X	x	MV
23,01	beheenihappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	X	x	MV
24,71	metüültetrakosüüleeter	$C_{25}H_{52}O$	X	x	MV
25,75	heptakosaan	$C_{27}H_{56}$	X	x	MV
26,25	lignotseriinhappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	X	x	MV
27,20	oktakosaan	$C_{28}H_{58}$	X	x	MV
27,69	metüülheksakosüüleeter	$C_{27}H_{56}O$	X	x	MV
28,63	nonakosaan	$C_{29}H_{60}$	X	x	MV
29,09	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	X	x	MV
30,46	metüüloktakosüüleeter	$C_{29}H_{60}O$	X	x	MV
31,33	hentriakontaan	$C_{31}H_{64}$	X	x	MV

Tabel 11 jätkub

31,85	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	X	x	MV
33,62	metüültriakontüüleeter	$C_{31}H_{64}O$	X	x	MV
35,19	melissinhappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	X	x	MV
36,42	oktakosanaal	$C_{28}H_{56}O$	X	x	MV
36,81	metüüldotriakontüüleeter	$C_{33}H_{68}O$	X	x	MV
40,30	metüültetatriakontüüleeter	$C_{35}H_{72}O$	X	x	MV

Lisa 14



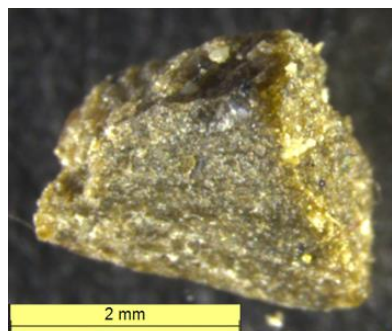
Joonis 17. Erik Klipping'i pitseri proovitüki mikroskoobi pilt (32x suurendus).

Tabel 12. Erik Klipping'i pitseri proovi pürogrammide interpretatsioon.

Proovile 1 tehti ka paralleelmõõtmine (tabelis tähistatud proov 2). Tabelis olevad retentsiooniajad on võetud proov 1 pürogrammi järgi, proov 2 pürogrammi retentsioonid erinesid ainult kolmandas komakohas.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	Proov 1	Proov 2	MV- mesilasvaha
0-7	TMAH		X	x	
7,57	lauriinahappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	X	x	MV
8,24	1-tetradekaanool metüülester	$C_{15}H_{32}O$	X	x	
8,63	1-dodekaanool	$C_{12}H_{26}O$	X		
9,00	müristiinahappe metüülester	$C_{15}H_{30}O_2$	X	x	MV
10,01	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	X	x	MV
11,36	palmitiinahappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	X	x	MV
14,62	14-metoksüpalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	X	x	MV
14,75	oleiinahappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	X	x	MV
14,88	15-metoksüpalmitiinahappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_3$	X	x	MV
15,30	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	X	x	MV
19,40	arahiinahappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	X	x	MV
19,73	11-heksadekeenahappe metüülester	$C_{17}H_{32}O_2$	X	x	
23,01	beheenahappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	X	x	MV
24,65	metüültetrakosüülester	$C_{25}H_{52}O$	X	x	MV
26,22	lignotseriinahappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	X	x	MV
27,66	metüülheksakosüülester	$C_{27}H_{56}O$	X	x	MV
29,08	heksakosaanhappe metüülester	$C_{27}H_{54}O_2$	X	x	MV
30,41	metüüloktakosüülester	$C_{29}H_{60}O$	X	x	MV
31,31	hentriakontaan	$C_{31}H_{64}$	X	x	MV
31,82	oktakosaanhappe metüülester	$C_{29}H_{58}O_2$	X	x	MV
33,50	metüültriakontüülester	$C_{31}H_{64}O$	X	x	MV
35,18	melissiinahappe metüülester	$C_{31}H_{62}O_2$	X	x	MV
36,73	metüüldotriakontüülester	$C_{33}H_{68}O$	X	x	MV
40,28	metüültettriakontüülester	$C_{35}H_{72}O$	X	x	MV

Lisa 15



Joonis 18. Amandus Heinrich Adamsoni skulptuuri “Kalevipoe ja vanasarvik” proovitüki mikroskoobi pilt (14,6x suurendus).

Tabel 13. Amandus Adamsoni skulptuuri “Kalevipoe ja vanasarvik” proovi pürogrammi interpretatsioon.

t_R /min	Komponendi nimi	Brutovalem	MV-mesilasavaha, KU-karnaubavaha, KL-kandelillavaha
0-7	TMAH		
7,08	suberiinhappe dimetüülester	$C_{10}H_{18}O_4$	
7,57	lauriinhappe metüülester	$C_{13}H_{26}O_2$	MV, KL
7,71	dikarboksüülhappe metüülester	$C_{11}H_{20}O_4$	MV, KL
8,22	tridekaanhappe metüülester	$C_{14}H_{28}O_2$	MV
8,39	sebatshappe dimetüülester	$C_{12}H_{22}O_4$	
9,00	metüülmüristaat	$C_{15}H_{30}O_2$	MV, KL
9,21	undekaandihappe dimetüülester	$C_{13}H_{24}O_4$	
9,97	pentadekaanhappe metüülester	$C_{16}H_{32}O_2$	MV, KU, KL
10,26	dodekaandihappe dimetüülester	$C_{14}H_{26}O_4$	
11,04	metüülpalmitoleaat	$C_{17}H_{32}O_2$	MV
11,34	palmitiinhappe metüülester	$C_{17}H_{34}O_2$	MV, KU, KL
11,68	tridekaandihappe dimetüülester	$C_{15}H_{28}O_4$	
13,05	heptadekaanhappe metüülester	$C_{18}H_{36}O_2$	
14,96	oleiinhappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_2$	MV
15,29	metüülstearaat	$C_{19}H_{38}O_2$	MV, KU, KL
16,56	linoolhappe metüülester	$C_{19}H_{34}O_2$	MV
16,89	lariksool	$C_{20}H_{34}O_2$	
18,25	lariksool	$C_{20}H_{34}O_2$	
18,44	trans-3-oktüüloksiraanoktaanhappe metüülester	$C_{19}H_{36}O_3$	
19,36	arahiinhappe metüülester	$C_{21}H_{42}O_2$	MV, KU, KL
22,55	13-dokoseenhappe metüülester	$C_{23}H_{44}O_2$	
22,97	beheenhappe metüülester	$C_{23}H_{46}O_2$	MV, KU, KL
24,61	trikosaanhappe metüülester	$C_{24}H_{48}O_2$	
25,07	eikosaandihappe dimetüülester	$C_{22}H_{42}O_4$	
26,16	lignotseriinhappe metüülester	$C_{25}H_{50}O_2$	MV, KU
28,07	dokosaandihappe metüülester	$C_{24}H_{46}O_4$	

INFOLEHT

Pürolüüser-gaasikromatograafia-massispektromeetria meetodika arendus vahade tuvastamiseks kultuuriväärtuslikest proovidest

Käesolevas bakalaureusetöös arendati välja Py-GC-MS-i meetodika vahade keemilise koostise uurimiseks. Töö käigus mõõdeti mesilasvaha, karnaubavaha, kandelillavaha, parafiini ja vaha sisaldavaid segusid. Lisaks uuriti kultuuriväärtuslike objektidelt saadud proove. Töö tulemuseks oli kasutatav Py-GC-MS-i meetodika vahade tuvastamiseks ja sellega mõõdetud vahade referentspürogrammid.

Märksõnad: Py-GC-MS, vahad, TMAH, HMDS, kultuuriväärtused

Development of pyrolyser-gas chromatography-mass spectrometry methodology for the analysis of waxes from cultural heritage samples

In this bachelor's thesis, Py-GC-MS methodology was developed for the study of the chemical composition of waxes. During the thesis work, beeswax, carnauba wax, candelilla wax, paraffin and different mixtures containing waxes were analysed. In addition, samples obtained from cultural heritage objects were examined. As a result of this work a suitable Py-GC-MS methodology for analysis of wax samples was developed. In addition, the collection of wax reference material pyrograms was collected during this work.

Keywords: Py-GC-MS, waxes, TMAH, HMDS, cultural heritage

CERCS: P300 Analüütiline keemia / Analytical chemistry

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lola Sõukand,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **Pürolüüsergaasikromatograafia-massispektromeetria meetodika arendus vahade tuvastamiseks kultuuriväärtuslikest proovidest**, mille juhendajad on **Signe Vahur** ja **Anu Teearu-Ojakäär** reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **08.06.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lola Sõukand
02.06.2023