

Sven Isaksson
2002

Inledning

Ett prov av ett vaxliknande material (Knr 1387, I10, Fnr 6622) funnet vid arkeologiska undersökningar av kvarteret Professorn 1 i Sigtuna har analyserats. Anledningen till analysen var flera. För det första var det intressant att fastställa vad materialet bestod av. Det mest sannolika var bivax, men det var också av intresse att utröna huruvida det var blandat med andra substanser. En andra anledning till analysen är av mer metodisk art. Bivax är en kemiskt sett mycket väl karakteriserad naturprodukt. Att få möjlighet att i detalj studera ett vax av relativt hög ålder, funnet i ett väl dokumenterat kontext, är viktigt för kunskapen om hur denna typ av organiskt material påverkas under depositionstiden. I denna rapport kommer dock i stort sett endast den rena karakteriseringen av materialet att behandlas.

Metod

Extraktion

En bit av materialet (ca 1 mg) fördes till ett provrör och en kloroform-metanol blandning (2:1, volymförhållande) tillsattes. Provet behandlades med ultraljud i två omgångar om femton minuter. Mellan omgångarna fick provet svalna. Vid denna behandling löste sig materialet fullständigt, med undantag för några mindre fasta partiklar. Efter sedimentation överfördes en volym extrakt till ett centrifugrör och provet centrifugerades i trettio minuter med 3000 varv per minut. Det nu klara extraktet överfördes till ett provrör där lösningsmedlet avlägsnades med hjälp av ett kvävgasflöde.

Derivatisering

För att göra de ingående komponenterna stabilare och lättare att separera i gaskromatografen (se nedan) blockerades eventuella protongivande grupper (till exempel hydroxyl- och karboxylsyragrupper). Detta gjordes genom att behandla proverna med bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid blandat med 1% (volym) klortrimetylsilan i ugn vid 60°C i femton minuter. Denna procedur omvandlar till exempel fettsyror till trimetylsilyl estrar och alkanoler till trimetylsilyl etrar, utan att förstöra lipidernas struktur i övrigt. Provet späddes med *n*-hexan och var nu redo för analys med gaskromatografi och masspektrometri (GC/MS). Alla glasvaror som användes var tvättade med koncentrerad salpetersyra, och alla kemikalier var av renhetsgraden *Pro Analyti*.

GC/MS

Gaskromatografi (GC) är en metod för att separera komponenter i komplexa blandningar. De ämnen som skall separeras transporteras av ett gasflöde (bärgas, eller mobil fas) genom en mycket smal kolonn på vars insida en stationär fas finns fastsatt. Gaskromatografen är utrustad med en ugn som successivt höjer temperaturen under separationens gång. På detta sätt separeras ämnen i ett prov med avseende på kokpunkt. Ämnen med låg kokpunkt kommer att förångas tidigare än ämnen med hög kokpunkt, och

transporteras iväg genom kolonnen. Ett ämne som inte adsorberas av den stationära fasen rör sig med samma hastighet som den mobila fasen. Ett ämne som adsorberas kommer däremot att fördröjas (retarderas) på sin väg genom kolonnen. Olika ämnen med snarlik kokpunkt vilkas interaktion med den stationära fasen skiljer sig från varandra kommer därför att vandra med olika hastighet genom kolonnen och fysiskt separeras från varandra mer eller mindre fullständigt. Efter kolonnen registreras närvaron av de separerade ämnena av en detektor. Resultatet presenteras som ett kromatogram. Kromatogrammet är en graf av koncentrationen av de separerade ämnena som en funktion av tiden. Separerade ämnen representeras av toppar i kromatogrammet. Arean under denna topp är proportionell mot mängden av ämnet. Kromatogrammet ger också information om ämnets retentionstid, den tid det åtgick för ämnet att passera igenom kolonnen. Denna tid är karakteristisk för varje ämne i ett givet kromatografiskt system. Mycket snarlika föreningar kan dock ha retentionstider som ligger varandra mycket nära och kan därför vara svåra att skilja åt.

För en fullständigt kvalitativ analys krävs att kromatografen kombineras med till exempel masspektrometri. Vid analys med GC krävs i allmänhet att provet derivatiseras eller substitueras (se ovan). Detta görs för att de ämnen man är intresserad av skall bli tillräckligt flyktiga för att kunna passera igenom kolonnen, eller för att ämnena skall bli mindre reaktiva och inte reagera med den stationära fasen och därmed fastna i kolonnen.

Den typ av masspektrometer som använts i detta arbete kallas kvadropol, eller massfilter. De i GC:n separerade föreningarna förs via ett interface över till en jonkälla. Här bombarderas de med elektroner. Organiska föreningar i gasfas bildar positiva joner vid bombardemang av elektroner. Förutom den jon som motsvarar den ursprungliga molekylen (M^+) bildas också joner med lägre masstal genom fragmentering av M^+ . Denna fragmentering sker inte slumpmässigt utan karakteriseras av molekylen struktur. Genom att undersöka vilka fragment som bildas samt hur mycket det bildas av varje fragment kan ämnets kemiska struktur bestämmas. Detta gör masspektrometern till en av de viktigaste metoderna för analys och strukturbestämning av organiska ämnen.

De joniserade molekyler och jonfragmenten förs över till kvadropolen, som består av fyra stavar som i tvärsnitt sitter i de fyra hörnen av en kvadrat. Under körning verkar stavar i motstående par, där det ena paret har en positiv växelspanning (DC) mellan sig och det andra en lika stor negativ växelspanning. Dessutom har alla fyra stavar en oscillerande spänning (Rf). En jon som skickas in mellan stavar underkastas komplexa rörelser på grund av de elektriska fälten från DC och Rf. Om DC- och Rf-spänningarna hålls konstanta kommer en jon med för dessa förhållanden för låg massa (egentligen massa per laddning, m/z) att dras mot de negativa stavar och fastna, emedan en jon med för hög massa kommer att dras mot de positiva stavar. Endast joner med "rätt" massa kommer att oscillera stabilt mellan stavar, komma ut ur massfiltret och nå fram till detektorn. Genom att mycket snabbt variera spänningarna (scanna) erhålls en separation av joner med olika m/z i form av ett masspektra. Masspektrat är en graf med m/z på x-axeln och intensitet på y-axeln.

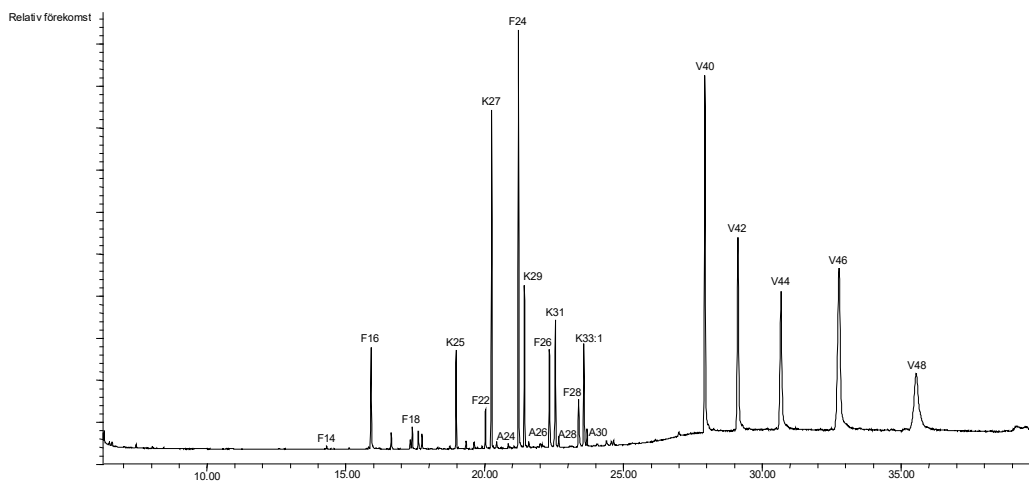
För GC/MS gäller i princip samma krav på förberedelser av provet som för GC. Beroende på vilka ämnen man skall analysera kan speciella krav komma att ställas på hur dessa substitueras eller derivatiseras. Detta är framför allt avhängigt av hur dessa derivat fragmenteras i masspektrometern, så att specifika masspektra erhålls.

Utförande

Analysen utfördes på en HP 6890 Gaskromatograf med en SGE BPX35 kapillärkolonn (25m x 220µm x 0,25µm) av medelpolär karaktär. En mikroliter provlösning injicerades *pulsed splitless* vid 325°C via ett Merlin Microseal™ High Pressure Septum. Ugnen var temperaturprogrammerad med en inledande isoterm på två minuter vid 50°C. Därefter ökades temperaturen med 12°C per minut till 350°C följt av en avslutande isoterm på 25 minuter. Som bärgas användes helium (He) med ett konstant flöde på 1,5 ml per minut. Gaskromatografen var kopplad till en HP 5973 Masselektiv detektor via ett interface med temperaturen 350°C. Fragmenteringen av separerade föreningar skedde genom elektronisk jonisering (EI) vid 70 eV. Temperaturen i jonkällan var 230°C. Massfiltret var satt att scanna i intervallet m/z 40-700, vilket gav 2,26 scan/sec. Insamling och bearbetning av data gjordes på en HP Vectra XM med mjukvaran HP Chemstation™ ver. A.03.00. Separerade ämnen identifierades utifrån respektive ämnes masspektra, såväl utifrån autentiskt material som referensdatabaser.

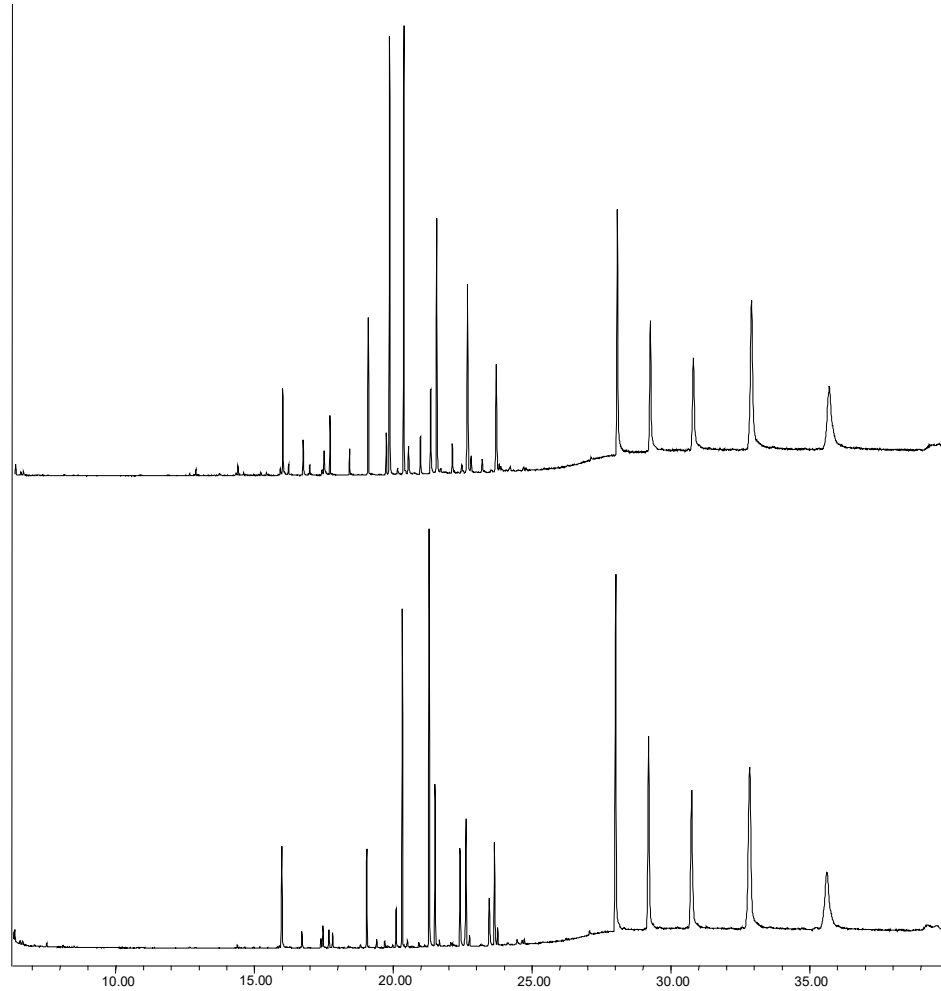
Resultat

Resultatet redovisas i tabell 1 och figurerna 1, 2 och 3. I figur 1 redovisas det kromatogram provet resulterade i. De större topparna i kromatogrammet har markerats med förkortningar som hänsyftar till ämnen redovisade i tabell 1. I tabellen redovisas identifierade ämnen med systematiska namn, vid vilken tid de dyker upp i figur 1 samt respektive ämnes relativa förekomst.



Figur 1. Kromatogram för prov Fnr 6622. På x-axeln redovisas retentionstid och på y-axeln relativ förekomst. Identifierade huvudkomponenter redovisas med förkortningar, F = fettsyror, K = kolväten, A = alkanoler och V = vaxestrar. Siffran motsvarar antalet kolatomer. Siffran efter kolon indikerar antalet dubbelbindningar i kolkedjan.

I figur 2 jämförs provet med ett autentiskt bivax (Kebo) som analyserats på samma sätt som provet. Denna jämförelse visar tydligt att materialet i prov Fnr 6622 till största delen utgörs av bivax.



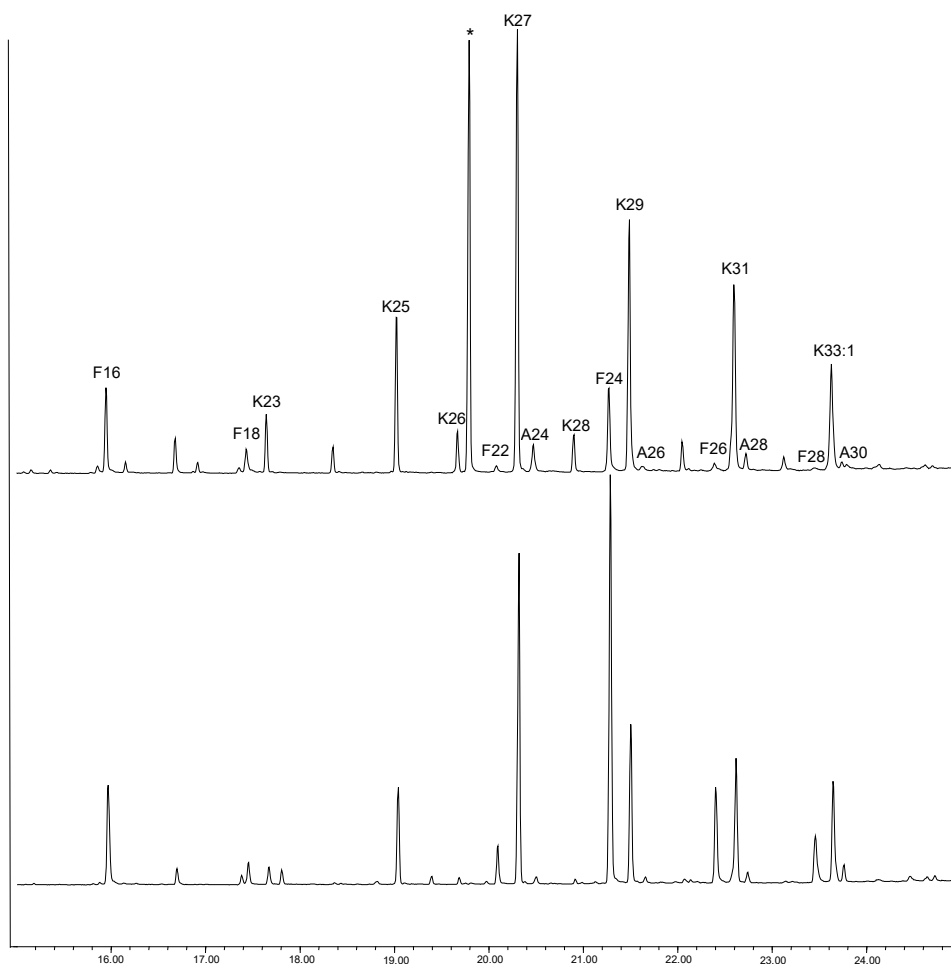
Figur 2. Kromatogrammet för prov Fnr 6622 (nederst), i jämförelse med ett kromatogram för autentiskt bivax (Kebo) (överst).

Namn (förkortning)	Tid	Relativ förekomst (%)
Tetradekansyra (F14)	14,36	0,06
Hexadekansyra (F16)	15,96	2,95
Dibutylftalat	16,67	0,42
Oktadekansyra	17,37	0,22
Oktadekansyra (F18)	17,44	0,62
Trikosan (K23)	17,66	0,47
Oidentifierad	17,79	0,34
Pentakosan (K25)	19,02	2,25
Dehydroabietinsyra	19,38	0,19
Hexakosan (K26)	19,67	0,14
Dokosansyra (F22)	20,08	0,94
Heptakosan (K27)	20,30	7,74
Tetrakosanol (A24)	20,49	0,24
Oktakosan (K28)	20,90	0,08
Tetrakosansyra (F24)	21,27	10,58
Nonakosan (K29)	21,49	3,93
Hexakosanol (A26)	21,64	0,20
Hexakosansyra (F26)	22,39	2,76
Hentriakontan (K31)	22,60	3,50
Oktakosanol (A28)	22,72	0,28
Oktakosansyra (F28)	23,43	1,66
Tritriakontan (K33:1)	23,63	2,90
Trikontanol (A30)	23,74	0,45
Trikontansyra	24,44	0,26
Pentatriakontan	24,62	0,16
Dotriakontanol	24,70	0,15
Dokosanylhexadekanoat	27,04	0,10
Tetrakosanylhexadekanoat (V40)	27,99	12,58
Hexakosanylhexadekanoat (V42)	29,17	9,89
Oktakosanylhexadekanoat (V44)	30,73	9,02
Triakontylhexadekanoat (V46)	32,81	15,90
Dotriakontylhexadekanoat (V48)	35,61	9,12

Tabell 1. I prov Fnr 6622 detekterade föreningar. Med tid menas retentionstid, till hjälp för att återfinna respektive förening i figur 1 och 3. De ämnen vars namn återföljs av en förkortning inom parentes är markerade med denna förkortning i figur 1 och 3. Den relativa förekomsten har beräknats utifrån arean under toppen för vart och ett av ämnena, i procent av totalarean i kromatogrammet i figur 1. Samtliga föreningar redovisas i tabellen med systematiska namn, utom dehydroabietinsyra vars systematiska namn är rätt långt (1, 2, 3, 4, 4a, 9, 10, 10a-oktahydro-1, 4a,-dimetyl-7-(1-metyletyl)-1-fenantrenkarboxylsyra).

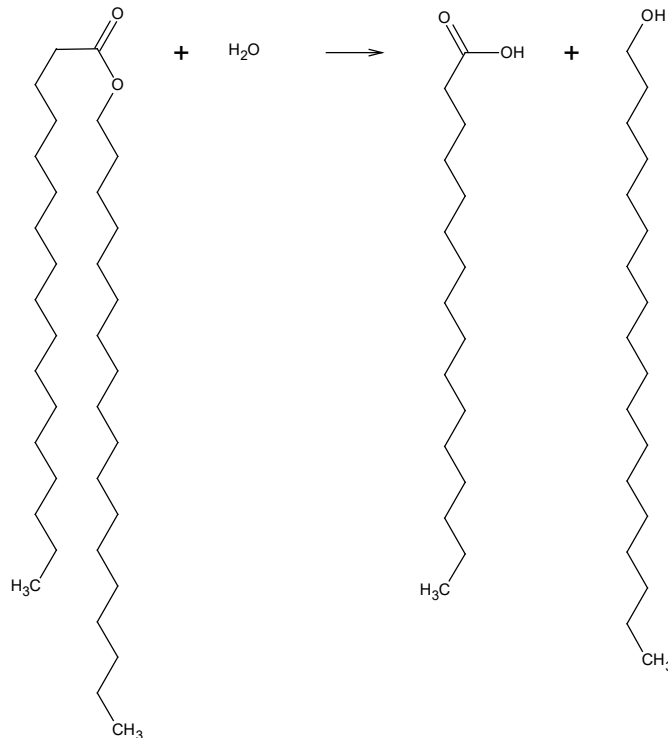
Diskussion

Att kromatogrammet för prov Fnr 6622 är mycket likt det av autentiskt bivax (figur 2) beror givetvis av att det innehåller för bivax karaktäristiska ämnen. Distributionen av kolväten i provet sträcker sig från trikosan till pentatriakonten, med heptakosan som den vanligast förekommande. Detta stämmer väl med tidigare analyser av bivaxer (Mills & White 1994:50). Även serien med vaxestrar, från dokosanylhexadekanoat till dotriakontylhexadekanoat, stämmer väl med vad som påträffats i såväl forntida som autentiska bivaxer (Heron *et al.* 1994:266ff). Autentiskt bivax innehåller generellt sett lägre halter av de kortare fettsyorna (tetradekansyra till dokosansyra) än vad detta prov uppvisar (figur 3).



Figur 3. Ett utsnitt ur kromatogrammet för prov Fnr 6622 (nederst), i jämförelse med samma utsnitt ur kromatogram för autentiskt bivax (Kebo) (överst). Identifierade huvudkomponenter redovisas med förkortningar, F = fettsyror, K = kolväten och A = alkanoler. Siffran motsvarar antalet kolatomer. Siffran efter kolon indikerar antalet dubbelbindningar i kolkedjan. Toppen markerad med * är en kontamination i det autentiska bivaxet (4-klorofenylsulfon). Den stora skillnaden mellan de båda vaxerna är en högre andel fettsyror i prov Fnr 6622.

När vaxerestrar hydrolyseras frigörs karboxylsyror (figur 4), och distributionen kan komma att domineras av de kortare fettsyrorerna (Mills & White 1994:50). Provet är således inte helt opåverkat av tidens tand.



Figur 4. Exempel på esterhydrolysis. Vaxestern oktadekylhexadekanoat bryts vid hydrolysis ned till hexadekansyra och oktadekanol.

Den låga men tydliga närvaron av dehydroabietinsyra visar att vaxet i något sammanhang kommit i kontakt med kåda från släktet *Pinaceae* (Mills & White 1994:99). Halten är sannolikt för låg för att indikera en medveten inblandning av sådan kåda i vaxet. Möjligen kan det ha lakats ut om vaxet förvarats i ett tråkärl av till exempel gran eller tall.

En förening som påträffats i provet är en kontamination; dibutylftalat. Denna typ av föreningar, ftalatestrar, används som mjukgörare i plast. Med tiden utsöndras dessa föreningar ur plasten, och är inte ovanliga kontaminationer i arkeologiska material som förvarats i plastpåsar (Mills & White 1994:131). Detta är kanske något att beakta vid val av förpackningsmaterial för arkeologiskt material som skall genomgå organisk-kemisk analys i framtiden.

Vad detta bivax använts till måste givetvis baseras på det arkeologiska kontext det påträffats i. Generellt sett har bivax använts till en lång rad olika saker under forntid och medeltid, till exempel som bindemedel, för ytbehandling, tätning, impregnering, för modellering och vid gjutning (till exempel förlorad form), som komponent i sigill, och i vaxljus (Mills & White 1994:49, Lambert 1998:165f).

Referenser

Heron, C., Nemcek, N., Bonfield, K. M., Dixon, D. & Ottaway, B. S. 1994. The Chemistry of Neolithic Beeswax. *Naturwissenschaften* 81, 266-269.

Lambert, J. B. 1998 *Traces of the Past. Unraveling the Secrets of Archaeology through Chemistry*. Reading, Massachusetts.

Mills, J. S. & White, R. 1994. *The Organic Chemistry of Museum Objects*. London.