

**IZOLACJA I IDENTYFIKACJA NATURALNYCH
SUBSTANCJI BARWIĄCYCH OBECNYCH
W PRÓBKACH FARB ARTYSTYCZNYCH
I TKANINACH POCHODZENIA HISTORYCZNEGO**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF NATURAL
DYESTUFFS PRESENT IN ARTISTIC PAINTS
AND TEXTILES OF HISTORICAL ORIGIN**

**Olga Otłowska*, Magdalena Śliwka-Kaszyńska,
Aleksander Kołodziejczyk**

*Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk
e-mail: olgotlow@student.pg.gda.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Substancja barwiąca
2. Chemiczna klasyfikacja barwników organicznych
3. Laki barwnikowe
4. Techniki analityczne stosowane do identyfikacji barwników organicznych
5. Rozdzielenie chromatograficzne
6. Spektrometria mas
7. Charakterystyczne drogi fragmentacji wybranych grup substancji barwiących
8. Metody izolacji substancji barwiących z włókien i ze spoiw malarskich
9. Zastosowanie technik chromatograficznych i spektralnych w analizie barwników pobranych z obiektów muzealnych

Uwagi końcowe

Podziękowania

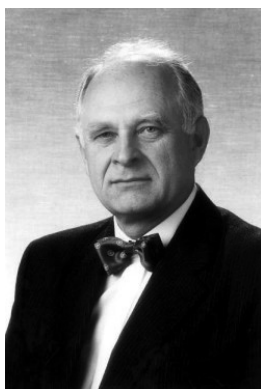
Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Olga Otłowska – absolwentka Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, w roku 2012 ukończyła studia na kierunku Technologia Chemiczna uzyskując tytuł magistra – inżyniera. Od 2013 roku doktorantka w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej. Pod opieką dr hab. Magdaleny Śliwka-Kaszyńskiej realizuje pracę doktorską dotyczącą identyfikacji naturalnych barwników organicznych w historycznych farbach artystycznych. Obecnie realizuje projekt grantowy *Preludium* pt. „Identyfikacja organicznych substancji barwiących stosowanych przez XIX-wiecznych polskich artystów. Badanie wpływu promieniowania UV na proces starzenia się barwników, identyfikacja produktów ich rozkładu” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.



Dr hab. Magdalena Śliwka-Kaszyńska – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Stopień doktora w zakresie nauk chemicznych uzyskała na Politechnice Gdańskiej w 1997 roku, przedstawiając rozprawę doktorską pt. „Chiralne ligandowymienne fazy stacjonarne. Otrzymywanie i zastosowanie w HPLC”. Na przełomie lat 2000–2001 odbyła pierwszy podoktorski staż naukowy w Hiszpanii na Uniwersytecie *del Pais Vasquo* (San Sebastian). W latach 2001–2002 przebywała na stażu naukowym we Francji w *Centre National de la Recherche Scientifique delegation Regionale* (Pau), jako jedna z pierwszych z PG stypendystek Komisji Europejskiej w ramach 5 Programu Ramowego (fundacja Marie Curie). W 2011 roku uzyskała tytuł doktora habilitowanego. Na przełomie 2011–2012 roku odbyła trzymiesięczną praktykę w *American University in Cairo* (Egipt), gdzie uczestniczyła w projekcie badawczym z zakresu Chemii Archeologicznej. Obecnie prowadzi badania nad identyfikacją naturalnych organicznych substancji barwiących i produktów ich fotodegradacji obecnych w różnego typu obiektach muzealnych (historyczne farby artystyczne, tkaniny, manuskrypty). Jest autorką szeregu prac naukowych z zakresu chromatografii cieczowej i syntezy organicznej.



Aleksander Kołodziejczyk – urodzony 8 czerwca 1942 roku w Białym-Białej, profesor nauk chemicznych, obecnie profesor emeritus Politechniki Gdańskiej. Po ukończeniu w 1966 r. studiów magisterskich na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej podjął pracę na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej i na niej doczekał się emerytury. Na tej uczelni w 1973 roku obronił pracę doktorską, a sześć lat później habilitacyjną. W 1993 r. otrzymał tytuł profesora. Pełnił odpowiedzialne funkcje: dyrektora Instytutu, prorektora ds. kształcenia PG, a w latach 1996–2002 rektora Politechniki Gdańskiej. Był przewodniczącym Rady Rektorów Pomorza Gdańskiego i wiceprzewodniczącym Konferencji Rektorów Polskich Uczelni Technicznych. Od 2008 roku jest Przewodniczącym Rady Naukowej Biblioteki Gdańskiej PAN. W pracy naukowej skupił się na chemii związków naturalnych. W dorobku naukowym znajduje się ponad 90 oryginalnych publikacji naukowych, ponad 20 artykułów przeglądowych, ponad 120 komunikatów konferencyjnych drukowanych w postaci streszczeń, 5 patentów, 60 artykułów popularno-naukowych i publicystycznych, 4 skrypty uczelniane, jedna monografia wydana przez PWN, pt. *Naturalne związki organiczne*. Od kilku lat dużo uwagi poświęca popularyzowaniu nauki. Wygłosił ponad 70 wykładów popularno-naukowych dla uczniów szkół ponadpodstawowych, dla słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego Wieku i na innych forach.

ABSTRACT

natural organic dyes are group of substances that belong to various types of chemical compounds. The most commonly used in paintings and dyeing textiles were naturally occurring dyestuffs from group of anthraquinones, flavones and indigoid dyes. Identification of coloring substances present in historical artistic paints provides relevant information for a wide range of specialists dealing with works of art and in the field of conservation science. This research presents a review of analytical techniques (mainly chromatographic and spectroscopic) used for identification of dyes. It also describes the methods of colorants isolation from historical artistic paints and textiles. Furthermore, the article presents a brief characteristics of fragmentation reactions of selected groups of dyestuffs, which is useful in their identification.

Keywords: natural organic dyes, analysis LC-DAD-MS, extraction, historical artistic paints

Słowa kluczowe: naturalne barwniki organiczne, analiza LC-DAD-MS, ekstrakcja, historyczne farby artystyczne

WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

APCI	– jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
C.I.	– numer koloru wg Międzynarodowego Indeksu Barw (ang. <i>colour index</i>)
CID	– fragmentacja przez zderzenia (ang. <i>collision – induced dissociation</i>)
DAD	– detektor diodowy (ang. <i>diode array detector</i>)
DMF	– dimetyloformamid (ang. <i>dimethylformamide</i>)
DMSO	– dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ESI	– jonizacja poprzez elektrorozpylanie (ang. <i>electrospray ionization</i>)
eV	– elektronowolt
GC-MS	– chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>gas chromatography–mass spectrometry</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
ICP-MS	– spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IT	– pułapka jonowa (ang. <i>ion trap</i>)
m/z	– stosunek masy jonu (m) do jego ładunku (z) (ang. <i>mass/charge ratio</i>)
MECK	– micelarna chromatografia elektrokinetyczna (ang. <i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
MRM	– monitorowanie reakcji złożonej (ang. <i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	– spektrometria mas (ang. <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS lub MS ⁿ	– tandemowa spektrometria mas (ang. <i>tandem mass spectrometry</i>)
Q	– pojedynczy analizator kwadrupolowy (ang. <i>quadrupole</i>)
QQQ	– potrójny analizator kwadrupolowy (ang. <i>triple quadrupole</i>)
S/N	– wartości stosunku sygnału do szumu (ang. <i>signal-to-noise</i>)
SCAN	– tryb pracy spektrometru mas: monitorowanie jonów w wybranym zakresie stosunku m/z (ang. <i>scan monitoring</i>)

SEM-EDS	– mikroskopia skaningowa połączona z mikroanalizą rentgenowską (ang. <i>scanning electron microscopy – energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)
SIM	– tryb pracy spektrometru mas: monitorowanie wybranych jonów (ang. <i>selected ion monitoring</i>)
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. <i>solid phase extraction</i>)
THF	– tetrahydrofuran
UHPLC	– ultraszybka chromatografia cieczowa (ang. <i>ultra high-performance liquid chromatography</i>)
UV-Vis	– promieniowanie elektromagnetyczne w zakresach widzialnym i nadfioletowym (ang. <i>ultra violet visible</i>)
XPS	– rentgenowska spektroskopia fotoelektronowa (ang. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
XRF	– spektrometria fluorescencji rentgenowskiej (ang. <i>X-ray fluorescence spectrometry</i>)

WPROWADZENIE

Historia stosowania barwników przez człowieka sięga czasów prehistorycznych, kiedy to na ścianach jaskiń tworzono prymitywne malowidła. Używanymi barwidłami były wówczas pigmenty uzyskiwane ze startych minerałów lub też węgiel ze spalonego drewna. Najstarsze malowidło odkryte w Afryce powstało najprawdopodobniej 70 000 lat temu [1]. Jednym z najwcześniej poznanych barwników jest indygo, wykorzystywane w Indiach już od około 4000 lat. Ekstrakty zwierzęce, roślinne oraz minerały były jedynym źródłem barwników aż do drugiej połowy XIX wieku [2]. Znalazły one zastosowanie przede wszystkim w barwieniu tkanin oraz w malarstwie do produkcji farb. Możliwość pełnej charakterystyki materiału malarskiego wykorzystanego przez artystę do stworzenia danego dzieła jest ważnym aspektem poznawczym w wielu dziedzinach nauki począwszy od historii sztuki po procesy konserwatorskie artefaktów, a także w wykrywaniu fałszerstw. Identyfikacja substancji barwiących i produktów ich degradacji obecnych w obiektach dziedzictwa kulturowego dostarcza informacji stanowiących zasadniczą wiedzę, która pozwala określić pochodzenie i czas powstania dzieła, dobrać odpowiednią metodykę konserwacji lub restauracji, jak i również określić stopień jego zniszczenia. Ze względu na skomplikowany skład naturalnych barwników organicznych oraz problematykę związaną z ich izolacją z tkanin lub farb artystycznych, identyfikacja substancji barwiących jest dużym wyzwaniem dla chemików i wymaga zastosowania zaawansowanych narzędzi analitycznych.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas jest obecnie najbardziej rozpowszechnioną techniką analityczną służącą do identyfikacji barwników organicznych. W ciągu trzydziestu lat pojawiło się szereg artykułów naukowych na ten temat. W niniejszym opracowaniu przedstawiony został przegląd literaturowy (z naciskiem na ostatnie 15 lat) dotyczący procedur analitycznych, w tym: metod przygotowania próbki, chromatograficznego rozdzielania i rodzaju detekcji, stosowanych w izolacji i identyfikacji naturalnych substancji barwiących.

1. SUBSTANCJA BARWIĄCA

Substancja barwiąca według normy PN-EN ISO 4618:2007 to każda substancja nadająca barwę innym materiałom. Pojęcie „substancja barwiąca” obejmuje pigmenty (nierozpuszczalne w stosowanym spoiwie) i barwniki (rozpuszczalne w stosowanym spoiwie) [3]. Substancjami barwiącymi są więc związki chemiczne, które zdolne są do selektywnej absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV-vis. Możliwe jest to dzięki obecności w cząsteczce tak zwanego chromoforu. Chromofor, to część struktury cząsteczki ze sprzężonym układem elektronów π (grupy nienasycone lub aromatyczne), które łatwo ulegają wzbudzeniu w wyniku pochłaniania promieniowania. Skutkuje to wykazywaniem barwy przez daną substancję [4]. Substancja barwiąca musi zawierać w swojej strukturze także

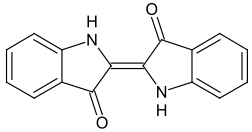
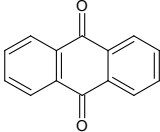
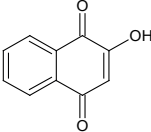
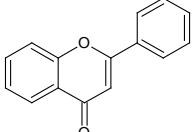
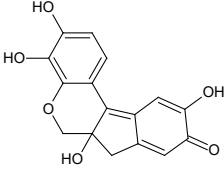
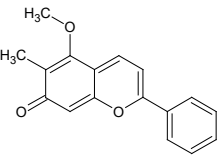
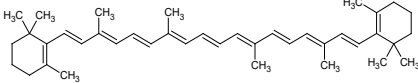
ugrupowanie atomów zwane auksochromem, które zwiększa intensywność barwy. Przykładowymi chromoforami są grupy: etylenowa, azometylenowa, karbonylowa, azowa oraz każda inna z wiązaniem wielokrotnym. Z kolei auksochromem są grupy elektronodonorowe np. hydroksylowa, alkoksylowa czy aminowa [5].

2. CHEMICZNA KLASYFIKACJA BARWNIKÓW ORGANICZNYCH

Klasyfikacja chemiczna barwników oparta jest na różnicach struktury chemicznej chromoforu. Zgodnie z Międzynarodowym Indekssem Barw (ang. *Colour Index International*) substancje barwiące klasyfikuje się ze względu na ich pochodzenie oraz strukturę chemiczną. Każda substancja barwiąca w tej bazie danych posiada indywidualną nazwę generyczną (C.I.) oraz indywidualne oznaczenie jakim jest numer C.I. [6]. Ze względu na strukturę chemiczną barwnika dzieli się je na: nitrozowe, nitrowe, azowe, stilbenowe, karotenoidowe, difenylometanowe, triarylometanowe, ksantenowe, akrydynowe, chinolinowe, metinowe, tiazolowe, indaminowe, indofenolowe, azynowe, oksazynowe, tiazynowe, siarkowe, laktonowe, aminoketonowe, hydroksyketonowe, antrachinonowe, indygoiowe i ftalocyjaninowe [7].

Przedstawicielami substancji barwiących naturalnie występujących w przyrodzie są barwniki antrachinonowe, indygoiowe, flawonowe, karoteinowe oraz pochodne: α -hydroksynaftochinonów, dihydropiranu i antocyjaniny [8]. Struktury chemiczne wyżej wymienionych substancji barwiących przedstawione są w Tabeli 1.

Tabela 1. Struktury chemiczne wybranych naturalnych substancji barwiących
Table 1. Chemical structures of selected natural dyestuffs

			
indygo	antrachinon	α -hydroksynaftochinon	flawanon
			
hemateina	drakorhodyna	β -karoten	

3. LAKI BARWNIKOWE

Z definicji laki to materiały barwiące mające właściwości pigmentów, otrzymywane w wyniku działania solami metali na barwniki rozpuszczalne w wodzie [9]. Do tworzenia laków stosowane są głównie barwniki należące do klasy barwników zaprawowych. Proces tworzenia laków polega na strącaniu rozpuszczalnego w wodzie barwnika zaprawami, w wyniku, czego tworzy się kompleks (barwnik-metal). Najczęściej stosowanymi zaprawami są: ałun potasowo-glinowy ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), uwodniony siarczan żelaza ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) oraz chlorek cyny ($SnCl_2$). W zależności od metalu tworzącego kompleks (metal-barwnik) otrzymuje się laki o różnych barwach [10].

Tabela 2. Zależność między metalem użytym do zaprawy a barwą laku
Table 2. The dependence between the metal used for mordant and color of lake

surowiec barwierski	metal		
	Al	Sn	Fe
koszenila	karmazynowy	szkarłatny	purpurowy
drzewo brezyłkowe	czerwony	różowy	brązowy
jagoda perska	brązowo-pomarańczowy	jasno-pomarańczowy	ciemno-oliwkowy
„young fustic”	żółty	pomarańczowy	zielonkawo-żółty

Analiza metali wchodzących w skład laków prowadzona jest z zastosowaniem między innymi spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS) [11], rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) i spektroskopii Ramana [12], mikroskopii skaningowej połączonej z mikroanalizą rentgenowską (SEM-EDS) [13] oraz rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej (XRF) [14].

4. TECHNIKI ANALITYCZNE STOSOWANE DO IDENTYFIKACJI BARWNIKÓW ORGANICZNYCH

Obecnie w analizie organicznych substancji barwiących oraz produktów ich degradacji wykorzystuje się techniki chromatograficzne sprzężone z technikami spektralnymi. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) połączona z detektorem diodowym (DAD) i spektrometrem mas (MS) jest najbardziej rozpowszechnioną techniką analizy barwników organicznych. Znalazła ona zastosowanie w identyfikacji substancji barwiących obecnych w różnego rodzaju historycznych wyrobach tekstylnych [13, 15–34], w próbkach artystycznych farb malarskich pobranych z obrazów i ikon [35–40], w surowcach barwierskich pochodzenia roślinnego i zwierzęcego [41–43], w tekstyliach modelowych [2, 44–47] oraz lakach modelowych [12, 48, 47]. Technikami rzadziej stosowanymi w analizie barwników są: chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) [50–53], micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MECK) [54] czy ultra szybka chromatografia

cieczowa (UHPLC) [55, 56]. Mimo, że technika UHPLC, ze względu na umiarkowaną dostępność aparatury, stosowana jest w analizie chromatograficznej barwników rzadziej, niemniej jednak w porównaniu z klasyczną techniką HPLC wykazuje wyższą czułość i rozdzielczość, krótsze czasy analiz oraz mniejsze zużycie eluentów.

Detektor diodowy UV był do niedawna najczęściej stosowanym detektorem w identyfikacji barwników. Niestety identyfikacja substancji barwiących występujących często w skomplikowanych mieszaninach wymaga zastosowania bardziej miarodajnych metod ich detekcji niż pozwala na to detektor diodowy. Przykładowo, aglikony flawonoidów i ich glikozydowe pochodne mają bardzo zbliżone widma UV-vis, to jednak zasadniczo różnią się budową i masą cząsteczkową. W związku z czym bardzo trudno jest je odróżnić za pomocą detektora diodowego. Z tego też względu coraz częściej w analizie substancji barwiących stosuje się techniki sprzężone HPLC-DAD-MS, które dostarczają jednocześnie informacji zarówno w postaci widm absorpcyjnych jak i widm mas [21].

5. ROZDZIELENIE CHROMATOGRAFICZNE

Barwniki pozyskiwane z danego naturalnego surowca barwierskiego, pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, zawierają w swoim składzie kilka a nawet kilkanaście organicznych substancji barwiących, często o bardzo zbliżonych strukturach chemicznych, a tym samym zbliżonych właściwościach fizykochemicznych. Z tego też względu efektywne ich rozdzielenie na pojedyncze składniki jest zadaniem dość trudnym i pracochłonnym. Rozdzielenie chromatograficzne organicznych substancji barwiących prowadzone jest jak dotąd przeważnie w układzie faz odwróconych. W zależności od polarności analizowanych związków stosuje się odpowiednie programy elucji, różnego typu fazy stacjonarne oraz mieszaniny faz ruchomych [57]. Najczęściej używane są kolumny wypełnione żelam krzemionkowym modyfikowanym grupami: oktadecylowymi C18 [17, 25, 27, 45, 48, 55], oktylowymi C8 [55, 58], butylowymi C4 [21, 28, 30] i fenyłowymi [29, 55] o wielkości złoża 5 μm . Rozmiary stosowanych kolumn chromatograficznych są do siebie zbliżone i wynoszą 250×3 [25, 32, 33, 37, 38, 45], 250×4,6 [12, 35], 250×2,1 [21, 28], 150×2,1 [18, 28] oraz 125×4 mm [27, 46]. Ze względu na małe ilości próbek barwników, szczególnie tych pobieranych z dzieł sztuki, te standardowe kolumny zastępowane są mniejszymi: 150×4,6 ze złożem 3,5 μm [15, 17] oraz 100×2,1 ze złożem 3 μm [44, 60]. W analizie UHPLC korzysta się natomiast z kolumn wypełnionych złożem o wielkości ziaren 1,7-1,8 μm [55, 56]. Niekiedy stosuje się również prekolumny [2, 17, 18, 35, 36].

Układy faz ruchomych stosowanych do analizy substancji barwiących należących do flawonoidów, antrachinonów i innych o podobnej polarności składają się przeważnie z fazy wodnej z dodatkiem metanolu [27, 44, 49, 56], acetonitrylu [28, 32, 45, 56, 59, 60] lub ich mieszanin [27]. W przypadku analizy niepolarnych barwników np. indygooidowych, jako dodatek do fazy ruchomej stosuje się również np. tetrahydrofuran (THF) [20]. W celu zapewnienia efektywniejszego rozdziele-

nia związków polarnych oraz poprawy symetrii pików chromatograficznych do faz ruchomych, stosowanych w chromatografii cieczowej bez detekcji MS, dodaje się niewielkie ilości (od 0,01% [50] do 1,5% [29]) kwasów, jako modyfikatorów pH, w tym: kwasu trifluorooctowego (TFA) [32, 37, 45], mrówkowego [15, 28, 56], octowego [25], ortofosforowego [27, 56] czy kwasu metanosulfonowego [60]. Podczas stosowania kwasu TFA w analizie z wykorzystaniem detekcji MS należy pamiętać, że jest on agresywnym odczynnikiem i może powodować uszkodzenie spektrometru mas oraz powodować supresję jonizacji [61, 62]. W związku z tym, kwas ten powinien być używany tylko w bardzo małych stężeniach (0,001%) [57] lub też być zastępowany przez inne kwasy np. HCOOH [27, 45]. Jako dodatki do faz ruchomych stosuje się również bufory zawierające np. octan amonu [43, 44] lub mrówczan amonu [38, 62].

6. SPEKTOMETRIA MAS

Spektrometria mas, jako technika charakteryzująca się wysoką selektywnością i czułością, jest doskonałym narzędziem do identyfikacji substancji barwiących na niskich poziomach stężeń. Dobór odpowiedniej techniki jonizacji zależy przede wszystkim od polarności analizowanych związków [63]. Najczęściej stosowanymi technikami jonizacji są jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI - atmospheric pressure chemical ionization) [34, 47, 63] oraz jonizacja poprzez elektrorozpylanie (ESI- electrospray ionization) [2, 13, 23, 27, 28, 37, 45]. Jonizacja typu ESI charakteryzuje się wysoką wydajnością oraz należy do tak zwanych „miękkich” technik jonizacji, gdzie fragmentacja jonów jest niewielka. Pozwala to na określenie jonu pseudocząsteczkowego analizowanego związku, czyli wyznaczenie jego masy cząsteczkowej. Należy jednak pamiętać, że nie jest to wystarczająca informacja do ustalenia pełnej struktury chemicznej identyfikowanego związku. Metoda ESI, w odróżnieniu od innych metod jonizacji, nadaje się do analizy związków niestabilnych termicznie oraz związków o dużych masach cząsteczkowych. Obie metody, ESI jak i APCI dostosowane są zarówno do pracy w trybie jonizacji ujemnej i dodatniej. Do identyfikacji barwników z grupy antrachinonów i flawonoidów wykorzystywana jest głównie jonizacja w trybie tworzenia jonów ujemnych [2, 11, 13, 17, 21, 27, 28, 38, 45], rzadziej stosowana jest jonizacja w trybie tworzenia jonów dodatnich [11, 16, 21, 28, 43]. Z kolei do identyfikacji barwników indygooidowych, ze względu na ich strukturę chemiczną, stosowana jest głównie jonizacja w trybie dodatnim [11, 15-17], a rzadziej w trybie ujemnym [16, 17].

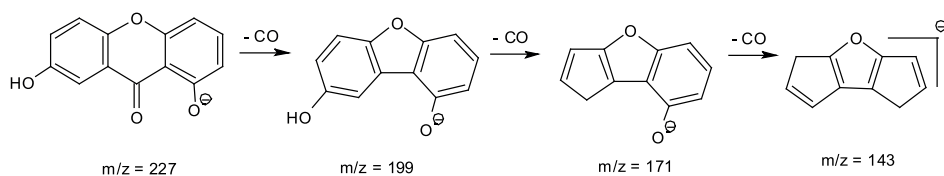
W zależności od potrzeb oraz możliwości zespołów badawczych stosowane są różnego typu analizatory mas. Jednym z nich jest pojedynczy analizator kwadrupolowy (Q). Analizator ten może pracować w trybie skanowania lub filtrowania (obserwacji wybranych jonów). Tryb skanowania w pełnym zakresie m/z widma stosowany jest w analizie jakościowej nieznanymi substancjami barwiącymi [25, 38, 45]. Zapewnia on możliwość monitorowania wszystkich tworzących się jonów. Niestety,

charakteryzuje się również relatywnie niską czułością i niską szybkością skanowania. W przypadku, gdy przypuszcza się, jakie substancje barwiące znajdują się w badanej próbce zastosować można tryb pracy SIM (selected ion monitoring), będący najbardziej selektywnym trybem pracy pojedynczego analizatora kwadru-polowego. Bardziej miarodajnym narzędziem badawczym, dostarczającym dokładniejszych informacji o strukturze chemicznej identyfikowanej substancji barwiącej jest tandemowa spektrometria mas (MS/MS lub MSⁿ). Technika ta umożliwia ustalić przypuszczalną strukturę chemiczną związku na podstawie nie tylko jonów pseudocząsteczkowych, ale i fragmentacyjnych. Jednym z analizatorów stosowanych w tandemowej spektrometrii mas jest analizator typu potrójny kwadru-pol [28, 29]. Analizator ten może działać w kilku trybach pracy, spośród których MRM (multiple reaction monitoring) jest najczęściej stosowany ze względu na wysoką czułość i selektywność. Porównanie czułości trybów pracy SIM, SCAN (Scan Monitoring) oraz MRM (w obu trybach tworzenia jonów pozytywnym i negatywnym) na podstawie otrzymanych wartości stosunku sygnału do szumu S/N dokładnie przeanalizowana została w pracy I. Surowiec i in. [28]. Wykazano, że praca w trybie SIM z jonizacją w trybie ujemnym jest najbardziej czułą metodą pracy analizatora mas i zarazem wystarczająco selektywną w identyfikacji substancji barwnych z grupy antrachinonów oraz flawonoidów. Innymi analizatorami dostarczającym widma MSⁿ badanych związków są pułapka jonowa (IT) oraz analizator kwadru-polowy sprzężony z analizatorem czasu przelotu (Q-TOF), również stosowane w analizie substancji barwiących [2, 23, 26, 27].

7. CHARAKTERYSTYCZNE DROGI FRAGMENTACJI WYBRANYCH GRUP SUBSTANCJI BARWIĄCYCH

Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas pozwala określić strukturę chemiczną związku w oparciu o jony pseudocząsteczkowe i powstające z prekursora jony fragmentacyjne. Poszczególne grupy substancji barwiących charakteryzują się przy tym specyficznymi ścieżkami fragmentacji.

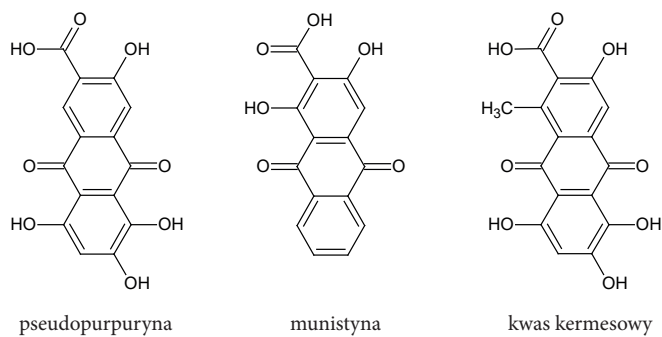
Antrachinony łatwiej ulegają jonizacji w trybie tworzenia jonów ujemnych. Główną ścieżką ich fragmentacji jest reakcja dekarbonylacji (Rys. 1), a więc utrata ugrupowania CO (28 Da), co skutkuje tworzeniem się jonu $[M-H-CO]^-$. Kolejne procesy dekarbonylacji dają odpowiednio jony fragmentacyjne $[M-H-2CO]^-$ i $[M-H-3CO]^-$ itd. [2].



Rysunek 1. Ścieżka fragmentacji euksantonu w jonizacji ujemnej

Figure 1. The fragmentation pathway of euxanthone in negative ionization mode

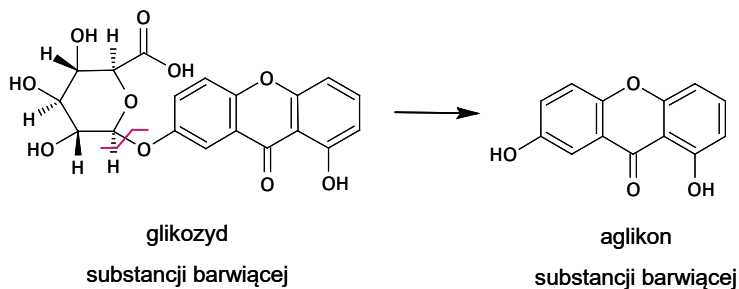
W przypadku antrachinonów zawierających grupy karboksylowe, np. pseudopurpuryna, munistyna, i kwas kermesowy (Rys. 2) następuje najpierw ich dekarboksylacja ($-\text{CO}_2$) (44 Da), obserwujemy wówczas jon $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$.



Rysunek 2. Struktury chemiczne pseudopurpuryny, munistyny i kwasu kermesowego

Figure 2. Chemical structures of pseudopurpurin, munjistin and kermesic acid

Zarówno w jonizacji ujemnej jak i dodatniej zaobserwowano, że aglikony antrachinonów fragmentują również poprzez utratę cząsteczki wody H_2O oraz utratę obojętnej cząsteczki karbenu ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$) w jonizacji pozytywnej [28]. Fragmentacja O-glikozydów antrachinonów (Rys. 3) polega natomiast na utracie jednej bądź więcej jednostek cukrowych.



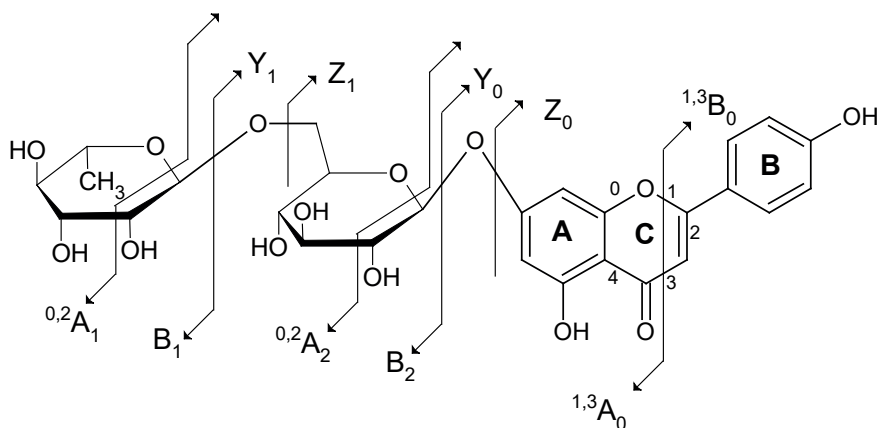
Rysunek 3. Ścieżka fragmentacji O-glikozydu antrachinonu (kwasu euksantynowego)

Figure 3. The fragmentation pathway of anthraquinone O-glycoside (euxanthic acid)

Z kolei w przypadku fragmentacji C-glikozydów antrachinonów nie obserwuje się rozerwania wiązania glikozydowego [12]. Dzieje się tak, ponieważ wiązanie węgiel-węgiel jest znacznie silniejsze niż węgiel-tlen. Fragmentacja C-glikozydów antrachinonów przebiega przede wszystkim poprzez rozerwanie wiązań w pierścieniu jednostki cukrowej [17, 29].

Fragmentacja jonów pseudocząsteczkowych flawonoidów jest lepiej poznana i bardziej szczegółowo opisana w literaturze [64–66] niż w przypadku związków antrachinonowych czy indygooidowych. Badania przeprowadzone przez M. Trojanowicza i in. wykazały, że intensywności jonów pseudocząsteczkowych flawonoidów w dodatniej jonizacji ESI są niemal czterokrotnie wyższe niż w jonizacji ujemnej. Niemniej jednak przyjęto, że jonizacja w trybie ujemnym zapewnia mniejszy wpływ tła oraz ogranicza tworzenie się różnego typu adduktów [34].

Najbardziej charakterystycznymi drogami fragmentacji cząsteczek flawonoidów są te, które następują z rozerwaniem dwóch wiązań węgiel-węgiel w pierścieniu C aglikonu flawonoidu (Rys. 4). Większość z nich biegnie według mechanizmu reakcji *retro* Diels-Aldera. Tworzące się jony ^{ij}A i ^{ij}B stanowią źródło informacji o ilości i rodzaju podstawników występujących w obu pierścieniach A i B. Indeksy górne i oraz j określają wiązanie w pierścieniu C, które uległo rozerwaniu w wyniku fragmentacji [64, 66]. W przypadku jonizacji w trybie tworzenia jonów dodatnich pierścień C może ulec rozpadowi w pozycjach 1/3, 0/2, 0/3, 0/4 oraz 1/4. Ścieżka fragmentacji zależy przy tym od rodzaju flawonoidu. Przykładowo, flawonole w porównaniu do flawonów charakteryzują się większą ilością możliwych fragmentacji. Typowe jony powstające w trakcie fragmentacji flawonoli to : $^{0,2}A^+$, $^{0,2}A^+ - CO$, $^{1,4}A^+ + ^2H$, $^{1,3}B^+ - ^2H$, podczas, gdy w przypadku flawonów są to $^{1,3}B^+$, $^{0,4}B^+$, $^{0,4}B^+ - H_2O$. Jon $^{1,3}A^+$ jest natomiast charakterystyczny dla wszystkich grup flawonoidów.



Rysunek 4. Struktura glikozydu flawonoidu wraz z oznaczeniami wykorzystywanymi do określania ścieżek fragmentacyjnych [64, 66, 67]

Figure 4. The structure of the flavonoid glycoside with markings used to determine the fragmentation pathway [64, 66, 67]

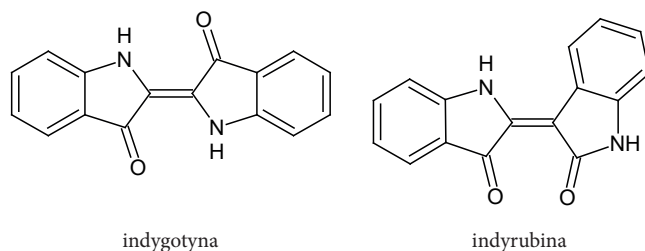
Wartość energii kolizji w fragmentacji przez zderzenia (ang. *Collision – Induced Dissociation*, CID) w trybie tworzenia jonów dodatnich ma znaczący wpływ na rodzaj tworzących się jonów fragmentacyjnych. Dla flawonoidów szereg autorów [64, 66, 68] uznało energię kolizji o wartości 30 eV za najbardziej optymalną, pozwalającą obserwować charakterystyczne jony fragmentacyjne. Często monitorowaną fragmentacją flawonoidów jest utrata małych cząsteczek lub rodników z jonów prekursora $[M + H]^+$. Najczęściej obserwowana jest utrata cząsteczek o masach: 28 Da (CO), 18 Da (H_2O) i 42 Da (C_2H_2O), która pomocna jest w potwierdzeniu obecności specyficznych grup funkcyjnych w identyfikowanym związku. Przykładowo, utrata rodnika metylowego (15 Da) z jonu prekursora $[M + H]^+$, powoduje tworzenie się kationorodnika $[M + H - CH_3]^+$, którego sygnał często dominuje w całym widmie potwierdzając tym samym obecność grupy metoksylowej. To dość rzadkie dla jonizacji ESI przejście z jonów parzystoelektronowych do jonów nieparzystoelektronowych jest jednak charakterystyczne dla eterów fenylometylowych [64, 66, 68].

W przypadku analizy flawonoidów z zastosowaniem jonizacji w trybie tworzenia jonów ujemnych otrzymuje się widma trudniejsze do interpretacji niż w przypadku jonizacji w trybie dodatnim [66]. Niemniej jednak tryb tworzenia jonów ujemnych jest bardziej czuły w analizie tej grupy substancji barwiących [69, 70]. Rozerwanie pierścienia C w obrębie cząsteczki flawonoidu zachodzi według mechanizmu *retro* Dielsa-Aldera i prowadzi do powstania jonów $^{i,j}A^-$, $^{i,j}B^-$, które dostarczają informacji o ilości i rodzaju grup funkcyjnych znajdujących się w pierścieniu A i B flawonoidu. Głównym jonem fragmentacyjnym powstającym podczas pracy w trybie tworzenia jonów ujemnych jest najczęściej jon $^{1,3}A^-$, natomiast dla izoflawonów charakterystyczny jest jon $^{0,3}B^-$ [71]. Przy jonizacji ujemnej obserwuje się również utratę małych cząsteczek np. CO_2 (– 44 Da), CO (– 28 Da), C_2H_2O (– 42 Da). Ponadto, można odróżnić flawonoidy podstawione w pierścieniu B od ich niepodstawionych pochodnych (analogów). Flawonoidy zawierające w pierścieniu B grupy hydroksylowe ulegają bowiem fragmentacji tworząc jony $[^{1,2}A - H]^-$ i $[^{1,2}B + H]^-$, podczas gdy dla flawonoidów niepodstawionych w pierścieniu B wymagana jest większa energia kolizji, co z kolei prowadzi do powstawania większej ilości jonów fragmentacyjnych [64, 70]. W niektórych sytuacjach może nawet dojść do rozerwania wiązania pomiędzy pierścieniem B i C flawonoidu. W przypadku flawonoidów zawierających podstawniki metylowe obserwuje się w jonizacji dodatniej utratę rodnika metylowego (15 Da), w wyniku czego na widmie pojawia się sygnał anionorodnika $[M - H - CH_3]^-$ [63, 70].

Pochodne flawonoidów zawierające reszty cukrowe mogą ulegać fragmentacji z rozerwaniem wiązań glikozydowych lub wiązań w obrębie cząsteczki cukru. Możliwe drogi rozpadu tej grupy substancji barwiących przedstawiono na Rysunku 1. Jony fragmentacyjne pochodzące od cząsteczki aglikonu oznaczone są jako $^{k,l}X_j$, Y_j i Z_j , gdzie dolny index j oznacza miejsce wiązania glikozydowe, które uległo rozerwaniu. Indeksy górne k i l oznaczają natomiast miejsce wiązania w cząsteczce cukru, które uległo rozpadowi. Wiązanie glikozydowe wiążące jednostkę cukrową

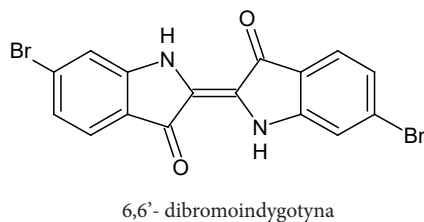
z aglikonem oznaczone jest numerem 0 (index j). Tworzą się również jony typu ${}^{k,l}A_p$, B_i i C_p , w których ładunek zachowany jest na reszcie cukrowej. Dolny index i (≥ 1) oznacza numer wiązania glikozydowego, które zostało zerwane licząc od ostatniej jednostki cukrowej w cząsteczce [64].

Substancje barwiące należące do indygooidów łatwiej ulegają jonizacji i fragmentacji w trybie tworzenia jonów dodatnich. Na widmach mas tego typu związków widoczne są głównie sygnały pochodzące od jonu macierzystego $[M + H]^+$ [57]. Indygotyna i indyrybina (Rys. 5) posiadające takie same masy cząsteczkowe rozróżniane są na podstawie czasów retencji, ich widm UV-vis oraz jonów fragmentacyjnych.



Rysunek 5. Struktura chemiczna indygotyny i indyrybiny
 Figure 5. Chemical structure of indigotin and indirubin

Zarówno na widmie mas indygotyny jak i indyrybiny pojawiają się sygnały pochodzące od jonów $[M + H]^+$, $[MH - CO]^+$, $[MH - CONH_2]^+$ i $[MH - CO - HCO]^+$, podczas gdy na widmie mas indygotyny obserwuje się dodatkowo sygnał o masie 132 Da, pochodzący od dwukrotnie naładowanego jonu pseudocząsteczkowego $[M + 2H]^{2+}$ (jon ten nie jest obserwowany w innych związkach indygooidowych). W przypadku 6,6'-dibromoindygotyny (Rys. 6) obserwuje się sygnał pochodzący od jonu pseudocząsteczkowego $[M + H]^+$ wraz z pikami izotopowymi charakterystycznymi dla atomów bromu odpowiednio o masach: 419, 421, 423 Da oraz pik o masie 205 Da pochodzący od jonu fragmentacyjnego $[M + H - 2Br - 2CO]^+$ [15].



Rysunek 6. Struktura chemiczna 6,6'-dibromoindygotyny
 Figure 6. Chemical structure of 6,6'-dibromoindigotin

8. METODY IZOLACJI SUBSTANCJI BARWIĄCYCH Z WŁÓKIEN I ZE SPOIW MALARSKICH

W celu identyfikacji naturalnych barwników obecnych w tekstyliach i farbach artystycznych należy je uprzednio wyizolować z matrycy. Stosowane są w tym celu metody ekstrakcji z użyciem różnorodnych ekstrahentów i procesów wspomagających. Podczas doboru odpowiedniej metodyki pod uwagę brany jest fakt, że substancje te są w większości barwnikami zaprawowymi. W farbach malarskich występują w postaci laków (kompleksów metal – organiczna substancja barwiąca, osadzonych na nośnikach nieorganicznych). W przypadku tekstyliów mamy do czynienia z kompleksami: substancja barwiąca – metal – włókno. Metody ekstrakcji podzielić można na łagodne, a więc niepowodujące zmian pierwotnej struktury izolowanych związków, oraz na metody agresywne, które powodują chemiczne zmiany w obrębie struktury substancji barwiących, w wyniku reakcji barwnika z użytymi odczynnikami. Stosowanymi ekstrahentami są najczęściej mieszaniny składające się z rozpuszczalników organicznych, wody oraz kwasów lub odczynników kompleksujących jony metali, zmieszanych w różnych proporcjach. Kwasy oraz odczynniki kompleksujące mają na celu rozerwanie wiązań pomiędzy metalem pochodzącym od zastosowanej zaprawy a substancją barwiącą. W przypadku izolacji barwników z grupy antrachinonów oraz flawonoidów najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami organicznymi są mieszaniny metanolu i wody [25, 27, 28, 37] oraz acetonitrylu i metanolu [72, 73]. Natomiast do ekstrakcji niepolarnych substancji barwiących np. indygotyny, indyrybiny (indygo) stosuje się dimetyloformamid (DMF) [18, 45, 73], pirydynę [20], tetrahydrofuran [55] oraz dimetylosulfotlenek (DMSO) [15, 25, 45]. Ze względu na to, że indygo jest barwnikiem kadziowym, a nie zaprawowym, dodatek kwasów lub odczynników kompleksujących nie jest konieczny, a wręcz może mieć negatywny wpływ na stan zachowania barwnika powodując jego degradację [45].

Uzyskane ekstrakty zawierające substancje barwiące odparowywane są następnie do sucha, a pozostałość rozpuszczana jest najczęściej w mieszaninie MeOH/H₂O [18, 25, 28, 74], samym metanolu [12], bądź też w DMSO [38] lub DMF [27, 32, 33, 60, 75]. DMSO i DMF są coraz szerzej stosowane, ze względu na lepszą rozpuszczalność mniej polarnych substancji barwiących.

Pierwotna metoda ekstrakcji polegała na zastosowaniu 3 M wodnego roztworu kwasu solnego (HCl) w mieszaninie z metanolem [74, 76]. Niestety, w procesie ekstrakcji związków zawierających grupy karboksylowe (np. pseudopurpuryna, munityna) zaobserwowano uboczne skutki stosowania tego kwasu. Kwas solny w metanolu powoduje dekarboksylację [43, 74], estryfikację grup karboksylowych [77] lub metylowanie grup hydroksylowych [78], co uniemożliwia prawidłową identyfikację oryginalnych składników badanych barwników. Co więcej, powoduje on również rozerwanie wiązań glikozydowych, a więc pozwala jedynie na identyfikację samych aglikonów [28]. Podobne niekorzystne działania wykazuje kwas siarkowy(VI) (H₂SO₄) [79]. W związku z efektami ubocznymi towarzyszącymi przy stosowaniu

silnych kwasów mineralnych poszukiwane były łagodniejsze metody, niepowodujące destrukcji analizowanych substancji barwiących. Badano wpływ wodno-metanolowych roztworów kwasów: mrówkowego (HCOOH) [17, 28, 73], cytrynowego [25], szczawiowego [25, 73, 78], trifluorooctowego (TFA) [25], fluorowodorowego [35, 36, 78], kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) [28] i soli tego kwasu Na_2EDTA [73], oraz mieszaniny HCOOH/EDTA [25], metanolowego roztworu trifluorku boru [39] i pirydyny [73] na efektywność ekstrakcji i stan zachowania substancji barwiących. Odczynniki te stosowane były przede wszystkim do ekstrakcji związków z grupy antrachinonów i flawonoidów. Podczas ekstrakcji z użyciem kwasów cytrynowego, szczawiowego, TFA, HCl oraz mieszaniny EDTA-HCOOH zaobserwowano różnice w efektywności ekstrakcji antrachinonów, flawonoidów i ich glikozydów, kurkuminoidów oraz indygooidów [25]. Niemniej jednak nie udało się opracować uniwersalnej metody izolacji, która byłaby efektywna w stosunku do wszystkich grup substancji barwiących. Stwierdzono, że za wyjątkiem kwasu solnego, wszystkie sposoby okazały się być odpowiednie do ekstrakcji glikozydów flawonoidów i kurkuminoidów. Natomiast użycie do ekstrakcji HCl, podobnie jak mieszaniny HCOOH/EDTA oraz TFA dało najlepszą efektywność podczas izolacji flawonoidów oraz antrachinonów. Z kolei kwas cytrynowy i szczawiowy wykazały umiarkowaną efektywność w ekstrakcji wyżej wymienionych związków.

Innym kwasem stosowanym do ekstrakcji substancji barwiących z laków jest kwas fluorowodorowy (HF) [35, 36]. Ekstrakcja z zastosowaniem 4 M wodnego roztworu tego kwasu należy do metod mniej agresywnych niż z użyciem kwasu solnego i siarkowego. Jest ona efektywna w izolacji glikozydów oraz nie powoduje zmian w strukturze badanych związków. Kwas fluorowodorowy występuje w roztworach wodnych w formie zdysocjowanej i dzięki temu doskonale kompleksuje kationy metali, w tym Al, Ba, Sn, Fe, Cr, Cu, Pb, Zn i Ca. Izolacja substancji barwiących z laku z zastosowaniem tego kwasu opiera się właśnie na reakcji ich kompleksowania. W przypadku uwalniania barwnika antrachinonowego z laku glinowego jony F^- konkurują z heteroatomami (np. atomami tlenu w cząsteczce antrachinonu) o kation glinu Al^{3+} w laku, skoordynowany z cząsteczkami substancji barwiącej. Podobnie jest w przypadku zastosowaniu EDTA, jako odczynnika kompleksującego. Tworzy się wówczas kompleks EDTA z Al^{3+} , w wyniku czego substancja barwiąca zostaje uwolniona z kompleksu z glinem. Natomiast w przypadku kwasu solnego jony H^+ konkurują z jonami Al^{3+} o heteroatomy cząsteczki substancji barwiącej (np. o atomy tlenu w cząsteczce antrachinonu) [36]. Wszystkie wymienione powyżej reakcje skutkują uwolnieniem substancji barwiącej z laku. Należy jednak pamiętać o minusach stosowania silnych kwasów. Wadą użycia kwasu HF jest konieczność usuwania resztek niezmienionego kwasu oraz powstałych w trakcie procesu ekstrakcji anionów fluorkowych. Stosuje się w tym celu metodę ekstrakcji do fazy stałej SPE (np. kolumnienki wypełnione oktadecylosililowym żelem krzemionkowym C18) lub odparowuje się ekstrakt niemal do sucha [35]. Innym sposobem izolacji substancji barwiących z laków i farb, łagodniejszym od tego z zastosowaniem kwasów mineralnych, jest ekstrakcja z użyciem metanolowego roztworu trifluorku boru

(BF₃/MeOH) [39]. Niestety użycie tego odczynnika powodowało również niepożądane reakcje uboczne polegające na estryfikacji grup karboksylowych obecnych w obrębie cząsteczki substancji barwiącej.

Zaproponowano także wielostopniowe metody ekstrakcji mające na celu efektywne wyizolowanie wszystkich obecnych w próbce substancji barwiących. Jedną z tych metod ekstrakcji polegała w pierwszym etapie na użyciu kwasu mrówkowego, jako łagodnego odczynnika pozwalającego na izolację glikozydowych form substancji barwiących, a następnie w drugim etapie na zastosowaniu kwasu solnego w celu izolacji samych aglikonów tych związków [17]. Kolejny sposób mający na celu wyizolowanie zarówno polarnych, jak i niepolarnych substancji barwiących składa się również z dwóch etapów. Pierwszy polegał na tradycyjnej metodzie z zastosowaniem kwasu solnego w celu wyizolowania barwników z grupy antrachinonów i flawonoidów, natomiast w drugim etapie użyto gorącego DMF-u (80°C) w celu wyekstrahowania z pozostałości barwników indygooidowych [33].

Na efektywność procesu ekstrakcji wpływ mają nie tylko stosowane ekstrakanty, ale również procesy wspomagające izolację substancji barwiących takie jak np. podwyższona temperatura, czy sonifikacja (fale ultradźwiękowe). Temperatura ma istotny wpływ na podwyższenie efektywności procesu ekstrakcji. Przykładowo, prowadzenie ekstrakcji z zastosowaniem wodno-metanolowego roztworu kwasu solnego w temperaturze 100°C [18, 32, 33, 38] znacznie podwyższa wydajność izolowania związków, jednak powoduje również rozkład analizowanych substancji barwiących np. hydrolizę glikozydów do aglikonów, dekarboksylację i inne [45].

Końcowym etapem przygotowania próbek do analizy jest oczyszczanie ekstraktów ze stałych zanieczyszczeń. W tym celu stosuje się filtrację przy użyciu propylenowych filtrów [28] lub odwirowywanie, a następnie ich dekantację [27, 38, 45].

9. ZASTOSOWANIE TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH I SPEKTRALNYCH W ANALIZIE BARWNIKÓW POBRANYCH Z OBIEKTÓW MUZEALNYCH

Identyfikacja barwników stosowanych do barwienia tkanin czy też otrzymania laków pozwala na określenie stosowalności barwników w danych okresach dziejowych oraz określenie ram chronologicznych wprowadzania lub wycofywania danych barwidła, a także do wykrywania fałszerstw. Do identyfikacji organicznych substancji barwiących najczęściej wykorzystywana jest chromatografia cieczowa z detektorem diodowym i/lub z spektrometrem mas. Badania z wykorzystaniem HPLC do badania składu substancji barwiących w surowcach naturalnych oraz obiektach dziedzictwa kulturowego przeprowadził po raz pierwszy Wouters [74] w 1985 roku. Badania te dotyczyły izolacji i identyfikacji antrachinonów będących substancjami barwiącymi pozyskiwanymi z roślin marzanny barwierskiej i owadów (kermes i koszenila) oraz z tekstyliów (współczesnych i XV-wiecznych) barwionych tymi substancjami. W swojej pracy przedstawił metodę ekstrakcji

z zastosowaniem wodno-metanolowego roztworu kwasu solnego jako odczynnika ułatwiającego izolację substancji barwiących z tkanin. Opisał on również niekorzystne hydrolizujące działanie kwasu w stosunku do substancji niestabilnych w środowisku silnych kwasów. Wouters z czasem rozwijał swoje badania w tematyce izolacji i identyfikacji barwników naturalnych [80–82]. W jednej z prac przedstawia wyniki jakościowej analizy HPLC-DAD substancji barwiących z egipskich tkanin pochodzących z II tysiąclecia p.n.e. [83]. W próbie tkaniny o kolorze fioletoworóżowym zidentyfikował alizarynę i purpurynę pochodzące z marzanny barwierskiej *Rubia tinctorum*, a w tkaninie o kolorze czerwonym oprócz alizaryny i purpuryny zidentyfikował kwas elagowy należący do tanin. W późniejszych latach pojawiają się prace skupiające się na porównaniu wyników badań większej liczby obiektów. Przykładowo w pracy I. Surowiec i in. [18] przedstawiono wyniki analiz dotyczące aż 36 próbek tkanin pobranych z historycznych szkockich szat pochodzących najprawdopodobniej z XVI lub XVII wieku. W próbkach zidentyfikowano alizarynę, purpurynę, indygotynę oraz luteolinę i apigeninę. Autorka porównuje również tradycyjną metodę ekstrakcji z kwasem solnym ze zmodyfikowaną metodą z użyciem dodatkowo dimetyloformamidu (DMF), który miał zwiększyć wydajność ekstrakcji substancji barwiących, w szczególności barwników indygooidowych. Wraz z rozwojem techniki zaczęto wykorzystywać spektrometry mas jako detektory substancji rozdzielonych na kolumnie chromatograficznej, co pozwoliło na pewniejszą identyfikację substancji barwiących na podstawie otrzymanych widm mas.

Pomocne w identyfikacji substancji barwiących są również próbki referencyjne w postaci ekstraktów z surowców barwierskich. Przykładowo, Karapanagiotis i współpracownicy [28] w ekstrakcie pochodzącym z koszenili wyizolował sześć nieznanych dotąd substancji barwiących. Budowę chemiczną tych związków określono przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometrii mas (MS). Zidentyfikowane związki okazały się pochodnymi kwasu karminowego, flawokermesowego i kermesowego. W analizie historycznych próbek pobranych z XVI wiecznej ikony z kolekcji Muzeum Benaki oraz próbki jedwabiu z tekstyliów religijnych pochodzących z okresu między XVIII a XIX wiekiem udało się określić budowę chemiczną czterech nowo zidentyfikowanych związków. Identyfikacji dokonano na podstawie analizy LC-DAD porównując otrzymane widma UV-vis z widmami wcześniej otrzymanymi podczas identyfikacji związków z ekstraktu z koszenili. W celu uzyskania odpowiedniego koloru tkaniny bądź laku często stosowano mieszaniny ekstraktów pochodzących z różnych źródeł, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. W pracach dotyczących analizy składu substancji barwiących w różnego rodzaju artefaktach zidentyfikowano mieszaniny związków pochodzące z różnych surowców barwierskich. Inne przykłady zidentyfikowanych substancji barwiących w obiektach historycznych podane są poniżej w Tabeli 3.

Tabela 3. Substancje barwiące zidentyfikowane w obiektach historycznych
Table 3. Dyestuffs identified in the historical objects

Kolekcja	Wiek obiektu	Kolor	Substancje barwiące	Surowiec naturalny	Lit.
Muzeum Benaki w Atenach (dwany sztuki Islamu)	VIII-XI wiek	zielony	indygotylna, indyrybina luteolina	urzet/indygo rezeda	[32]
		niebieski	indygotylna, indyrybina	urzet/indygo rezeda	
		żółty	luteolina, apigenina, chryzoeriol	urzet/indygo rezeda	
		brąz	brąz indygotyna, indyrybina luteolina	urzet/indygo rezeda	
		beż	alizaryna, purpuryna luteolina	urzet/indygo rezeda	
		czerwień	kwas laktainowy A i inne kwasy laktainowe	„Lac dye”	
		czerwień	purpuryna, alizaryna	marzana barwierska	
		zieleń	luteolina, apigenina, genisteina, chryzoeriol indygotylna	janowiec barwierski	
		zieleń	luteolina, apigenina, chryzoeriol indygotylna	rezeda indygo	
		zieleń	luteolina, apigenina, chryzoeriol indygotylna kwas elagowy fizetyna, sulfuretyna	rezeda indygo - „Young fustic”	
Tekstyliia rumuńskie z Rumuńskiego Narodowego Muzeum Sztuki	XVII-XVIII wiek	khaki	datiscetyna luteolina, apigenina, genisteina, chryzoeriol kemferol, izorametyna, emodyna indygotylna	drzewo Datisca cannabina janowiec barwierski rabarbar indygo	[27]
		żółcień	luteolina, apigenina, genisteina, chryzoeriol kwas elagowy kwercetyna fizetyna, sulfuretyna	janowiec barwierski - - „Young fustic”	

Tabela 3.
Table 3.

Ciąg dalszy
Continuation

Kolekcja	Wiek obiektu	Kolor	Substancje barwiące	Surowiec naturalny	Lit.
Sztuki Muzeum Narodowe	XVII-XVIII wiek	żółto-różowy	kwercetyna, kemferol, ramnetyna, ramnazyna kwas elagowy brazylina, brazyleina	jagoda z rodziny Rhamnus roślina produkująca taniny „Redwood” „Young fustic” - „Redwood”	[27]
		żółto-różowy	fizetyna, sulfuretyna kwas elagowy brazylina, brazyleina	janowiec barwierski „Redwood”	
		różowo-żółty	luteolina, genisteina, apigenina brazylina, brazyleina	koszenila amerykańska „Redwood” roślina produkująca taniny	
		różowy	kwas karminowy, kermesowy, flawokermesowy brazylina, brazyleina kwas elagowy	rezeda	
		brąz	luteolina, apigenina	- „Young fustic” -	
		pomarańcz	kwas elagowy fisetyna, sulfuretyna kemferol	marzanna barwierska	
		czerwień	alizaryna, purpuryna, ksantopurpuryna, rubiadyna, munistyna anthragalol	marzanna barwierska	
		czerwień	purpuryna, alizaryna, rubiadyna 2 nieznanne związki obecne w „Redwood” kwas kermesowy, flawokermesowy	marzanna barwierska „Redwood” kermes	
		czerwień	kwas karminowy, kermesowy, flawokermesowy dwa niezidentyfikowane związki: dcIV, dcVII	koszenila	
		czerwień	kwas kermesowy, flawokermesowy	kermes	
Ikony pochodzące ze szkoły kretańskiej	XV-XVII wiek	czerwień	purpuryna, alizaryna, rubiadyna 2 nieznanne związki obecne w „Redwood” kwas kermesowy, flawokermesowy	marzanna barwierska „Redwood” kermes	[37]
Ikony pochodzące ze szkoły kretańskiej	XV-XVII wiek	czerwień	kwas karminowy, kermesowy, flawokermesowy dwa niezidentyfikowane związki: dcIV, dcVII	koszenila	[37]
Ikony pochodzące ze szkoły kretańskiej	XV-XVII wiek	czerwień	kwas kermesowy, flawokermesowy	kermes	[37]

Tabela 3.
Table 3.

Ciąg dalszy
Continuation

Kolekcja	Wiek obiektu	Kolor	Substancje barwiące	Surowiec naturalny	Lit.
Ornaty pochodzące z Katedry na Wawelu	XV wiek	czerwień	kwas karminowy, kermesowy, flawokermesowy, trzy niezidentyfikowane związki: dcIV, dcVII, dcII kwas elagowy	koszenila (prawdopodobnie polska)	[16]
		fiolet	kwas karminowy, kermesowy, flawokermesowy indygotyna, izatyna	koszenila indygo/ urzet	
		zieleń	indygotyna luteolina, apigenina, glikozyd luteoliny, glikozyd apigeniny	indygo/ urzet rezeda	

UWAGI KOŃCOWE

Identyfikacja naturalnych barwników organicznych pochodzących z obiektów dziedzictwa kulturowego dostarcza ważnych informacji dla szerokiego grona specjalistów, w tym historyków oraz konserwatorów sztuki. Naturalne barwniki organiczne to skomplikowane mieszaniny substancji barwiących należących do różnych klas związków. Izolacja substancji barwiących z badanego materiału (farby, tkaniny) a następnie ich rozdzielanie na pojedyncze składniki to proces skomplikowany i pracochłonny. Znaczna część przytoczonych doniesień literaturowych wskazuje, że najczęściej stosowaną metodą rozdzielania substancji barwiących jest przede wszystkim chromatografia cieczowa. Do identyfikacji barwników wykorzystywane jest głównie spektrometria mas w połączeniu z detekcją UV, dostarczającymi informacji odpowiednio w postaci widm mas oraz widm UV-Vis. Zaproponowane metody ekstrakcji substancji barwnych oraz próby optymalizacji rozdzielania chromatograficznego i detekcji substancji barwiących prowadzone na przestrzeni ostatnich lat przez wiele grup badawczych stanowią kompendium wiedzy nie tylko dla historyków sztuki, muzealników czy ekspertów zajmujących się badaniem autentyczności obrazów, ale również dostarczą cennych informacji przydatnych innym dziedzinom nauki, w tym chemii konserwatorskiej, chemii związków naturalnych, czy inżynierii materiałowej [57, 84-86]. Podkreślić przy tym należy, że analiza historycznych naturalnych barwników organicznych nadal pozostaje wyzwaniem dla chemików, chociażby ze względu na potrzebę poznania produktów degradacji substancji barwiących powstałych w trakcie starzenia się barwników, o których jak dotąd mało pisze się w literaturze.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, projekt badawczy Preludium nr 2015/17/N/HS2/03310.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.R. Barnett, S. Miller, E. Pearce, *Opt. Laser Technol.*, 2006, **38**, 445.
- [2] L. Rafaely, S. Heron, W. Nowak, A. Tchapla, *Dyes Pigm.*, 2008, **77**, 191.
- [3] Norma PN-EN ISO 4618:2007
- [4] K. Kacprzak, *Kolorowy świat barwników organicznych*, Wydział Chemii UAM, [dostęp: 2015-04-22], dostępny w Internecie: <http://www.poczujchemie.amu.edu.pl/zalaczniki/chemia/barwniki2.0.pdf>
- [5] B.I. Stiepanow, *Podstawy chemii technologii barwników organicznych*, WNT, Warszawa, 1980.
- [6] Introduction to the Colour Index [dostęp: 2015-04-22] dostępny w Internecie: <http://colour-index.com/introduction-to-the-colour-index>
- [7] J.A. Kiernan, *Biotech. Histochem.*, 2001, **76**, 261.
- [8] P.S. Vancar, *Resonance*, 2000, **5**, 73.

- [9] Lake pigment, [dostęp: 2016-04-19], dostępny w Internecie: https://en.wikipedia.org/wiki/Lake_pigment
- [10] J.H. Hofenk de Graaff, *The Colourful Past: Orgins, Chemistry and Identyfication of Natural Dyestuffs*, Archetype Publications, 2004.
- [11] A. Manhita, L. Balcaen, F. Vanhaecke, T. Ferreira, A. Candeias, C. Barrocas Dias, J. Cult. Herit. 2014, **15**, 292.
- [12] P. Buzzinia, E. Suzukib, J. Raman Spectrosc., 2016, **47**, 16.
- [13] L. Valianou, K. Stathopoulou, I. Karapanagiotis, P. Magiatis, E. Pavlidou, A. L. Skaltsounis, Y. Chryssoulakis, Anal. Bioanal. Chem., 2009, **394**, 871.
- [14] M. Wachowiak, G. Trykowski, M. Śliwka-Kaszyńska, O. Otłowska, Materiały konferencyjne: Analiza Chemiczna w Ochronie Zabytków XV, 2015, 38.
- [15] M. Puchalska, K. Połec-Pawlak, I. Zadrozna, H. Hryszko, M. Jarosz, J. Mass Spectrom. 2004, **39**, 1441.
- [16] K. Pawlak, M. Puchalska, A. Miszczak, E. Rosloniec, M. Jarosz, J. Mass Spectrom. 2006, **41**, 613.
- [17] K. Lech, M. Jarosz, Anal. Bioanal. Chem., 2011, **399**, 3241.
- [18] I. Surowiec, A. Quye, M. Trojanowicz, J. Chromatogr A, 2006, **1112**, 209.
- [19] J. Liu, C. Mouri, R. Laursen, F. Zhao, Y. Zhou, W. Li, J. Archaeol. Sci. 2013, **40**, 4444.
- [20] J. Orska-Gawrys, I. Surowiec, J. Kehl, H. Rejniak, K. Urbaniak-Walczak, M. Trojanowicz, J. Chromatogr. A, 2003, **989**, 239.
- [21] X. Zhang, R. Laursen, Int. J. Mass Spectrom., 2009, **284**, 108.
- [22] G.G. Balakina, V.G. Vasiliev, E.V. Karpova, V.I. Mamatyuk, Dyes Pigm. 2006, **71**, 54.
- [23] R. Marques, M.M. Sousa, M.C. Oliveira, M.J. Melo, J. Chromatogr. A, 2009, **1216**, 1395.
- [24] I.V. Berghe, M. Gleba, U. Mannering, J. Archaeol. Sci. 2009, **36**, 1910.
- [25] L. Valianou, I. Karapanagiotis, Y. Chryssoulakis, Anal. Bioanal. Chem. 2009, **395**, 2175.
- [26] I. Petroviciu, F. Albu, A. Medvedovici, Microchem. J. 2010, **95**, 247.
- [27] I. Petroviciu, I.V. Berghe, I. Cretu, F. Albu, A. Medvedovici, J. Cult. Herit. 2012, **13**, 89.
- [28] I. Surowiec, B. Szostek, M. Trojanowicz, J. Sep. Sci. 2007, **30**, 2070.
- [29] K. Lech, K. Wiktoś, B. Wileńska, M. Jarosz, Anal. Bioanal. Chem. 2015, **407**, 855.
- [30] C. Mouri, A. Aali, X. Zhang, R. Laursen, Herit. Sci. 2014, **20**, 1.
- [31] O. Abdel-Kareem, M. A. Alawi, M. S. Mubarak, RJTA, 2011, **15**, 84.
- [32] I. Karapanagiotis, J. Theologou, A. Lakka, A. Ozoline, C. Panayiotou, Archeometry, 2011, **53**, 587.
- [33] I. Karapanagiotis, A. Lakka, L. Valianou, Y. Chryssoulakis, Microchim. Acta, 2008, **160**, 477.
- [34] B. Szostek, J. Orska-Gawrys, I. Surowiec, M. Trojanowicz, J. Chromatogr. A, 2003, **1012**, 179.
- [35] J. Sanyova, Microchim. Acta, 2008, **162**, 361.
- [36] J. Sanyova, J. Reisse, J. Cult. Herit. 2006, **7**, 229.
- [37] I. Karapanagiotis, L. Valianou, S. Daniilia, Y. Chryssoulakis, J. Cult. Herit. 2007, **8**, 294.
- [38] I. Karapanagiotis, E. Minopoulou, L. Valianou, S. Daniilia, Y. Chryssoulakis, Anal. Chim. Acta, 2009, **647**, 231.
- [39] J. Kirby, R. White, Nat. Gall. Tech. Bull., 1996, **17**, 56.
- [40] I. Karapanagiotis, D. Lampakis, A. Konstanta, H. Farmakalidis, J. Archaeol. Sci. 2013 **40**, 1471.
- [41] D. Cristea, I. Bureau, G. Vilarem, Dyes Pigm. 2003, **57**, 267.
- [42] C. Moiteiro, H. Gaspar, A. I. Rodrigues, J.F. Lopez, V. Carnide, J. Sep. Sci. 2008, **31**, 3683.
- [43] I. Boldizsar, Z. Szucs, Zs. Fuzfai, I. Perl, J. Chromatogr. A, 2006, **1133**, 259.
- [44] C. Clementi, G. Basconi, Pellegrino, A. Romani, Dyes Pigm. 2014, **103**, 127.
- [45] D. Mantzouris, I. Karapanagiotis, C. Panayiotou, Microchem. J. 2014, **115**, 78.
- [46] K.M. Frei, I.V. Berghe, R. Frei, U. Mannering, H. Lyngstrøm, J. Archaeol. Sci. 2010, **37**, 2136.
- [47] K. Stathopoulou, L. Valianou, A.L. Skaltsounis, I. Karapanagiotis, P. Magiatis, Anal. Chim. Acta, 2013, **804**, 264.

- [48] O. Deveoglu, E. Cakmakci, T. Taskopru, E. Torgan, R. Karadag, *Dyes Pigm.* 2012, **94**, 437.
- [49] A. Romani, C. Zuccaccia, C. Clementi, *Dyes Pigm.* 2006, **71**, 218.
- [50] U. Baumer, P. Dietemann, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, **397**, 1363.
- [51] M.P. Colombini, A. Andreotti, C. Baraldi, I. Degano, J.J. Łucejko, *Microchem. J.* 2007, **85**, 174.
- [52] M.T. Doménech-Carbó, L. Osete-Cortina, A. Doménech-Carbó, M.L. Vázquez de Agredos-Pascual, C. Vidal-Lorenzo, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2014, **105**, 355.
- [53] M. Abdel-Ghani, B. Stern, H.G.M. Edwards, R. Janaway, *Vib. Spectrosc.* 2012, **62**, 98.
- [54] M.I. Maguregui, R.M. Alonso, M. Barandiaran, R.M. Jimenez, N. Garcia, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1154**, 429.
- [55] L. Taujenis, V. Olauskaitė, *Chemija*, 2012, **23**, 210.
- [56] A. Serrano, M. van Bommel, J. Hallett, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1318**, 102.
- [57] E. Rosenberg, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, **391**, 33.
- [58] I. Surowiec, B. Szostek, M. Trojanowicz, *J. Sep. Sci.* 2007, **30**, 2070.
- [59] C. Mouri, V. Mozaffarian, X. Zhang, R. Laursen, *Dyes Pigm.* 2014, **100**, 135.
- [60] I. Surowiec, W. Nowik, M. Trojanowicz, *J. Sep. Sci.* 2004, **27**, 209.
- [61] I. Karapanagiotis, *Am Lab*, 2006, **38**, 36.
- [62] I. Karapanagiotis, V. Vilemeregul, P. Magiatis, T. Polychronopoulos, K. Vougiougiannopoulou, A. L. Skaltsounis, *J. Liq. Chromatogr.* 2006, **29**, 1491.
- [63] I. Degano, M. Biesaga, M. P. Colombini, M. Trojanowicz, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 5837.
- [64] F. Cuyckens, M. Claeys, *J. Mass Spectrom.* 2004, **39**, 1.
- [65] R. March, J. Brodbelt, *J. Mass Spectrom.* 2008, **43**, 1581.
- [66] Y.L. Ma, Q. Li, H. Van den Heuvel, M. Claeys, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1997, **11**, 1357.
- [67] B. Domon, C. Costello, *Glycoconj. J.* 1988, **5**, 397.
- [68] J.L. Wolfender, P. Waridel, K. Ndjoko, K.R. Hobby, H.J. Major, K. Hostettmann, *Analisis*, 2000, **28**, 895.
- [69] M. Careri, L. Eviri, A. Mangia, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1999, **13**, 2399.
- [70] N. Fabre, I. Rustan, E. Hoffmann, J. Q. Leclercq, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011, **12**, 707.
- [71] R.J. Hughes, T.R. Croley, C.D. Metcalfe, R.E., *Int. J. Mass Spectrom.* 2001, **210/211**, 371.
- [72] M. Bellaistre, W. Nowik, A. Tchaplá, S. Heron, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 778.
- [73] A. Manhita, T. Ferreira, A. Candeias, C. B. Dias, *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, **400**, 1501.
- [74] J. Wouters, *Stud. Conserv.* 1985, **30**, 119.
- [75] O. Deveoglu, G. Erkan, E. Torgan, R. Karadag, *Color. Technol.* 2012, **129**, 223.
- [76] B.V. Kharbade, O.P. Agrawal, *Stud. Conserv.* 1988, **33**, 1.
- [77] E.S.B. Ferreira, A. Quye, H. McNab, A.N. Hulme, *Dyes History Archaeol.* 2002, **18**, 63.
- [78] J. Wouters, C.M. Grzywacz, A. Claro, *Stud. Conserv.* 2011, **56**, 23.
- [79] H. Schweppe, *Handbuch der Naturfarbstoffe, Vorkommen, Vervendung, Nachweis, Nikol, Kunstlerpigmente auf Basis von Krapplacken*, Hamburg, 1993.
- [80] J. Wouters, A. Verhecken, *J. Soc. Dyers Colour.* 1991, **107**, 266.
- [81] J. Wouters, A. Verhecken, *Stud. Conserv.* 1989, **34**, 198.
- [82] J. Wouters, N. Rosario-Chirinos, *JAIC*, 1992, **31**, 237.
- [83] J. Wouters, L. Maes, R. Germer, *Stud. Conserv.* 1990, **35**, 89.
- [84] V. Pauk, P. Bartak, K. Lemr, *J. Sep. Sci.* 2014, **37**, 3393.
- [85] I. Degano, E. Ribechini, F. Modugno, M. P. Colombini, *Appl. Spectrosc. Rev.* 2009, **44**, 363.
- [86] J. M. Madariaga, *Anal. Methods*, 2015, **7**, 4848.

