

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA CHEMIE A DIDAKTIKY CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Analýza přírodních organických barviv a pigmentů
pomocí hmotnostní spektrometrie**

Vypracovala:

Marie Stýblová

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Ing. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní obor:

Učitelství všeobecně vzdělávacích předmětů
pro ZŠ a SŠ biologie – chemie

V Praze dne 10. dubna 2012

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze v období listopad 2010 – duben 2012.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Analýza přírodních organických barviva a pigmentů pomocí hmotnostní spektrometrie vypracovala pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 10. dubna 2012

SOUHRN

Diplomová práce s názvem „Analýza přírodních organických barviv a pigmentů pomocí hmotnostní spektrometrie“ pojednává o identifikaci vybraných přírodních organických barviv/pigmentů kvalitativní analýzou laserové desorpční-ionizační hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem (LDI-TOF MS). Výhodou metody LDI-TOF MS je její rychlá a spolehlivá identifikace nízkomolekulárních látek bez chemických a časově náročných předběžných úprav vzorků. Díky velmi nízké spotřebě vzorku může být tato metoda využita analýze uměleckých děl a také například k ověřování jejich pravosti.

V této práci byla metoda LDI-TOF MS otestována na 19ti organických barvivech a pigmentech (např. alizarin, apigenin, baicalein, flavon, xanthon, kyselina taninová), čtyřech modelově připravených lacích (alizarinový, purpurinový, chrysinový a kvercetinový) a lacích smíchaných s organickými pojivy. Metoda byla také úspěšně aplikována na dva vzorky modré barvy, které byly odebrány z obrazu od Josefa Čapka s názvem *Procházka* datovaného do roku 1936.

SUMMARY

This thesis named „Analysis of natural organic dyes and pigments by mass spectrometry“ investigates the identification of selected natural organic dyes and pigments by qualitative Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry analysis (LDI-TOF MS). The advantage of LDI-TOF MS method is its quick and reliable identification of low molecular weight material without preparatory chemical or time-consuming modification of samples. This method can be used for the analysis of works of art or for verifying their authenticity thanks to requiring only a little amount of sample.

The LDI-TOF MS was tested on 19 organic dyes and pigments (e.g. alizarin, apigenin, baicalein, flavone, xanthone, tannic acid), four exemplarily prepared lakes (alizarin, purpurin, chrysin a quercetin lakes) and lakes mixed with organic binding media. The method was also successfully applied to two samples of blue color that were taken from Josef Čapek's painting called 'Procházka' (The Walk), that was dating back to 1936.

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při tvorbě diplomové práce, především pak mé vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za její odborné vedení, cenné rady, za pomoc při vyhledávání odborné literatury, zpracování dat, korekturu textu a za čas strávený v laboratoři při vypracovávání experimentální části diplomové práce. Děkuji Ústavu biochemie a mikrobiologie na VŠCHT v Praze za ochotu, poskytnutí potřebného technického vybavení a vytvoření milého pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji také svým rodičům za umožnění studia a jejich další podporu.

OBSAH

1. ÚVOD ..	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY ..	11
2.1 Obecné pojmy ..	11
2.2 Základní vlastnosti barviv ..	13
2.2.1 Absorpce světla ..	13
2.2.2 Teorie barevnosti ..	14
2.2.2.1 Chromofor-auxochromová teorie barevnosti ..	14
2.2.2.2 Chinoidní teorie barevnosti ..	15
2.2.2.3 Teorie koordinačně nenasycených atomů ..	16
2.2.2.4 Elektronová, mezomerní a kvantová teorie barevnosti ..	16
2.2.3 Vlivy způsobující změnu barevného odstínu ..	18
2.2.3.1 Solvatochromie ..	18
2.2.3.2 Termochromie ..	18
2.2.3.3 Fotochromie ..	18
2.2.4 Stálost barviv v textiliích a hodnocení barevného odstínu barviv ..	19
2.3 Technologický rozbor malby ..	21
2.4 Přehled historického použití přírodních organických barviv a pigmentů v umělecké tvorbě ..	23
2.5 Aplikace přírodních barviv na tkaniny ..	27
2.6 Klasifikace přírodních barviv ..	29
2.6.1 Barviva rostlinného původu ..	30
2.6.2 Barviva živočišného původu ..	32
2.6.3 Chemická klasifikace přírodních barviv a vybraná přírodní barviva, resp. pigmenty ..	32
2.6.3.1 Chinoidy /anthrachinonová barviva/ ..	32
2.6.3.2 Pyranová barviva /xanthonová barviva, flavonoidy a chromony/ ..	34
2.6.3.3 Terpenoidy /karotenoidy/ ..	40
2.6.3.4 Indoly ..	41
2.6.3.5 Pyrrollová barviva ..	41
2.7 Metody identifikace organických barviv ..	43

2.7.1 Hmotnostní spektrometrie a TOF analyzátor.....	44
2.7.2 Princip LDI (Laser Desorption/Ionisation).....	48
2.7.2.1 NALDI (Nano-Assisted Laser Desorption/Ionisation) MS	49
2.7.2.2 Izotopová distribuce základních píků analyzované látky	49
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
3.1 Použité pigmenty a materiály	51
3.2 Příprava modelových vzorků	51
3.2.1 Příprava alizarinového laku /D221-1/	51
3.2.2 Příprava purpurinového laku /D222-1/	52
3.2.3 Příprava chrysinového laku /U2-1/	52
3.2.4 Příprava kvercetinového laku /U2-2/	52
3.2.5 Modelové vzorky barviv v oleji	52
3.2.6 Modelové vzorky barviv v tempeře	52
3.2.7 Příprava zlatého laku I	53
3.2.8 Příprava zlatého laku II	53
3.2.9 Šafrán s bílkem – tradiční výroba laku sloužící k iluminování	53
3.3 Odebrané vzorky uměleckého díla pro identifikaci pomocí LDI	53
3.4 Příprava vzorků a analýza pomocí LDI–TOF MS	54
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	56
4.1 Anthrachinonová barviva a pigmenty	56
4.2 Pyranová barviva a pigmenty	60
4.3 Karotenoidní barviva a pigmenty	65
4.4 Indolová a pyrrolová barviva a pigmenty	67
5. ZÁVĚR	70
6. LITERATURA	72
7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
8. PŘÍLOHY	83

1. ÚVOD

Barvy a jejich použití měly pro lidstvo velikou symboliku již od pradávna. Jakmile člověk přestal jen usilovně „bojovat o život“ v podobě shánění potravy (sběrem, lovem) či hledáním příbytků, jeho nároky a potřeby se zvětšovaly úměrně s rostoucím volným časem, který měl k dispozici. Začal si tedy například zkrášlovat tělo za použití různých barviv. Rostlinné šťávy míchal se zvířecím tukem, hlínou nebo vodou [1]. V některých kulturách zdobení vlastního těla barvami trvá až do současnosti. Například domorodí Američané v tropech Nového světa využívají oreláník barvířský (*Bixa orellana*) spolu s dalšími rostlinnými šťávami jako barvivo na ozdobu i na ochranu proti moskytům. Naproti tomu na Středním východě a Indii si především ženy rády zdobí své tělo hennou (*Lawsonia inermis*) – hnědočerveným barvivem, sloužící k barvení vlasů a k tetování [2]. Člověk si odnepaměti zkrášloval barvami také své příbytky. Vytvářel jeskynní malby (první malby údajně pochází z doby již 40 tisíc let před naším letopočtem [1]), barevně si zdobil své pracovní nástroje a šperky.

Barvy našly také své velké uplatnění (přibližně 5 tisíc let před naším letopočtem [1]) při vzniku prvních tkanin. Extrakci přírodních barviv a jejich použití při barvení popisují již staré egyptské hieroglyfy. Přírodní barviva, používaná k barvení tkanin až do 19. století, byla postupně nahrazena barvivy syntetickými z důvodu snadnější dostupnosti a jejich výroby ve velkém množství za nižší cenu [3].

Přírodních barviv se často využívá také pro barvení potravin. Například v Anglii a Holandsku má dlouholetou tradici přibarvování másel a sýrů. Také v kosmetice mají přírodní barviva své uplatnění (barvení mastí, barvy na vlasy atd.) [2].

Spolu se zvyšujícími se zdravotními problémy (alergiemi) zájem o přírodní barviva opět roste. Také z environmentálních důvodů – znečištění vod a půdy syntetickými barvivy – je návrat k přírodním barvivům zcela oprávněný. Jejich výroba vychází z obnovitelných zdrojů, a tak podporují biodiverzitu. Navíc přírodní barviva poskytují jedinečné barevné odstíny a jejich používání podporuje tradiční řemesla a lidovou tvořivost [4].

Jejich nevýhodou však bývá nižší stálost. Přírodní barviva jsou citlivá na pH, teplotu a světlo.

Vysokou cenou a obecně po barvivech rostoucí poptávkou absolutně nemohou na trhu konkurovat syntetickým barvivům [4]. Na zvýšení produkce přírodních barviv by se v budoucnu měl podílet zvyšující se objem sklizně vybraných rostlin obsahujících barviva,

zajištění dlouhotrvající stálosti barev, snížení nákladů na jejich výrobu, vyvíjení širšího spektra kvalitních barviv a výběr takových technologií, které jsou dostatečně šetrné k životnímu prostředí. Snahou by měla také být jednotná marketingová strategie, která by spotřebitele informovala o ekonomických, ekologických, estetických a sociálních výhodách přírodních barviv [4].

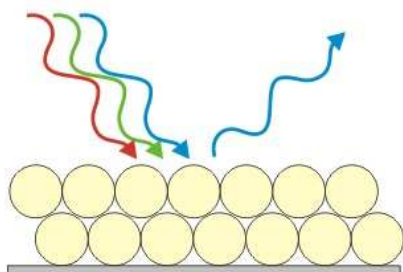
V experimentální části této diplomové práce bylo mým úkolem vytvořit hmotnostní spektra vybraných přírodních organických barviv a pigmentů, identifikovat organická barviva a pigmenty v modelových vzorcích pomocí LDI-TOF MS (Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) a ověřit tuto analytickou metodu ve vzorcích odebraných z uměleckých děl. Přírodní organické pigmenty a barviva byly vybírány pro experimentální část této práce podle jejich zastoupení v umělecké tvorbě a také podle finanční dostupnosti.

Dalším cílem této práce bylo potvrdit že, lze identifikovat pomocí LDI-TOF MS přírodní organické látky s relativní molekulovou hmotností iontů menší než 500 Da a to přímo – bez matrice.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Obecné pojmy

Pigment – nerozpustné barvivo (ve vodě, organických rozpouštědlech, olejích změkčovadlech, pojivech apod.), které se používá k výrobě tiskových a olejových barev, laků, k barvení umělých hmot a syntetických vláken [5,6]. Jeho barva je dána selektivní absorpcí nebo odrazem světla o určité vlnové délce [6]. Výsledná barva je určena spektrem odražených vlnových délek světla (obr. 1) (kap. 2.2.1). Pigmenty mají velikost částic od 0,2 do 10 μm [7] a primárně se rozdělují na anorganické a organické. Obě tyto podskupiny mohou být syntetického nebo přírodního původu. Organické pigmenty mají oproti pigmentům anorganickým větší rozpustnost, menší tepelnou stabilitu a menší stálost na světle. K nejstarším organickým pigmentům patří barevné *laky*, kde je barevná organická část za nepřesně definovaného poměru převedena pomocí bezbarvého anorganického substrátu (síranu barnatého, hydroxidu hlinitého aj.) na nerozpustnou sloučeninu. Další skupinu organických pigmentů tvoří některé nerozpustné azopigmenty, neboli *pigmentová barviva* (neobsahující solubilizující skupiny, ftalocyaniny, chinakridony apod.). Přírodní pigmenty lze připravit mletím, plavením a sušením přírodního materiálu [5,6].



Obrázek 1. Vznik barvy; světlo různých vlnových délek dopadá na pigment, který část z nich absorbuje. Výsledná barva je dána spektrem odražených vlnových délek světla [8].

Pojivo – spojitá vrstva, která odpovídá za většinu mechanických a ochranných vlastností barviv. Většina používaných pojiv jsou organické materiály jako například oleje, pryskyřice, proteinová pojiva, upravené přírodní látky (nitrát celulózy, chlorovaná pryž) a syntetické polymery [7].

Rozpouštědlo – obvykle těkavá organická kapalina, která rozpouští pojivo. Zajišťuje převedení směsi pigmentu a pojiva na povrch v tenké stejnoměrné vrstvě. Jako rozpouštědla se používají alifatické a aromatické uhlovodíky, alkoholy, estery, ketony. Rozpouštědlem pro emulzní a vodou ředitelná barviva je často voda [7].

Plnidlo – nerozpustná práškovitá minerální látka (kaolín, mastek, křída, vápenec apod.) s nepatrnou barvivostí a krycí schopností. Slouží k vyrovnání mechanických vlastností nátěrových barev i tmelů, k nastavení objemu u drahých pigmentů. Pigmenty a plnidla jsou v nátěrových barvách či tmelech udržovány v disperzním stavu pomocí pojidel [7].

Stálost pigmentu – vlastnost chemicky neaktivního pigmentu, který za běžných podmínek prostředí, ve kterém se vyskytuje, nemění odstín, nebledne, nečerná apod. Jedná se o stálost pigmentu na vzduchu, na světle, ve směsi s jinými pigmenty a v disperzi s pojidly [9].

Krycí mohutnost pigmentu – schopnost zakrýt barvu podkladu, závisí přímo na lomu světla pigmentu. Částičky pigmentu odrážejí tím více světla, čím vyšší je jejich index lomu a naopak [9].

Barvivo – soudržná barevná látka přilnavá k podkladu, která se skládá z pigmentu, pojiva a rozpouštědla [5–7]. Absorbuje viditelné elektromagnetické záření (ve vlnovém rozsahu 380–780 nm, přitom pro intenzivní vybarvení podkladu (např. textilie) musí mít barvivo dostatečně velké molární absorpční koeficienty ϵ_λ (10 000–40 000 l.mol⁻¹.cm⁻¹) (kap. 2.2.1) [10]. Barvivo je z pravidla rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech, olejích, změkčovadlech, pojivech apod. [5,6]. Využívá se například k barvení textilních vláken rostlinného (bavlny, lnu, regenerované celulosy) a živočišného původu (vlna, hedvábí) [10], k výrobě tiskových, olejových barev, laků, k barvení umělých hmot a syntetických vláken [5,6]. Pro barvení chemických hydrofobních látek (vlákna acetátová, polyesterová) se používá ve vodě málo rozpustných barviv ve formě disperze (tzv. *disperzní barviva*) [10].

Krycí mohutnost barvy – suspenze pigmentu s pojidlem. Čím vyšší je rozdíl mezi indexy lomu pigmentu a pojidla, tím lépe barva kryje [9].

Barevnost látek – je výsledkem absorpce a odrazu záření ve viditelné části světelného spektra. Barevnost látek vyvolávají přítomné chromofory, kterými jsou u organických látek násobné vazby (konjugované systémy). Dochází k přenosu elektronů mezi sousedními atomy a molekulami. Barevnost zvyšují hlavně skupiny $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{N}=\text{N}-$ a $-\text{NH}_2$ [5] (kap. 2.2.2).

Barvicí schopnost – schopnost barevného pigmentu obarvit bílý pigment. V případě světlého pigmentu se jedná naopak o schopnost zesvětlit barevný pigment. Jde o specifickou vlastnost každého pigmentu a nezávisí na velikosti částic [5].

2.2 Základní vlastnosti barviv

2.2.1 Absorpce světla

Aby se stala organická sloučenina barvivem, musí její molekulová struktura umožnit absorpci světla ve viditelné části spektra a současně musí tvořit mechanickou nebo chemickou vazbu se substrátem [11].

Propouštění nebo odrazení určitého podílu světla, vnímaného lidským okem, z celkového spektra bílého světla, se jeví jako barva. Sluneční (denní) světlo se skládá z ultrafialové, viditelné a infračervené části (tab. I). Postřehnutelná pro lidské oko je však jen viditelná oblast, která se skládá z barevného spektra. Barevné spektrum (fialová, modrá, zelenomodrá, modrozelená, zelená, zelenožlutá, žlutá, oranžová, červená a purpurová část) je získáno rozkladem bílého denního světla. Barvám spektra odpovídají různé energie fotonů, které odpovídají různým vlnovým délkám světelných paprsků v jednotkách nanometrů (nm). Dvě mezní situace nastávají, pokud dopadne bílé světlo na nějaký předmět a je buď zcela odraženo, nebo zcela pohlceno (absorbováno) – předmět se jeví buď jako bílý (*totální reflexe*) nebo černý (*totální absorpce*). Černá, bílá a šedá barva jsou nazývány *barvami achromatickými* [6].

Absorbuje-li ale předmět jen určitou část dopadajícího viditelného světla, lidské oko zachycuje část světla předmětem odraženého, předmět se tak jeví jako barevný. Vnímáme potom odraženou část světla jako *komplementární* (doplňkovou) *barvu*, která odpovídá určité vlnové délce [12].

Červený posun (tzv. *batochromní posun*) nastává, prohlubuje-li se barva předmětu od žluté k fialové. V opačném postupu (od fialové ke žluté barvě) nastává zvýšení barvy neboli modrý posun (tzv. *hypsochromní posun*) [6].

Tabulka I. Vyjadřuje oblast absorbovaného světla a komplementární barvy v daném rozsahu vlnových délek [11,12].

Vlnová délka [nm]	Oblast absorbovaného světla/barva	Komplementární barva
do 380	ultrafialová	–
380-435	viditelná – fialová	zelenožlutá
435-480	– modrá	žlutá
480-490	– zelenomodrá	oranžová
490-500	– modrozelená	červená
500-560	– zelená	purpurová
560-580	– zelenožlutá	fialová
580-595	– žlutá	modrá
595-605	– oranžová	zelenomodrá
605-730	– červená	modrozelená
730-760	– purpurová	zelená
nad 760	infračervená	–

Barva má také určitou intenzitu. Ta je ovlivňována různými strukturálními faktory, které jsou při zvětšování intenzity nazývány hyperchromním efektem (růst intenzity absorpčního pásu) a při snižování intenzity hypsochromním efektem (pokles intenzity absorpčního pásu). Látky, které mají schopnost přeměňovat dopadající světlo v paprsky o obvykle větší vlnové délce se nazývají fluorescenční (*luminofory*). Za luminofory jsou považovány aromatické uhlovodíky (benzen, naftalen, anthracen apod.) [6].

2.2.2 Teorie barevnosti

2.2.2.1 Chromofor-auxochromová teorie barevnosti

O závislosti mezi chemickou strukturou látky a jejím zabarvením je známa řada teorií, z nichž jedna z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších je *chromofor-auxochromová teorie barevnosti*, zavedená v roce 1876 O. Wittem. V této teorii jsou nositelé barevnosti skupiny (azoskupina, nitroskupina, nitrososkupina, karbonylová skupina, ethen apod.), které obsahují

dvojn  vazby, tzv. *chromofory*. Pokud jsou tyto skupiny zavedeny do bezbarv  sloučeniny, zm n  se v barevnou. Vlastn  sloučenina, obsahující chromofory, se nazývá *chromogen*. Nejedná se v sak ještě o barvivo. Teprve když do molekuly vstoupí další skupiny, tzv. *auxochromy* (hydroxyskupiny, sulfanyl skupiny, aminoskupiny, alkylaminoskupiny, acetylaminoskupiny apod.), je možné hovořit o barvivu [11].

Auxochromofory mají vliv na intenzitu barvy i na hloubku zabarven . Nahromad n  chromofory (prodlou en  řetězce konjugovaných vazeb, kondenzování aromatických jader, nahromad n  konjugovaných ketoskupin apod.), kter  lze označit jako tzv. *chromoforov  systém*, způsobují batochromn  posun. Soli s hydroxyskupinami mají batochromn  vliv, u aminoskupin naopak hypsochromní vliv. Alkylací a arylac  aminoskupiny vzniká batochromn  posun. Alkylací či arylac  hydroxyskupiny a acylací aminoskupiny dochází k posunu hypsochromnímu [6].

Ur it  auxochrom m  e spolu s jedním chromoforem zesilovat intenzitu zbarven , s jiným chromoforem ji může naopak zeslabovat. Z le t  také na vz jemn m zaujetí polohy jednoho a téhož chromoforu a auxochromu. Lze uvažovat tzv. o *auxochromov m systému* [6].

Fluorescenci podporují skupiny naz van  *fluorogeny* (např. $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{CH}=\text{CHCOOH}$ nebo $-\text{CN}$). Luminofor, kter  nese fluorogen se nazývá *fluorofor*. V př pad  fluoreskujících látek jsou označovány auxochromy jako *auxoflory* a *diminoflory*. Auxoflory (skupiny $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$), fluorescenci zesilují. Skupiny, kter  fluorescenci zeslabují (např. skupina $-\text{SO}_3\text{H}$) se nazývají *diminoflory*. Z le t  také na tom, jakou polohu v molekule auxoflory a diminoflory zaujímají. Pokud se nachází navzájem auxochrom a antiauxochrom v poloze *para*, roste dip lov  moment, intenzita fluorescence klesá. Naopak vyskytují-li se v poloze *para* dva auxochromy, dip lov  moment je mal , fluorescence stoupá. Auxoflory tedy fluorescenci zesilují či zeslabují dle vzájemného postaven  v mo n  kombinaci ještě s diminoflory.  t m v t  i dip lov  moment molekula zaujímá, t m v t  i bude pokles fluorescence. Wittova teorie nedovede vysvětlit všechny jevy barevnosti, proto byly vytvořeny další teorie [6].

2.2.2.2 Chinoidní teorie barevnosti

Tato teorie – vypracování Armstrongem a Nietzkim v roce 1888 – objasnuje vznik barvy přechodem aromatického (benzenového) jádra na chinoidní formu. Dle této teorie je

sloučenina barevná pouze tehdy, je-li v ní přítomno chinoidní jádro. Proto byla vytvořena klasifikace barviv na základě chinoidních systémů [11].

2.2.2.3 Teorie koordinačně nenasycených atomů

Koordinační nenasycenost atomu poskytuje chromoforový charakter. Atom je vázán s menším počtem sousedních atomů, než odpovídá jeho maximálnímu koordinačnímu číslu. Například uhlík s koordinačním číslem 4 se neprojevuje v diamantu a v alkanech jako chromofor, avšak v grafitu, ethenu, benzenu, kde je uhlík vázán se třemi sousedními atomy, funkci chromoforu má. Pokud je chromoforových atomů v molekule dostatečný počet, sloučenina se stává barevnou. Barva je zesilována ionizací molekul. Wizinger (1926) tuto teorii doplnil a vypracoval novou klasifikaci barviv [11].

2.2.2.4 Elektronová, mezomerní a kvantová teorie barevnosti

Teprve na základě elektronové, mezomerní a kvantově mechanické teorie byla vyložena souvislost mezi strukturou látek a jejich barevností [6].

Možnost pohybu vazeb mezi atomy v molekule vedla vědce k tomu, aby našli závislost mezi změnami těchto vazeb v molekule a absorpcí záření. Dle *oscilační teorie* (1910) je výsledkem selektivní absorpce světelných paprsků určitých vlnových délek, (resp. selektivní absorpce fotonů (kvant energie) určité velikosti), interference mezi kmitočtem záření a oscilací (kmitáním) vazeb v molekule nenasycených sloučenin, i barva předmětu. Čím více se zvětšuje rychlost oscilace, tím více se zkracuje vlnová délka pohlcovaného záření. Oscilační teorie došla k plnému potvrzení vypracováním elektronové teorie vazby [6,11].

Energie, pohlcovaná z celé viditelné i neviditelné části spektra světelného toku, je částečně použita na zvýšení energie kmitavého pohybu částic molekuly, a na rotační pohyb celé molekuly. Převážná většina pohlcené energie je však spotřebována na excitaci valenčních elektronů, tj. převedení elektronů ze základního energetického stavu do stavu s větší energií. Chromofory nenasycené skupiny atomů obsahují elektrony π . Tyto elektrony jsou vázány volněji než elektrony σ , které tvoří kovalentní vazbu. K jejich excitaci stačí menší množství energie. Dochází k absorpci světla ve viditelné oblasti. Auxochromy jsou skupiny atomů

s volnými elektronovými páry. V planární molekule se chovají jako elektrony π , a proto vstupují do interakce s elektrony π konjugovaného systému [6].

Mezomerní systém, kdy molekula směřuje do energeticky nejuvhodnějšího stavu, vzniká vzájemným působením chromoforů a auxochromů v molekule sloučeniny. Absorpce elektromagnetického záření určité vlnové délky (tedy i barva sloučeniny) je závislá na tom, jak snadno a jak často mohou volně vázané elektrony přecházet z energetické hladiny s minimální potenciální energií do stavů s větší energií. *Polarizace molekuly* při působení světla zapříčiní zmenšení hustoty elektronů na určitých částech molekuly při přechodu elektronů do excitovaného stavu [6].

Pokud elektrondonorové skupiny vstupují svými volnými elektronovými páry do vztahu s konjugovaným řetězcem elektronů, dochází tak k posunu absorpce světla k větším vlnovým délkám. Elektrofilní substituenty taktéž přitahují elektrony a vyvolávají trvalý posun elektronů v molekule. Zavedením elektrondonorového substituentu na jeden konec a elektrofilního substituentu na opačný konec konjugovaného systému, lze dosáhnout velkého posunu absorpce světla směrem k větším vlnovým délkám. V systému aromatických sloučenin k tomuto jevu dochází při zavedení těchto substituentů do vzájemné polohy *para* (např. *p*-nitrofenol). Elektrondonorové a elektrofilní substituenty způsobují posun vlnové délky i zesílení intenzity absorpce tím, že usnadňují pohlcování mnohem větší množství fotonů ze světelného toku [6].

Zavedením iontu do molekuly nastane větší možnost mezomerie a bathochromní posun. Snižuje-li se mezomerie zavedením iontu, dochází k hypsochromnímu posunu. Trvalou polarizací (zavedením iontu do molekuly) nastává snadný posun elektronů po konjugovaném řetězci. Poloha hlavního maxima absorpce přímo závisí na délce konjugovaného řetězce mezi elektrondonorovým a elektrofilním substituentem. Pokud je do konjugovaného systému zavedena další skupina s volným elektronovým párem, zmenšuje se původní dráha posunu elektronů a nastává nový, kratší posun elektronů mezi novým a původními substituenty [6].

Dle dnešní elektronové teorie barevnosti organických sloučenin je schopnost organických sloučenin absorbovat světlo podmíněna zvláštním stavem elektronů jejich molekul [11]. Elektronová a mezomerní teorie podává obecnější výklad vztahu struktury a barevnosti látek než teorie Wittova. Obě teorie mají však kvalitativní charakter [6].

Kvantitativní pohled zaujímá kvantová teorie. Jedná se o kvantitativní aplikaci teorie molekulových orbitalů na excitaci elektronů. Matematicky lze tuto aplikaci řešit pouze

u molekuly vodíku. Složitější molekuly vyžadují použití aproximativních poloempirických metod. V některých případech dosahuje i tato teorie velmi dobrých výsledků [6].

2.2.3 Vlivy způsobující změnu barevného odstínu

2.2.3.1 Solvatochromie

Solvatochromie je jev, kdy se barva roztoku barviva mění dle charakteru rozpouštědla. V polárních neutrálních rozpouštědlech budou barviva existovat jako vnitřní soli, obojaké ionty. V nepolárních rozpouštědlech se budou vyskytovat v neionizované formě. Barviva se snazší tvorbou obojakého iontu prohlubují barvu při přechodu od polárních k nepolárním rozpouštědlům [13].

2.2.3.2 Termochromie

Barva látky se prohlubuje při zahřívání [13]. Látky, které mají tendenci se takto chovat se nazývají termotropní [6, 14].

2.2.3.3 Fotochromie

Pozorovaný vratný jev, kdy se působením světla nebarevná nebo slabě zbarvená sloučenina silně zbarvuje. Ve tmě nebo po dlouhodobém osvětlení se opět vrací do původního stavu zpět. Při přechodu z exponovaného do původního stavu nedochází k emisi záření. Látky s touto reverzibilní vlastností se nazývají fototropní. Podstatou fototropních jevů jsou fotoreakční procesy. Hojně prostudované jsou fototropní látky s *cis-trans* izomerií, kdy termodynamicky stálější forma *trans* přechází působením světelné expozice na méně stálou formu *cis*. Ve tmě se vrací zpět na stálou formu *trans*. Dalším typem jsou látky s disociačním mechanismem. Fototropní látka, resp. její molekula disociuje účinkem světla na ionty, ve tmě probíhá zpětný proces na původní nedisociovanou látku. Třetí typ, který využívají fototropní látky, je mechanismus redukčně-oxidační.

Fototropního jevu se využívá například při výrobě ochranných brýlí a skel, při výrobě opalovacích krémů nebo v informační technice [6].

2.2.4 Stálost barviv v textiliích a hodnocení barevného odstínu barviv

Pokud jsou barviva vystavena různým fyzikálně-chemickým vlivům během zpracování obarvené textilie při výrobě, lze hovořit o stálosti technologické. Do této kategorie je zahrnována například karbonizace, chlorování, bělení, plisování, valchování, vyvážka, vulkanizace [3].

Druhou kategorii lze nazvat jako stálost spotřebitelskou. Závěrečné hodnocení stálosti barviv je prováděno za podmínek imitujících vlivů, jakým je vybarvení vystaveno při běžném použití konečným spotřebitelem. Do druhé kategorie patří především stálobarevnost v praní, otěru, v rozpouštědlech, v chemickém čištění, potu, žehlení, chlorované plovárenské vodě, při potřísnění vodou a na světle [3].

Stálost barviv na světle závisí na chemické struktuře barviva; na stavu, v jakém se vyskytuje na vybarveném materiálu (například textilie); na povaze tohoto materiálu [13]; na koncentraci vybarvení (síle); na způsobu aplikace [11]; na prostředí, jemuž je vybarvený materiál vystaven účinkům světla a na povaze světelného zdroje. Zásadité prostředí podporuje blednutí, kyselé prostředí jej naopak významně snižuje. Praktický význam stálosti barviv na světle má působení přímého nebo rozptýleného slunečního záření za přítomnosti vzduchu a vlhkosti okolního prostředí. Vlhká atmosféra podporuje blednutí na rozptýleném světle, zatímco sucho a slunečnost jej zpomaluje. Zvláště přítomnost aminoskupin a hydroxyskupin ve sloučenině snižuje stálost barviv na světle, naopak ke zvýšení stálosti barviv na světle přispívá nakupení sulfoskupin, karboxyskupin a atomů halogenu v molekule barviva. Vybarvení, které je tvořeno na vlákně velkými agregáty barviva, je na světle stálejší [13].

Stálost vybarvení (stálobarevnost a objektivní měření barevnosti) je hodnocena v České republice podle norem ČSN. Odpovídají příslušným ISO (International Organisation for Standardization) normám. Základní přehled norem a testů stálosti barviv představuje níže uvedená tabulka (tab. II) [3].

Tabulka II. Vyjadřuje přehled norem přesně popisujících podmínky, přístroje a způsob provedení testů stálostí barviv [3].

Norma ČSN	Norma ISO	Test
80 0132 (denní světlo) 80 0150 (Xenotest)	105-B01 105-B02	stálost na světle a v povětrnosti
80 0146	105-C01 až 105-C05	stálost při praní
80 0166 (chem. čištění) 80 0152 (org. rozp.)	105-D01 105-D02	stálost v org. rozpoštědlech
80 0143 (voda) 80 0165 (pot) 80 0144 (mořská voda)	105 E01 105 E04 105 E02	stálost ve vodě, v potu, v mořské vodě
90 0139	105 X12)	stálost při otěru
80 0140	105 X06	stálost v alkalické vyvářce
80 0127	105 N01	stálost při bělení
80 0156 (alkalické) 80 0157, 80 0158 (kyselé)	105 E12 105 E14, 105 E13	stálost při valchování
80 0173 (oxidy dusíku) není není	105 G01 105 G02 (kouř) 105 G03 (ozon)	stálost vůči atmosferickým nečistotám

U příslušného vzorku organických barviv je hodnocena po provedené zkoušce změna sytosti, odstínu a brilance vybarvení a porovnána se vzorkem před zkouškou [3].

Změna sytosti je hodnocena pomocí pětičlenné šedé stupnice pro změnu odstínu, která je definovaná rovněž normou (ISO 105-A02:1993 [15]). Stupeň 5 je přiřazen vzorku, který zůstává beze změny (maximální stálost). Směrem ke stupni 1 (nejmenší stálost) roste barevná rozdílnost mezi původním vzorkem a vzorkem podrobeným zkoušce. Změna odstínu i brilance jsou hodnoceny verbálně:

- 5 – výborná
- 4 – velmi dobrá
- 3 – dobrá
- 2 – dosti dobrá
- 1 – nízká [11, 16].

Samotná stálobarevnost na světle a v povětrnosti je vyjadřována pomocí osmičlenné modré stupnice – stupeň 8 pro maximální stálobarevnost, stupeň 1 pro minimální světlostálost [16].

Barvívem vybarvený substrát je dlouhodobě ozařován xenonovou výbojkou (ISO 105-B02:1994 [17]). Dochází k velmi intenzivní emisi záření se spektrální podobností slunečnímu záření. Vzorek je ozařován současně s modrou stupnicí standardů (vlna vybarvená souborem osmi modří. Hodnota 1 představuje nejnižší světlostálost a hodnota 8 naopak nejvyšší světlostálost. Každé barvivo ve stupnici se rozkládá dvakrát pomaleji než barvivo předchozí [16]. Výjimku tvoří stupeň 6, jehož příslušné barvivo se rozkládá čtyřikrát rychleji než standard 7. Výsledkem je, že standard 8 vybledá dvěstěpadesátkrát pomaleji než standard 1 [3].

Hodnocení stálobarevností jsou prostřednictvím ISO norem stále rozšiřovány a zpřesňovány dle nejnovějších poznatků, produkce a obchodu s barvivy [3].

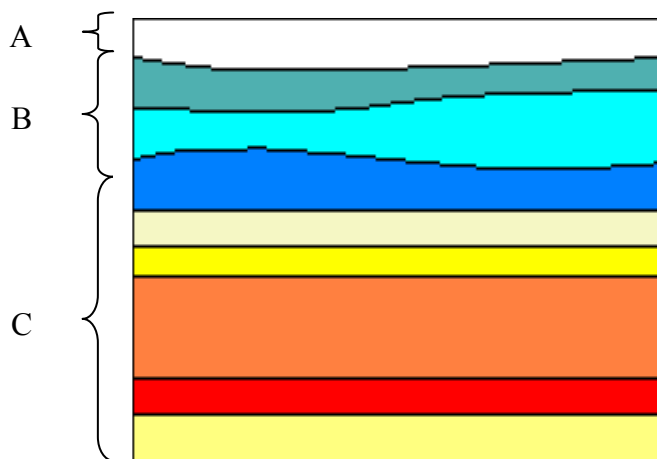
2.3 Technologický rozbor malby

Každý umělec má svůj vlastní styl malby, používá sobě nejbližší techniky a materiály, proto je velmi obtížné poukázat na jednotnou chemickou kompozici každého uměleckého díla. Avšak velká většina umělců dodržuje u malby společnou charakteristiku – vícevrstevné uspořádání [18].

Technologický rozbor malby nepředstavuje obraz jako plochu, ale jako trojrozměrné těleso. Obraz se na svém průřezu skládá z většího počtu homogenních vrstev, které jsou nanášeny v posloupnosti odpovídající vzniku malby (obr. 2). Malířská práce je rozvíjena na podkladu. Barvy nanášené a vrstvené na podklad se nazývají malbou. Malbu kryje povrchový průhledný nátěr (lak) s ochrannou funkcí. Tyto tři hlavní, ne vždy jednolitě, složky doplňují další mezivrstvy, jejichž uspořádání se liší a závisí na typu malířské techniky. (Zejména u maleb nástěnných je pojmenování složek jiné, než u přenosných obrazů). Podklad zvyšuje pevnost a odolnost malby. Nejspodnější vrstva podkladu se nazývá podložka, na které spočívá celá malba. Je tvořena z různých materiálů (desky dřevěné, kovové, plátno, papír, kartón, lepenka, pergamen, kámen, sklo, syntetické hmoty organické i anorganické). Jednoduchý nebo vícevrstvý podkladový nátěr, který se nanáší na podložku, upravuje

strukturu povrchu podkladu, a zaručuje příznivé optické podmínky. Podkladové nátěry (podklady) jsou rozlišovány podle světlosti a barvy (bílé, tmavé nebo barevné), dle druhů pojivých látek (klihové, olejové emulzní a disperzní) nebo podle plnidel či pigmentů (křídové a sádrové). Mezi podložkou a podkladem se nachází spojovací mezivrstva, která podporuje přilnavost a soudržnost obou složek, odstraňuje také přebytečnou savost podložky. Je připravena z klišu, želatiny nebo pryskyřičných laků. Naopak takzvaná „izolace“ je nanášena na povrch podkladové vrstvy a zabraňuje vnikání pojiva barev do podkladu. Bílé podklady bývají někdy tónovány lazurní nebo poloprůhlednou barvou, které se říká imprimitura. Je nanášena na uschlou izolaci nebo je používána jako její příměs za přítomnosti olejového nebo klihového pojidla [9].

Malba je nejpodstatnější součást obrazu. Může se také skládat z více vrstev, potom nejspodnější vrstva je nazývána podmalba. Lazurou označujeme povrchové průzračné nánosy barev. Přemalbou rozumíme dodatečně nanesenou barvu na hotový obraz. Lak nazýváme povrchovou ochrannou vrstvou, která však může zcela chybět (na akvarelech, kvaších, pastelech, suchých temperách). Laky dle povahy schnutí rozeznáváme na olejové, těkavé, teplem tvrditelné, chemicky a fyzikálně schnoucí. Podle složení je můžeme rozdělit na pryskyřičné, olejovo-pryskyřičné, syntetické, bílkové, esteracelulózové a etheracelulózové. Nakonec dle druhu rozpouštědla hovoříme o dělení na terpentínové, lihové, acetonové a vodové, kam lze zařadit laky emulzní a disperzní [9].



lak	lazura	malba	podmalba	imprimitura	izolace	podkladové nátěry	spojovací mezivrstva	podložka
-----	--------	-------	----------	-------------	---------	----------------------	-------------------------	----------

Obrázek 2. Deskový obraz na svém průřezu. A – lak, B – malba, C – podklad [9].

2.4 Přehled historického použití přírodních organických barviv a pigmentů v umělecké tvorbě

První doklady výtvarného umění mezopotamské kultury pocházejí z počátku druhé poloviny 4. tisíciletí př. n. l. Hlavními používanými materiály byly hlína, rákosí a přírodní barvivo. Vyráběny byly hliněné nádoby (mísy, vázy) s plastickými a později barevnými ornamenty. Později se objevují i hliněné figurky a stopy po ozdobně pletených rohožích [19].

V období velkých slohů (gotika až baroko) získávali malířští učni potřebné technické znalosti a dovednosti několikaletou prací v dílnách svých Mistrů. Tato období představují obrovský rozkvět používání přírodních organických pigmentů v umělecké tvorbě. Olejová barva, užívaná umělci od 15. do 19. století se skládala převážně z jednoho pigmentu a rostlinného oleje. Avšak pro zobrazení konkrétních pasáží v malbě byly někdy přidávány gumy, bílkoviny a pryskyřice [19].

Španělsko po dobytí Ameriky v 16. století představilo nové pigmenty a barviva. Například barvivo karmín (košenila), pocházející z parazitního hmyzu střední a jižní Ameriky rodu *Dactylopius*, dosáhlo především v Evropě své oblíbenosti a veliké hodnoty (obr. 3) [20].



Obrázek 3. *Sv. Marek osvobozuje odsouzeného otroka*, 1548. Autor Tintoretto používá červený karmínový pigment k dosažení dramatických barevných efektů [20].

Do konce 17. století bylo možné dodávat již hotové pigmenty, plátna a jiné materiály určené podle umělce přímo z obchodu. Nicméně, většina profesionálních malířů i nadále připravovala vlastní pigmenty, a to možná ze strachu před jejich falšováním [19].

Většina pigmentů před průmyslovou revolucí byla minerálního nebo přírodního organického původu. S pigmenty bylo obchodováno jako s luxusním zbožím a na dlouhé vzdálenosti.

Přírodní pigmenty byly často obtížně získatelné a podrobnosti jejich výroby byly drženy ze strany výrobců v tajnosti [20].

Obchod s pigmenty a barvivy se rozvinul v 19. století. Tento prudký vývoj vedl ke vzniku nejrůznějších odstínů barev, a tím zvýšení barevné škály. V některých případech bylo možné nahradit původní pigment či kombinaci pigmentů, protože původní pigment nebyl stálý, nebo bylo jeho použití příliš finančně nákladné [21].

Přírodní barviva dominovala v historické tvorbě hlavně do doby objevu syntetických barviv v 19. století [6].

Výskyt přírodních organických pigmentů je tedy velmi častý jak ve výtvarném umění (dnes především v restaurátorské činnosti umělecké tvorby), tak v technické praxi (převážně barvení tkanin). Jsou zakomponovány do barevné vrstvy obrazů (ikon), nástěnných maleb, polychromie soch apod. Jako nátěrové hmoty se využívají při ochranně a úpravě povrchů materiálů. Nacházejí však své uplatnění i při výrobě keramiky a skla.

Dataci používání jednotlivých přírodních organických pigmentů chronologicky vyjadřuje následující tabulka (tab. III) [22].

Tabulka III. Přehled pigmentů/barviv v jednotlivých historických období [5].

Historické období		Pigment/barvivo
STAROVĚK Egypt, Asyrie, Malá Asie	3 600–500 př. n. l.	indigo karmín – košenila (Peru) barviva mořeny sepie šafrán (krocetin)
STAROVĚK Antika – Řecko, Řím	600 př. n. l.–300 po. n. l.	karmín – kermes reseda
STŘEDOVĚK – NOVOVĚK	16. století 17. století	karmín – košenila (Evropa) kvercitron brazilské dřevo (Evropa) kasselská hněd', přírodní

Složitost organických pojiv v kombinaci s malým množstvím vzorků (obvykle několik mikrogramů), které jsou pro analýzu přírodních organických barviv a pigmentů k dispozici, je omezena použitelnost spektroskopických a separačních metod [23]. Dostupné metody, které jsou při identifikaci organických sloučenin nejčastěji používány, jsou plynová a pyrolýzní chromatografie (GC-FID, GC-MS nebo Py-GC-MS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a infračervená spektroskopie (FTIR). Vzhledem k omezenému získávání dat, byly tyto metody doposud většinou jen omezeně testovány v analytických výzkumných laboratořích za spolupráce s galeriemi a muzei České republiky.

Ramanovu spektroskopii nelze použít u všech vzorků z důvodu fluorescence některých organických sloučenin.

Identifikace červených organických pigmentů a barviv v heterogenních matricích reálných vzorků uměleckých děl je příkladem stále nevyřešených analytických úkolů. Různé jednoúčelové analytické metody byly navrženy pro jednotlivé případy, většina z nich však vyžaduje rozpuštění cílových látek. Výtažky barviv mohou být analyzovány reverzní kapalinovou chromatografií nebo hmotnostní spektrometrií s elektrosprejem (ESI MSD) s vyšší selektivitou a citlivostí než RP-HPLC. Příklady pigmentů a barviv přírodního organického původu v umělecké tvorbě a jejich identifikaci příslušnými metodami přibližuje následující tabulka (tab. IV) [24].

Identifikace modrých pigmentů (indiga, pruské modři, ftalocyaninu měďnatého) vyžaduje obvykle jednoznačnou spolupráci restaurátorů, jelikož jsou tyto pigmenty relevantní k přibližnému datování uměleckých děl a je v těchto případech potřeba zajistit správný odběr.

Tabulka IV. Příklady přírodních barviv a pigmentů a metody jejich identifikace v historických uměleckých dílech.

Barvivo/pigment	Metoda identifikace	Umělecké dílo
kermes – košenila	HPLC, (P)DAD, RM, LC-MS, ESI	13 ikon Krétské školy ikonografie (15.–17. století) [25].
	HPLC (UV-VIS, DAD)	4 ikony postbyzantské éry (14.–19. století) [26].
karmínová kyselina	CE-UV, HPLC	Sbírka kreseb a map v archivu královské kanceláře, Granada [27].
mořena (alizarin, purpurin)	MEKC	Olejomalba, diecézní muzeum umění, Bilbao [28].
	RM	23 obrazů Henriqueho Pousaoa (19. století) [29].
indigo	FTIR	Madona ochránitelka, Národní galerie v Praze [24].
	HPLC, ESI-MS	Japonský gobelín (19. století) [30].
	RM, XRF	5 islámských náboženských rukopisů (16.–18. století) [31].
šafrán (krocetin)	CE-UV, HPLC	Sbírka kreseb a map v archivu královské kanceláře, Granada [27].

Zkratky použité v tabulce:

CE-UV (Capillary Electrophoresis – Ultraviolet Light) kapilární elektroforéza s UV detekcí

ESI (Electrospray Ionisation) elektrosprejová ionizace

ESI-MS (Electrospray Ionisation – Mass Spectrometry) elektrosprejová ionizace v kombinaci s hmotnostní spektrometrií

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) infračervená spektroskopie

HPLC	(High Performance Liquid Chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	(Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
MEKC	(Micellar Electrokinetic Chromatography) elektrokinetická micelární chromatografie
(P)DAD	(Diode Array Detector) detektor diodového pole
RM	(Micro-Raman Spectroscopy) Ramanova spektroskopie
UV-VIS	(Ultraviolet Light – Visible Spectroscopy) UV-VIS spektroskopie
XRF	(X-ray Fluorescence) rentgenfluorescenční spektrometrie

2.5 Aplikace přírodních barviv na tkaniny

Barviva mohou být klasifikována dle způsobu jejich aplikace na vlákno. V případě přírodních barviv jsou důležité tři skupiny: mořidlová barviva, kypová barviva a substantivní barviva [16].

Mořidlová barviva – barviva rozpustná ve vodě, tvoří však komplexní sloučeninu se solí kovu (*mořidlo*) na barveném vlákně. Mořidlo zajišťuje získání potřebného barevného odstínu stálosti barvy. Mořidlová barviva lze použít na vlnu a hedvábí, ale například celulózová vlákna musí být před barvením nejprve chemicky upravena [16].

Textilie je při barvení nejprve ošetřena roztokem kovových solí (moření). V minulosti byl omezen počet pro tento účel vhodných barvířským mořidel. Nejčastěji byl používán roztok kamence ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$), síran železnatý ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) a chlorid cínatý (SnCl_2). Větší část přírodních barviv patří do skupiny barviv mořidlových [16].

Kypová barviva – barevné sloučeniny nerozpustné ve vodě, se schopností přecházet do rozpustné formy působením redukčních činidel (při barvení tkanin nejčastěji dithioničitanem sodným) v alkalickém prostředí. Při redukci karbonylové skupiny na skupinu enolovou (schéma 1) a následnou ionizací této skupiny v alkalickém prostředí přechází barvivo do roztoku. Produkt je nazýván *leukosloučenina*. Barvení vláken je prováděno z vodného roztoku *kypou* (alkalický roztok zredukovaného barviva), která přilne k vláknu.

Vláknem absorbovaná sůl leukosloučeniny je v kyselém prostředí oxidována například vzdušným kyslíkem. Při oxidaci leukosloučeniny je vyloučeno výchozí, ve vodě nerozpuštěné barvivo, které se pevně váže na vlákno. Kypová barviva se dělí na skupiny: indigoidní, anthrachinonová, barviva derivátů anthrachinonu, perinonová, polycyklochinionová [11].



Schéma 1. Schematické znázornění chemických přeměn kypových barviv [11].

Substantivní barviva – barviva, která jsou rozpustná ve vodném roztoku a mohou být použita jako taková. Mají afinitu k vláknu a nastupují přímo. Tato barviva jsou snadno použitelná, vyznačují se jasnými barvami. V časovém horizontu se však jedná o barviva nestálá [16].

Příklady rostlinných a živočišných barviv – zařazených k jednotlivým skupinám dle aplikace barviv na vlákno – vyjadřuje následující tabulka V.

Tabulka V. Uvádí příklady barviv v klasifikaci přírodních barviv dle aplikace na vlákno [16].

Barva	Mořidlová barviva	Kypová barviva	Substantivní barviva
červená, hnědá	mořena (alizarin, purpurin) červené dřevo brazilské (brazilein) kermes (kyselina kermesová) košenila (kyselina karmínová)		henna (lawson)
žlutá	reseda (luteolin, apigenin) kručinka barvířská (genistein) srpice barvířská (seratulan) škumpa – žluté dřevo brazilské (fisetin) moruše barvířská (morin) rešetlák – perské bobule (rhamnetin)		orlean (bixin) šafrán (krocetin) kurkuma (kurkumin)
modrá, fialová	kampeška – modré dřevo (hematein)	indigová modř (<i>Isatis tinctoria</i>) indigo – perská modř (indigo) týrský purpur/nach (dibromindigo)	indigokarmín (<i>Indigofera tinctoria</i>) francouzský purpur (orcein)
černá	duběnka a škumpa – taniny (gallotanin)		

2.6 Klasifikace přírodních barviv

První snahy o klasifikaci organických barviv byly již v druhé polovině 19. století v Německu. První publikace tohoto typu s názvem *Manual of Colours and Dyewares* byla zveřejněna J. W. Slaterem (1870) v Londýně. Velmi významná je také publikace G. Schultze a P. Juliuse *Farbstofftabellen* (1888) – obsahující přírodní barviva a jejich laky – ve které je klasifikace založena na chemické struktuře a odstínu [11]. Takzvaný *Colour Index* (přehled všech komerčně a technicky používaných barviv) vydává Americká asociace barvářů a

barvířů (The Society of Dyers and Colourists [10]; SDC [11]) v technické spolupráci s americkou asociací textilních chemiků a koloristů (The American Association of Textile Chemists and Colorists [10]; AATCC – Lowell Technological Institute, Lowell, Mass., USA) od roku 1956 (druhé vydání). Tehdy zahrnoval ve čtyřech svazcích 6 047 organických barviv – mimo jiné i barviva přírodní a pigmenty [11]. Každému barvivu je zde přiřazeno indexové číslo (C. I. Number), obecný název (Generic Name), někdy číslo chemické konstituce a hlavně pak vlastnosti garantované mezinárodními ISO a AATCC normami (údaje o aplikační metodě, stálostech, technologii přípravy). Dnes je samozřejmostí, že obsahují také toxikologické a ekologické informace včetně informací o karcinogenitě barviv [10,11]. V roce 2011 existovalo přibližně 13 000 C. I. Generic Names a 27 000 registrovaných komerčních produktů [32].

Nejjednodušší způsob, jak rozdělit přírodní organická barviva, je třídění podle jejich původu. Jedná se tedy o barviva rostlinná nebo živočišná.

2.6.1 Barviva rostlinného původu

Barevnost rostlin může způsobovat přítomnost plastidů nebo barviv v buněčné šťávě vakuol. Nejznámějším a nejrozšířenějším rostlinným barvivem je chlorofyl, který je obsažen v chloroplastech. Nejenže způsobuje zelené zbarvení stavebních částí rostlin, ale hlavně se podílí na biochemickém procesu zvaném fotosyntéza. Fotosyntetickými barvivy jsou kromě chlorofylu také fykobiliny (modrý fykocyanin, červený fykoerythryn) a karotenoidy (červené karoteny a od nich odvozené žluté xanthofyly). Různé zastoupení těchto látek je typické pro daný druh rostliny, tím je určena také rozdílnost odlišných odstínů zelené barvy.

Další plastidy se nazývají chromoplasty. Ty jsou nositeli barviv, neobsahují však na rozdíl od chloroplastů chlorofyl. Díky přítomnosti chromoplastů vznikají žluté a oranžové barvy květů nebo plodů.

Barviva obsažená v buněčné šťávě vakuol jsou například anthokyany. Jedná se o snadno ve vodě rozpustné sloučeniny glykosidické povahy, které způsobují červené, fialové a modré zbarvení listů u chrpy polní, červeného zelí a plodů borůvky, ostružiny, švestky, třešně aj. Dalšími barvivy buněčné šťávy vakuol jsou anthoxantiny. Tato flavonoidní barviva vytvářejí žluté zbarvení například okvětních listů divizny.

Barviva u rostlin slouží především k vlastní reprodukci lákáním opylovačů na jasně zbarvené květy a plody.

Rostlinná barviva jsou tradičně získávána z kořenů, plodů, listů, květů a kůry různých rostlin [1]. V Evropě je používána údajně od roku 800 červená barva, známá jako turecká červeň, z kořenů a oddenků mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*) [33].

Další barvířské rostliny poskytující červené barvivo jsou například brazilské dřevo (*Caesalpinia echinata*), červená řepa (*Beta vulgaris*), medvědice lékařská (*Arctostaphylos uva-ursi*), světlice barvířská (*Carthamus tinctorius*). Dalším příkladem může být červený orcein (francouzský purpur) získávaný z provzdušňovaného amoniakálního extraktu mechů *Rocella tinctoria*, *Ochrolechia tartarea* aj. Velmi známé je i oranžové barvivo získávané z blizen šafránu (*Crocus sativus*).

Heřmáněk pravý (*Matricaria recutita* nebo *Chamomilla recutita*), vítod hořký krátkokřídlý (*Polygala amara subsp. brachyptera*) či kručinka barvířská (*Genista tinctoria*) bývaly zdrojem žlutého barviva. Hnědou barvu poskytovala henna (*Lawsonia inermis*). Zelená barva (hlavně chlorofyl) může být získána z borytu barvířského (*Isatis tinctoria*), rdesna ptačího (*Persicaria maculosa*), rdesna červince (*Polygonum persicaria*), listů šťovíku kyselého (*Rumex acetosa*), kopřivy dvoudomé (*Urtica dioica*), a ambrosie peřenolisté (*Ambrosia artemisiifolia*). Modrá barva je poskytována borytem barvířským (*Isatis tinctoria*) a indigovníkem (*Indigofera tinctoria*) [34].

V České republice jsou pro získání rostlinných barviv nejvhodnější reseda žlutá (*Reseda luteola*) s obsahem žlutého mořidlového barviva luteolinu, dále potom světlice barvířská (*Carthamus tinctorius*) jejíž květy obsahují červené barvivo karthamin a ve vodě rozpustné žluté barvivo – nazývané saflorová žluť. Karthaminem (dokonale rozpustné barvivo pouze v lihu) se barvilo hedvábí a lněné látky. Používal se také jako barevné ličidlo. Dalším významnou rostlinou pro získání barviv byla mořena barvířská (*Rubia tinctorum*), jejíž mořidlová barviva alizarin a purpurin se vyskytují v mořeně ve formě glykosidů. Ty jsou uvolňovány hydrolýzou zředěnými minerálními kyselinami. Z dalších používaných rostlin pro získání přírodních barviv můžeme jmenovat kručinku barvířskou (*Genista tinctoria*), boryt barvířský (*Isatis tinctoria*), řešetlák počistivý (*Rhamnus carthartica*), ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare*). Mezi ostatní barvířské rostliny patří například afrikán, bez černý, cibule setá, hadinec obecný, kakost smrdutý aj. [35].

2.6.2 Barviva živočišného původu

Nejdůležitějším barvivem získávaným z živočišných zdrojů je přírodní sepie, melaminová červenohnědá látka izolovaná z inkoustového vaku sépie obecné (*Sepia officinalis*). Získávaný inkoust byl používán ještě před objevením inkoustu duběnkového. Duběnkový inkoust pochází z hálek blanokřídleho hmyzu žlabatky dubové. Dalším barvivem je šarlatová či karmínová košenila z vnějších krust oplozených samiček mexického červce nopálového (*Dactylopius coccus*), který žije na opuncii z čeledi kaktusovité (*Cactaceae*). Takzvaná nepravá košenila nebo také alkermesová šťáva je také červené barvivo získávané ze zaschlých samiček červce *Kermes ilicis* (*Coccus ilicis*), hmyzu žijícího na některých druzích ořešáků ve Středomoří a v severní Africe. Nepravá košenila byla hojně využívána jako náhrada drahého karmínu z košenily. Červcová barviva obsahují především kyselinu karmínovou.

Dalším příkladem živočišného barviva tyrský purpur získávaný z ulity ostranky *Hexaplex trunculus* [34].

Z výměšků červce lakového (*Laccifer lacca*), který žije v assamských lesích v Indii, je produkována přírodní živice, používaná od 18. století, sloužící k lakování [36,37].

2.6.3 Chemická klasifikace přírodních barviv a vybraná přírodní barviva, resp. pigmenty

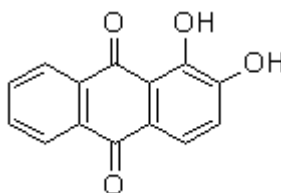
Základní chemická klasifikace zahrnuje dle chemické struktury uspořádání jednotlivých pigmentů a barviv do skupin. Vybrány jsou ty skupiny s příklady, které byly použity jako vzorky v experimentální části této diplomové práce.

2.6.3.1 Chinoidy /anthrachinonová barviva/

Chinoidy – sloučeniny žluté, červené, hnědé, až téměř černé barvy – které jsou odvozeny od jednoduchých chinonů, jejich dimerů, trimerů, redukovaných forem a produktů kondenzace. Navzájem se odlišují počtem hydroxylových skupin a dalšími substituenty. Základem přírodních barviv jsou nejčastěji 1,4-benzochinon, 1,4-naftochinon, 9,10-anthrachinon. Existují také deriváty 9,10-fenanthrenchinonu.

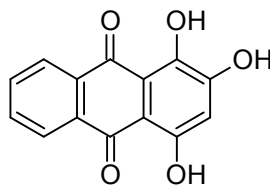
Chinoidní barviva se vyskytují v různých komponentech vyšších rostlin, lišejnících, řasách, houbách a bakteriích.

Alizarin – (1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon) je červený stabilní anthrachinoidní pigment (obr. 4) rostlinného původu, který lze získat z kořene mořeny barvířské (*Rubia tinctorium*), kde se vyskytuje ve formě glykosidu suberythinu. Barvivo z mořeny je využíváno jak v textilním, tak v potravinářském průmyslu. Mořena byla pěstována za barvířskými účely již ve starověku (ve střední Asii a Egyptě) asi 1500 př. n. l [38,39].



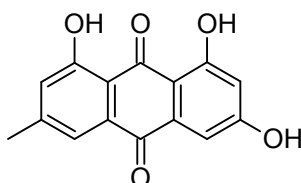
Obrázek 4. Strukturální vzorec alizarinu [40].

Purpurin – (1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon) je červený pigment (obr. 5) rostlinného původu izolovatelný také z kořene mořeny barvířské (*Rubia tinctorium*) [39].



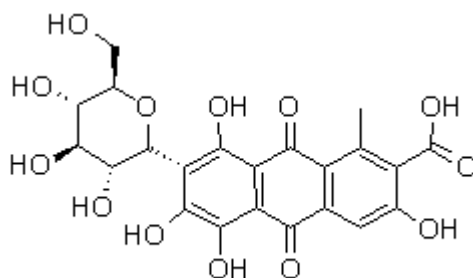
Obrázek 5. Strukturální vzorec purpurinu [41].

Emodin; frangula – (1,3,8-trihydroxy-6-methyl-9,10-anthrachinon) (obr. 6) je oranžový pigment rostlinného původu. Vyskytuje se například v plodech a kůře krušiny olšové (*Rhamnus frangula*) a řešetláku počistivého (*Rhamnus cathartica*). Využívá se v medicíně, působí jako laxativum [42,43].



Obrázek 6. Strukturální vzorec emodinu; frangula [44].

Karmínová kyselina (obr. 7) – červený pigment, součástí červeného barviva karmín neboli košenily. Jedná se o barvivo živočišného původu, které je izolováno z oplodněných samiček červce nopálového (rod *Dactylopius*), který žije jako parazit na kaktusech rodu *Opuntia* a *Nopalea* na americkém kontinentu. Barvivo s obsahem kyseliny karmínové je používáno v kosmetice a potravinářství. V Americe byla používána košenila již Aztéky a do Evropy byla přivezena v 16. století po objevení Ameriky. [45–47].

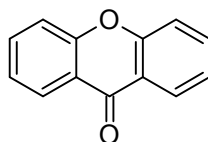


Obrázek 7. Strukturní vzorec kyseliny karmínové [48].

2.6.3.2 Pyranová barviva /xanthonová barviva, flavonoidy a chromony/

Xanthonová barviva tvoří přechodnou skupinu mezi antrachinovými a pyranovými barvivy. Jejich nejrozšířenějším zástupcem je gentisin, žlutá sloučenina obsažená v kořenu hořce.

Xanthon – (dibenzo- γ -pyron) (obr. 8) je součástí rostlinných barviv, izolovatelný například z plodů tropické rostliny mangostany lahodné (*Garcinia mangostana*). Xanthon působí jako antioxidant, významné jsou také jeho antibakteriální účinky [49,50].



Obrázek 8. Strukturní vzorec xanthonu [51].

Velmi rozsáhlou skupinu rostlinných fenolů běžně se vyskytujících v rostlinách v různých kombinacích představují flavonoidy. Označují se tak skupiny flavonů, isoflavonů, flavonolů, flavanonů a anthokyanů. Některé flavonoidy jsou důležité jako přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svoji trpkou nebo hořkou chuť.

Podstatou biosyntézy flavonoidů je reakce tříuhlíkatého malonátu s kumarovou kyselinou za účasti enzymu chalkon-syntasy. Vzniká tak naringenin-chalkon, který je základem syntézy všech flavonoidů (schéma 2) [2].

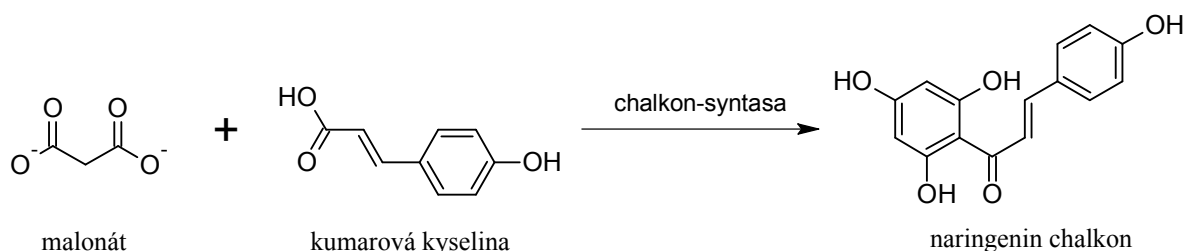
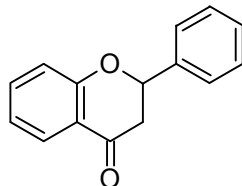


Schéma 2. Schematické znázornění syntézy flavonoidů [2].

Flavanony – /flavanon/ (obr. 9) jsou bezbarvé až světle žluté pigmenty rostlinného původu. Některé z nich jsou charakteristické pro své hořké obsažené látky, které jsou známe například u plodů grapefruitů.

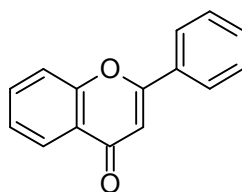
Flavanony vystupují jako výchozí sloučenina k syntéze flavonů, flavonolů, isoflavonů a anthokyanů [52].



Obrázek 9. Strukturální vzorec flavanonu [52].

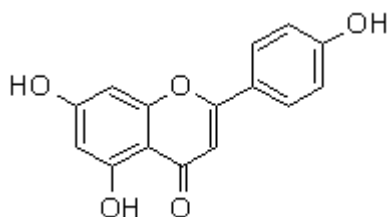
Do skupiny **flavonů** jsou zařazeny následující sloučeniny: flavon, apigenin, baicalein a chrysin.

Flavon – nejjednodušší zástupce skupiny flavonů. Jedná se o žluté barvivo přírodního původu, izolované z prvosenky žahavé (*Primula malacoides*). Flavon (obr. 10) je významným potravinářským barvivem [34].



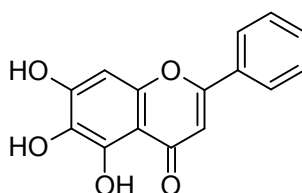
Obrázek 10. Strukturní vzorec flavonu [34].

Apigenin – (4',5,7-trihydroxyflavon) (obr. 11), pigment žluté barvy, rostlinného původu (takzvaný citrusový bioflavonoid). Nachází se ve velkém množství bylin. Izolován byl například z petržele (*Petroselinum*), celeru (*Apium graveolens*), heřmánku (*Matricaria recutita*). Tento flavonoid je obsažen i v červeném víně. Apigenin má antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky [53].



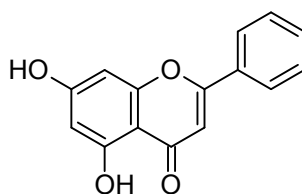
Obrázek 11. Strukturní vzorec apigeninu [34].

Baicalein – (5,6,7-trihydroxyflavon) (obr. 12) je rostlinný flavonoid žluté barvy, získávaný z kořenů šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*). Má protirakovinotvorné účinky a působí příznivě proti volným radikálům [54,55].



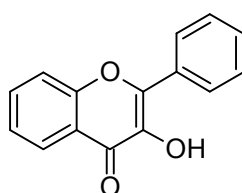
Obrázek 12. Strukturní vzorec baicaleinu [55].

Chrysin – (5,7-dihydroxyflavon) (obr. 13) je rostlinný bioflavonoid získávaná z mučenky (*Passiflora coerulea*), která je pěstována v Oceánii, Africe, Asii, střední Americe a Karibské oblasti. Chrysin je používán v medicíně pro své protizánětlivé účinky [56,57].



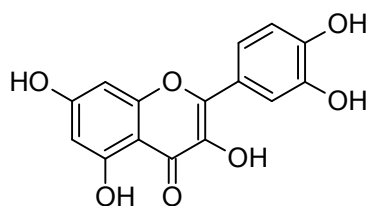
Obrázek 13. Strukturální vzorec chrysinu [56].

Do skupiny **flavonolů** (obr. 14) lze zařadit následující sloučeniny: kvercetin, morin, rhamnetin, isorhamnetin.



Obrázek 14. Obecný strukturální vzorec flavonolů [34].

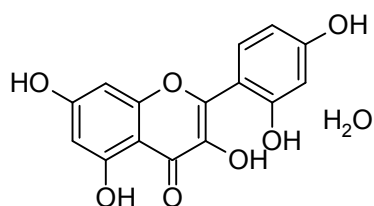
Kvercetin – (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon) (obr. 15) je rostlinný oranžovohnědý pigment získávaný z vnitřní kůry dubu barvířského (*Quercus tinctoria*) původem ze Severní Ameriky. V Evropě se uplatňuje až po objevení Ameriky. V malé míře jej obsahuje též kůra jabloní a cibulové slupky. Vyskytuje se také v chmelu, čaji, kaštanu jírovce maďalu. Ovlivňuje průchodnost buněčné stěny [22,34].



Obrázek 15. Strukturální vzorec kvercetinu [22].

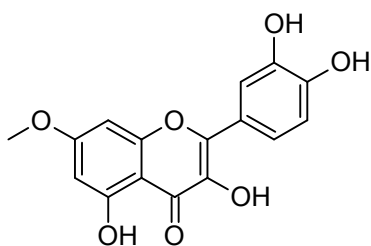
Morin – (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavon) (obr. 16) je dalším zástupcem flavanolových barviv, obsažený ve dřevě stromu *Chlorophora (Morus) tinctoria* – moruše barvířské, která roste v jižní a Střední Americe a méně v Jižní Evropě. Dřevo moruše barvířské se po objevení Ameriky stalo velice levné, a proto bylo jeho barvivo používáno velmi hojně, přestože má

menší světlostálost než reseda. Moruše barvířská je barvivo mořidlové, používané hlavně pro vlnu a hedvábí [22].



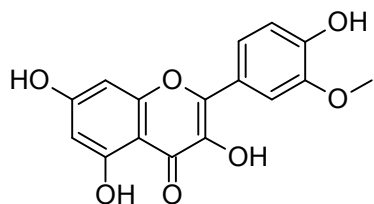
Obrázek 16. Strukturální vzorec morin hydrátu [22].

Rhamnetin – (7-methoxy-3,3',4',5-tetrahydroxyflavon) (obr. 17) je žluté barvivo, které se získává extrakcí horkou vodou z nezralých bobulí různých druhů řešetláků (*Rhamnus amygdalinus*, *R. saxabilis*, *R. alaternus* – Persie, Francie, Maďarsko). Řešetlák se používal hlavně pro barvení vlny a hedvábí již od starověku. Ve středověku byl aplikován ještě společně s indigem pro získání zelené barvy [22].



Obrázek 17. Strukturální vzorec rhamnetinu [34].

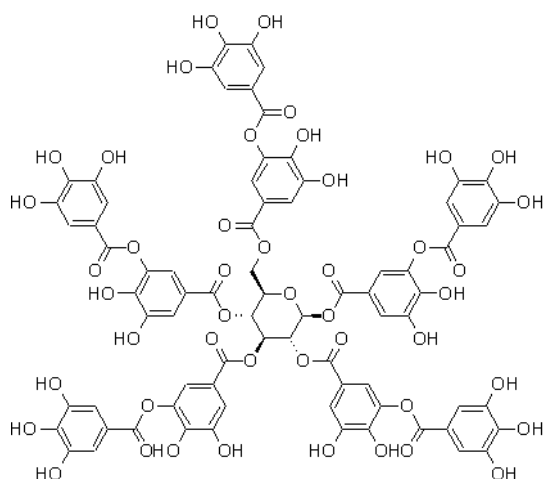
Isorhamnetin - (3'-methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavon) (obr. 18) je žluté rostlinné barvivo s antioxidačními účinky. Vyskytuje se jako potravinářské barvivo (ve slupkách červené cibule, jablkách, čaji aj.) [39].



Obrázek 18. Strukturální vzorec isorhamnetinu [58].

Z flavonolů vznikají biosyntézou bezbarvé leukoanthokyanidy, které podléhají enzymovému hnědnutí. Vznikají tak oligomery s trpkou chutí, které se nazývají kondenzované **taniny** (třísloviny). Ty se vyskytují v různých dřevích, kůrách stromů a keřů většinou v glykosidické formě jako gallotaninu ($C_{14}H_{10}O_9$), jenž je doprovázen dalšími barvivy (fisetin, kyselina ellegalová). Známým zdrojem taninu jsou duběnky – hálky na malých větvičkách dubů (Indie, střední Východ) – které vytváří hmyz rodu *Cynips*. Také dřevo škumpy poskytuje taniny – *Rhus cotin*, *Rhus coriaria* [59].

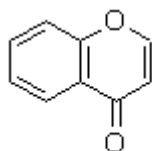
Taninová kyselina – světle žlutá až nahnědlá polyfenolická sloučenina, (obr. 19), trpké až hořké chuti, rostlinného původu. Má antibakteriální, antimykotické a antioxidační vlastnosti. V medicíně je využívána k léčbě průjmů, hemoroidů, bolavých svalů a kloubů. Pomáhá v zástavě krvácení. Průmyslově se používá pro činění kůží, barvení dřeva a tkanin (vlny a hedvábí). Jedná se o barvivo mořidlové. Své uplatnění v historii našla kyselina taninová ve výrobě duběnkového inkoustu [59].



Obrázek 19. Strukturní vzorec kyseliny taninové [60].

Chromony (deriváty chromonu, obr. 20) jsou barviva rostlinného původu, která lze použít například v léčbě astmatu.

Chromon – (1-benzopyran-4-on; derivát benzopyranu s ketoskupinou na pyranovém kruhu). Jedná se o izomer kumarinu. Jako žlutý pigment je obsažen v listech a květech rostlin. Působí protizánětlivě a protinádorově [61].

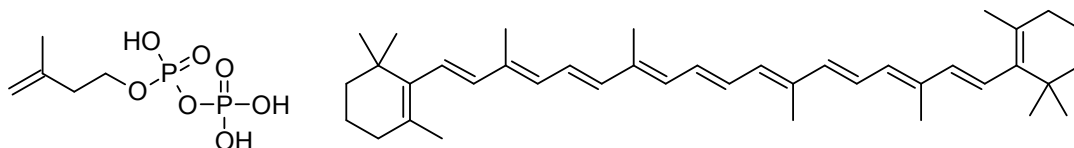


Obrázek 20. Strukturní vzorec chromonu [62].

2.6.3.3 Terpenoidy /karotenoidy/

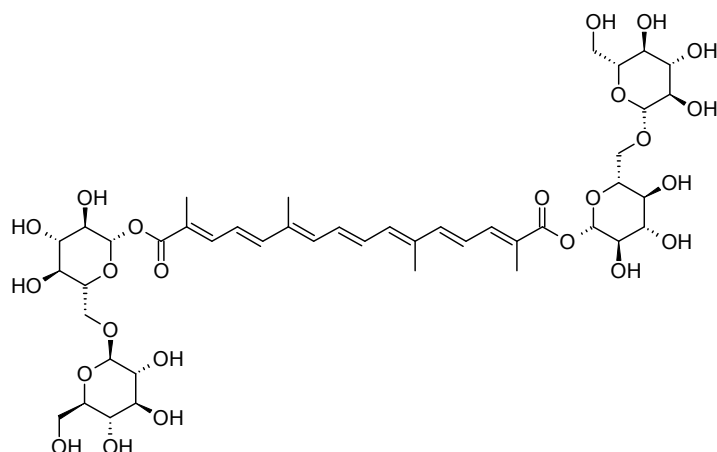
Karotenoidy jsou polyenová barviva s typickými lineárními nenasycenými konjugovanými uhlovodíky a jejich deriváty s dvojnými vazbami v konfiguraci *trans*. Konjugovaný systém dvojných vazeb způsobuje jejich barevnost – žlutá, žluto-zelená, oranžová a červená barva. Pigmenty jsou lipofilní. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinách, dále potom v řasách, houbách, u mikroorganismů, korýšů, ryb, ptáků a savců. V rostlinách jsou asociovány s chlorofyly v chloroplastech. Je známo okolo 700 přírodních karotenoidů. Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny (obr. 21).

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: karoteny (obr. 21) a xanthofyly (kyslíkaté deriváty karotenů – alkoholy, ketony, epoxyderiváty) [34,39].



Obrázek 21. Isopentenyl-difosfát (IPP) - základní stavební jednotka isoprenů (vlevo); strukturní vzorec β -karotenu (vpravo) [2].

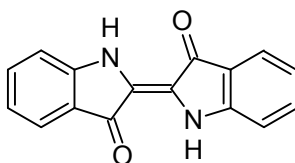
Krocín – (krocetin bis-gentiobiosid) (obr. 22) se získává z blizen květů šafránu (*Crocus sativus*), který byl původně pěstován v Persii, odkud se rozšířil do Indie, Afganistánu a Číny. Glykosid krocín hydrolyzuje na krocetin. Žluté šafránové barvivo, známé již v době předantické, bylo používáno k barvení textilií (starý Izrael). Nejvíce využívaným barvivem byl ve starověkém Řecku a Římě, ve středověku byl nejrozšířenější ve Španělsku. Dále bylo šafránové barvivo využíváno jako barvivo laku na cínové folii (imitace zlata) a k iluminacím. Pro svoji drahou cenu bylo nahrazováno dostupnějšími a levnějšími barvivy [5,34].



Obrázek 22. Strukturní vzorec krocínu [34].

2.6.3.4 Indoly

Indigo – (dusíkatá heterocyklická sloučenina) (obr. 23) je jedno z nejstarších člověkem používaných barviv. Jeho zdrojem je indická rostlina indigovník (*Indigofera tinctoria*, či *Indigofera suffraticosa*, případně evropský boryt barvířský (*Isatis tinctoria*), kde se nachází ve formě heteroglykosidu indikanu. Indigo se používalo hlavně k barvení tkanin (vlny a bavlny) již ve starém Egyptě a staré Číně (2 000 let př. n. l.) Jako pigment modré barvy byl používán ve starém Římě. Po objevu výroby syntetického indiga v roce 1880, získávání přírodního indiga postupně ustalo. Při použití v teple musí být lakováno, neboť je na světle nestálé. Indigo patří do skupiny kypových barviv [5,22,34].



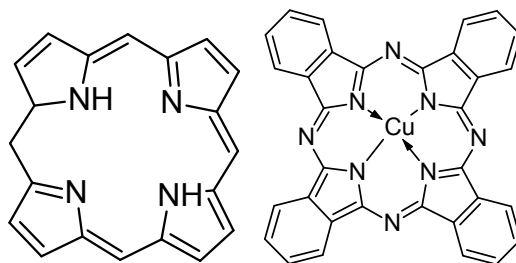
Obrázek 23. Strukturní vzorec indiga [34].

2.6.3.5 Pyrrolová barviva

Jejich strukturu tvoří čtyři pyrrolová jádra spojená methinovými můstky, která jsou uspořádaná do porfyrinového kruhu (obr. 24) nebo lineárně. Proto se rozeznávají dvě

základní skupiny: cyklická porfyrinová barviva (hemová barviva) a lineární bilinová barviva [22].

Ftalocyanin měďnatý (Versálová modř) – modro-zelená makrocyclická sloučenina s vynikající termostabilitou a světlostálostí. Strukturou je velmi podobná heminu (krevnímu barvivu) a chlorofylu (listové zeleni). V přírodě se však nevyskytuje. Ftalocyanin měďnatý byl vyvinut v Imperial Chemical Industries v Anglii, jako pigment byl představen na výstavě v Londýně roku 1935 pod názvem monastrálová modř (α -typ). Tento umělecký pigment byl rozšířen od roku 1938. Své využití má například v polygrafickém průmyslu pro hlubotisk, ofset a flexotisk. Barvila se jím i bavlna [6,63].



Obrázek 24. Porfyrinový kruh – základní struktura hemových barviv (vlevo) a strukturální vzorec ftalocyaninu měďnatého (vpravo) [6,39].

2.7 Metody identifikace organických barviv

Identifikace organických pigmentů je stále velkou výzvou pro analytické chemiky. Údaje o výrobních procesech pigmentů jsou obecně neznámé a jejich barvy se dramaticky mění v průběhu času. Charakterizovat jejich chemické složení je velmi komplikovaná záležitost, a to kvůli malé velikosti a nesnadnému komplexnímu zajištění vzorků pro analýzu. V praxi zůstává zkoumání organických pigmentů na průřezu často neprůkazné nedostatkem vhodné analytické metody. LDMS (laserová desorpční hmotnostní spektrometrie) umožňuje provádět prostorové rozlišení povrchové analýzy nepatrného množství materiálu s laterálním rozlišením až do 10 μm .

Laserovou desorpční hmotnostní spektrometrii (LDMS) lze rozdělit na dvě ionizační techniky, a to LDI (Laser Desorption/Ionisation) a MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation). LDI je přímá laserová desorpce a ionizace povrchu vzorku, zatímco MALDI zahrnuje proces laserové desorpce a ionizace za účasti matrice [18].

Matrice se při měření analytickou metodou MALDI skládá z krystalických molekul, z nichž tři nejčastěji používané jsou 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina (sinapová kyselina), α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) (tab. VI). Z jedné z těchto látek je připraven roztok, často ve směsi s vysoce čistou vodou a organických rozpouštědel (obvykle acetonitrilu nebo ethanolu). Může být přidána také trifluoroctová kyselina.

Matrice má poměrně nízkou molekulovou hmotnost, aby umožnila odpařování z povrchu, ale dostatečně velkou molekulovou hmotnost na to, aby mohla být provedena příprava vzorku. Matrice jsou často kyselého pH, a proto působí jako protonové zdroje na podporu ionizace analytu [64]. Mají silnou optickou absorpci buď v ultrafialové nebo infračervené oblasti, aby rychle a účinně absorbovaly laserové záření. Tato vlastnost je často spojena s chemickou strukturou, zahrnující několik konjugovaných dvojných vazeb (známé například ze struktury kyseliny skořicové). Základní roztok je smíchán s analytem. Směs vody a organických rozpouštědel umožňuje jak hydrofobní, tak ve vodě rozpustné (hydrofilní) rozpouštění molekuly v roztoku. Tento roztok je nanesen na desku MALDI (obvykle kovová deska určená pro tento účel). Rozpouštědla se odpaří a zůstává pouze vykrytalizovaná matrice s molekulami analytů. Výběr správné matrice je klíčovou otázkou získání kvalitního hmotnostního spektra [65].

Tabulka VI. Uvádí přehled hlavních MALDI matric a jejich aplikaci na měřené vzorky [65].

Sloučenina	Jiné názvy	Aplikace
2,5-dihydroxybenzoová kyselina [66]	DHB	peptidy, nukleotidy, oligonukleotidy, oligosacharidy
3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina [67,68]	SA, sinapová kyselina	peptidy, proteiny, lipidy
4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina [67,68]	FA, ferulová kyselina	proteiny
α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina [69]	CHCA	peptidy, lipidy, nukleotidy
pikolinová kyselina [70]	PA	oligonukleotidy
3-hydroxypikolinová kyselina [71]	HPA	oligonukleotidy

V této práci však ionizační technika MALDI používána nebyla. S velkou pravděpodobností by matrice rušila výsledky spekter vzhledem k nízkým molekulovým hmotnostem analyzovaných látek – často do ~500 Da.

LDMS by mohla příznivě sloužit v oblasti konzervace a restaurátorství. Umožňuje totiž zkoumat organické pigmenty za pomoci hmotnostní spektrometrie (MS) přímo z nejsvrchnější vrstvy barevného průřezu. Je tedy nejen možné identifikovat přítomnost pigmentu samotného, nýbrž i směs pigmentů – v jednotlivé vrstvě cca 10 μ m. Na druhou stranu jsou stanoveny podmínky a omezení, ve kterých může být LDMS použita. Ukazuje se, že je technika limitována rozsahem a specifičností laserového odběru. Analýza není jednoduchá a není úspěšná za všech podmínek. LDMS proto může být užitečně použita v kombinaci s jinými současnými analytickými postupy jako je například mikroskopie a chromatografie [18].

2.7.1 Hmotnostní spektrometrie a TOF analyzátor

Hmotnostní spektrometrie je v současné době jednou z široce rozšířených metod kvalitativní analýzy neznámých molekul.

Její principem je rozdělení nabitých částic dle svých hmotností v elektrickém/magnetickém poli ve čtyřech krocích. Nejprve dochází k tvorbě iontů (tzv.

ionizaci), následuje filtrace iontů (je prováděna hmotnostní analýza). V další fázi probíhá měření četnosti iontů v závislosti na hodnotě m/z , kde

m = relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu,

z = počet nábojů vzniklého iontu ($z = 1,2,3,4,5,6\dots$).

Posledním krokem je tvorba hmotnostního spektra, které se skládá z osy x (přísluší hodnotě m/z) a osy y (přísluší četnosti iontů – tzv. intenzitě signálu).

Hmotnostní spektrometr lze aplikovat k identifikaci sloučenin, a to k analýze sumárního vzorce s vysokým rozlišením, k identifikaci struktury sloučeniny a k identifikaci porovnáváním hmotnostních spekter (na základě tvorby a poměru četnosti iontů o určitých hodnotách m/z). Výkon laseru je uváděn v hmotnostních spektrech v relativních jednotkách – arbitrary intensity (a. i.).

Zatímco hmotnostní spektrometr počítá se závislostí intenzity iontů (a. i.) na měrném náboji (m/z) iontů analyzované látky, pro snadnější identifikaci mohla být za předpokladu jednotkového náboje iontů $z = 1$ uvažována v sumárních vzorcích molekul analytů bezrozměrná veličina střední (průměrné) relativní molekulové hmotnosti (M_r^{st}). Střední (průměrná) relativní molekulová hmotnost $M_r^{st}(Y)$ molekuly Y je poměr průměrné hmotnosti $m(Y)$ molekuly Y a atomové hmotnostní konstanty m_u ¹. Z důvodu zjednodušení bude M_r^{st} (střední (průměrná) relativní molekulová hmotnost) značena M_r , tedy stejným symbolem jako relativní molekulová hmotnost a bude používán zkrácený termín relativní molekulová hmotnost – i přesto, že se jedná o pojmy různé. (Relativní molekulová hmotnost $M_r(Y)$ molekuly Y je naproti tomu poměr skutečné hmotnosti $m(Y)$ molekuly Y a atomové hmotnostní konstanty m_u). Jednotkou relativní molekulové hmotnosti je 1 Da (Dalton), který se rovná hmotnosti 1/12 hmotnosti atomu uhlíku s nukleonovým číslem 12.

$$1 \text{ Da} = \sim 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$

Z hlediska polaritý vznikají ionty nabitě kladně nebo záporně, vzniká tak pozitivní nebo negativní ionizace. Molekulové ionty jsou měřeny v pozitivním nebo negativním módu

¹ $m_u = 1,66057 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$

(kladné nebo záporné extrakční napětí). V pozitivním módu přístroje jsou detekovány pouze molekulové kationty, naopak v negativním módu jsou měřeny jen molekulové anionty.

Z hlediska velikosti a původní struktury mohou vznikat nabitě ionty molekulové – radikál-kationty M^{*+} (nebo radikál-anionty M^{*-}), pseudomolekulové ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) [72], vícenásobně nabitě ionty molekul ($[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$, „dimery/trimery“ molekulového analytu $[2M+H]^+/[3M+H]^+$, adukty analytu s alkalickými kovy ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$), fragmenty analytu, kde dochází ke ztrátě funkční skupiny, dále potom iontové klastry apod [73].

Energie laserového pulsu je absorbována převážně matricí, dochází k její rychlé desorpci. Odpařující se částice matrice s sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství. Excitované molekuly matrice dále mohou ionizovat molekuly analytu přenosem protonu; vznikají převážně pseudomolekulové ionty $[M+H]^+$. Příčina tvorby deprotonovaných iontů $[M-H]^-$ je předmětem dalšího analytického zkoumání.

Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí – iontového zdroje, analyzátoru a detektoru.

Pro vznik iontů v iontovém zdroji jsou používány dva typy ionizačních technik – měkké a tvrdé [74]. Měkké ionizace se využívá pro studium širokého spektra látek zahrnující biomolekuly (proteiny, peptidy, sacharidy, nukleové kyseliny apod.), syntetické polymery a farmaceutika. Hojně je využívána k identifikaci těchto molekul a k analýze jejich komplexních směsí ve spojení se separačními technikami [73]. Velikou výhodou měkké techniky je, že molekuly po ionizaci nefragmentují, měřena je tak jejich celá hmotnost. Naopak tvrdé ionizační techniky se využívá pro malé organické molekuly. Vznikají primárně radikál-kationty M^{*+} (ionty s lichým počtem elektronů), které vlivem velkého přebytku vnitřní energie molekuly získané ionizací podléhají další fragmentaci. Mezi tyto techniky lze počítat například EI (elektronovou ionizaci), ICP (indukčně vázanou plazmu) nebo LD (laserovou desorpci).

U analyzátorů hmotnostní spektrometrie jsou využívány dva odlišné principy: buď se přítomností magnetického pole oddělí ionty o stejném m/z a ty proletí skrz analyzátor – tzv. kvadrupól (u kvadrupólu je vkládáno hlavně elektrické pole a magnetické pole je jeho vlivem generováno samo), nebo jsou v analyzátoru TOF (Time of Flight) ionty urychlovány vysokým napětím (25–30 kV).

Všechny ionty získají vysokým napětím impuls stejné kinetické energie, kterou lze zapsat dvěma různými rovnicemi – 1 a 2.

$$E_k = z \cdot U \quad (\text{rovnice 1}),$$

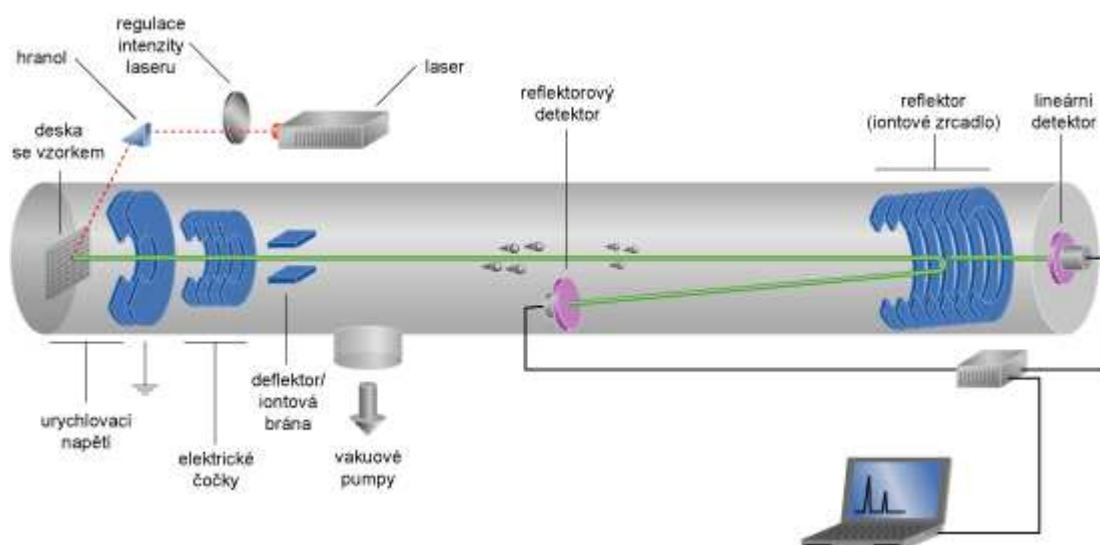
$$E_k = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (\text{rovnice 2}), \quad \text{kde } v = s/t [61].$$

Urychlované ionty analyzované látky vstupují přes uzemněnou mřížku do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rovnoměrně přímočaře rychlostí danou jejich hmotností a nábojem [75]. Z rovnice 3 je patrné, že po vytknutí konstant, závisí měřená doba letu jen na poměru molekulové hmotnosti a náboje částice.

$$t = \sqrt{\frac{m \cdot s^2}{2 \cdot z \cdot U}} \quad (\text{rovnice 3}),$$

(E_k : kinetická energie [J], z : velikost náboje, U : elektrický potenciál [V], m : hmotnost iontu [Da], v : rychlost iontu [m/s], t : doba letu [s], s : délka dráhy letu [m]).

TOF analyzátor pracuje ve dvou různých modelech: buď lineárním, který je výhodnější pro měření velikých molekul a nebo reflektorovým, kterým se naopak měří menší molekuly [74]. Výhodami TOF analyzátoru jsou vysoká citlivost, krátká doba analýzy (jeden puls laseru znamená v praxi jedno spektrum) a vysoká maximální hodnota m/z [73]. Funkce tohoto analyzátoru je vyjádřena na obrázku níže (obr. 25).



Obrázek 25. Schéma funkce analyzátoru TOF (Time of Flight) [76].

Aby bylo zajištěno vyšší rozlišení, jsou využívány dva prvky přispívající k zúžení disperze kinetické energie iontů. Prvním z nich je použití tzv. iontového zrcadla, neboli reflektoru. Má za úkol sloužit ke kompenzaci různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z . Iontové zrcadlo představuje soustavu prstencových elektrod umístěných na konci letové trubice. Ke každé elektrodě je přiváděno napětí o stejné polaritě jako extrakční napětí. Jeho hodnota zároveň roste ve směru letu iontů. Ionty, které mají vyšší hodnotu kinetické energie, pronikají hlouběji do opačně orientovaného elektrického pole reflektoru, jsou zpožděny oproti iontům s kinetickou energií nižší. Dochází tak k vyrovnání celkové doby strávené v letové trubici, jelikož hloubka průniku iontů do elektrického pole reflektoru je přímo úměrná pouze jejich kinetické energii a vůbec nezávisí na hodnotě m/z . Snížení citlivosti z důvodu vyšších ztrát při delším pobytu iontů v letové trubici může být však nevýhodou.

Druhým prvkem, který má za úkol zvýšit rozlišení, je pulsní (zpožděná) extrakce. Řídí nerovnoměrnou disperzi počátečních kinetických energií iontů po ozáření laserovým pulsem. Po uplynutí doby cca 100 až 1000 ns je aplikováno extrakční napětí. Během tohoto zpoždění nastane změna v distribuci iontů v iontovém zdroji. Ionty o stejném m/z , ale s vyšší kinetickou energií se budou nacházet dále od nosiče vzorku než ionty s nižší kinetickou energií. Aplikací extrakčního napětí dochází k vyrovnání distribuce počátečních kinetických energií pro ionty o stejné m/z . Nevýhodou zpožděné extrakce je, že funguje pouze ve vymezeném, předem zvoleném intervalu m/z [73,76].

2.7.2 Princip LDI (Laser Desorption/Ionisation)

Pro potřeby této diplomové práce nebyla využita analytická metoda MALDI, nýbrž jednoduchá a časově nenáročná analytická metoda LDI, nevyžadující při přípravě vzorků přidanou matici. Analyzovaná molekula je ozařována (resonančně absorbuje) krátkými (\sim ns) pulsy laseru. To znamená, že energie fotonů laseru je rovna energii potřebné k vybuzení dané molekuly, a tím i k její ionizaci [75]. Molekuly analyzované látky jsou v kapalně nebo pevně fázi za sníženého tlaku převáděny do plynného skupenství [72].

LDI je vhodná pro stanovení látek s molekulovou hmotností pod \sim 500 Da, protože v této oblasti ve spektru neruší intenzivní píky iontů matrice [73].

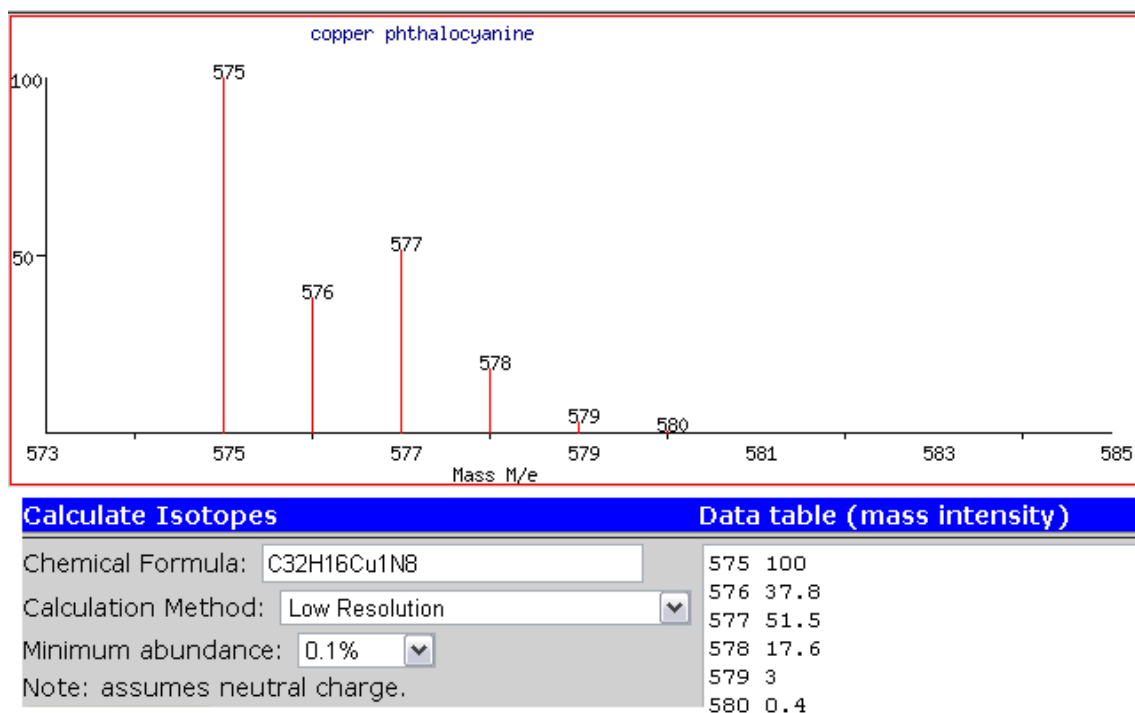
2.7.2.1 NALDI (Nano-Assisted Laser Desorption/Ionisation) MS

NALDI (laserová desorpce a ionizace za účasti nanostruktury) je metoda rychlé analýzy molekul s nízkými relativními molekulovými hmotnostmi. K analýze je použita komerčně vyráběná nanostrukturovaná deska, která má aktivní povrchy, skládající se z několika vrstev nanostrukturovaných anorganických materiálů a vrchní hydrofóbní organické vrstvy. Tyto povrchy jsou optimalizovány pro vzorky nanášené bez matrice. Vzorky mohou být připraveny spolu s mnoha běžnými organickými nebo vodnými rozpouštědly. NALDI zlepšuje účinnost LDI analýzy. Analýza pomocí NALDI je obzvláště citlivá například pro peptidy do 1700 Da [77].

Tato metoda může být vyzkoušena například pro analyzovaná barviva/pigmenty, která by byla problematická v identifikaci nad ~500 Da.

2.7.2.2 Izotopová distribuce základních píků analyzované látky

Počítačový software – Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter – spočítá izotopovou distribuci (rozložení) základních píků pro danou chemickou látku. Je zadán chemický sumární vzorec, název a hmotnostní stupnice látky, pro kterou je třeba určit izotopovou distribuci. Vše bude zaznamenáno v konečném grafickém výstupu, kterým je hmotnostní spektrum s tabulkou dat. V hmotnostních spektrech je tedy vidět, že analyzovaná látka většinou netvoří jedinný základní pík, ale píky rozkládá v okolí své relativní molekulové hmotnosti. Na obrázku (obr. 26) je spočítaná izotopová distribuce například pro ftalocyanin měďnatý s relativní molekulovou hmotností ($M_r = 576,07$). Pro výpočet izotopového rozlišení bylo použito nízkého rozlišení s minimální četností píků 0,1 % a předpokládaným neutrálním nábojem analyzované látky [78].



Obrázek 26. Izotopová distribuce základních píků ftalocyaninu měďnatého o relativní molekulové hmotnosti 576,07 [78].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité pigmenty a materiály

Alizarin (Sigma-Aldrich), apigenin 95% (Fluka), baicalein 98% (Sigma-Aldrich), emodin frangula (Sigma-Aldrich), flavanon 98% (Sigma-Aldrich), flavon (Sigma-Aldrich), ftalocyanin měďnatý (Sigma-Aldrich), chromon (Sigma-Aldrich), chrysin (Sigma-Aldrich), indigo přírodní (Kremer Pigmente), isorhamnetin (Sigma-Aldrich), karmínová kyselina (Sigma-Aldrich), krocín (Sigma-Aldrich), kvercetin (Sigma-Aldrich), morin hydrát (Sigma-Aldrich), purpurin (Sigma-Aldrich), rhamnetin (Sigma-Aldrich), taninová kyselina (Sigma-Aldrich), xanthon 97% (Sigma-Aldrich), benátský balzám (H. Schmincke & Co.-GmbH & Co.KG), čpavek /NH₃/ (p. a. 99,5 %, Penta Chrudim), dračí krev (Altamira), dubová destička (vyrobena 15.5. 2008 – poskytla Pavla Kofroňová a Lucie Čámská, PedF UK), ethylalkohol (Pedf UK), gumiguta (Sandragon), kamenec /KAl(SO₄)₂.12H₂O/ (čistý, Lachema Brno), lněný olej (UMTON barvy, Děčín), mastix (Altamira), sandarak (Altamira), sušené šafránové blizny (Termeli és forgalmazza: Nehéz Gyula), šelak rubín bez vosku (Sandragon), uhličitan olovnatý /PbCO₃/ (Lachema Brno), uhličitan vápenatý /CaCO₃/ (Kittfort, Praha), vaječný bílek (Tesco), vaječný žloutek (Tesco).

3.2 Příprava modelových vzorků

Za přípravu a poskytnutí všech modelových vzorků (modelových laků a modelových laků v organických pojivech) k identifikaci LDI-TOF MS děkuji panu RNDr. Tomáši Grygarovi, CSc. a analytické laboratoři oddělení Ústavu anorganické chemie AV ČR, v.v.i.

3.2.1 Příprava alizarinového laku /D221-1/

4 g kamence (KAl(SO₄)₂.12H₂O) bylo smícháno s 200 ml vody a 2 ml zahřátého čpavku (NH₃). Roztok byl přiveden na 10 minut k varu. 125 mg alizarinu bylo rozmícháno v 50 ml vody se 2 ml NH₃ a vše bylo přidáno do předešlého roztoku. Celá směs byla 10 minut povařena, ponechána zchladnout a druhý den přefiltrována.

3.2.2 Příprava purpurinového laku /D222-1/

4 g kamence ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) bylo smícháno s 200 ml vody a 2 ml zahřátého čpavku (NH_3). Roztok byl přiveden na 10 minut k varu. 125 mg purpurinu se 3 ml NH_3 bylo přidáno do předešlého roztoku. Celá směs byla 10 minut povařena, ponechána zchladnout a druhý den přefiltrována.

3.2.3 Příprava chrysinového laku /U2-1/

48 mg chrysinu bylo smícháno s 2,5 l horké vody, 1 g CaCO_3 , 1 g PbCO_3 a 0,7 g kamence ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Celá směs byla 10 minut povařena, ponechána zchladnout a druhý den přefiltrována.

3.2.4 Příprava kvercetinového laku /U2-2/

91 mg kvercetin hydrátu bylo rozpuštěno ve 4 l horké vody, 1 g CaCO_3 , 1 g PbCO_3 a 0,5 g kamence ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Celá směs byla 10 minut povařena, ponechána zchladnout a druhý den přefiltrována.

3.2.5 Modelové vzorky barviv v oleji

Příprava alizarinového laku v oleji /U3-4/, chrysinového laku v oleji /U3-3/, kvercetinového laku v oleji /U3-2/ a purpurinového laku v oleji /U3-1/ probíhala smícháním každého modelového laku zvlášť s lněným olejem tak, aby bylo dosaženo správné konzistence, ve které by bylo možné laky aplikovat na umělecké dílo.

3.2.6 Modelové vzorky barviv v temperě

Proteinové pojivo žloutková tempera byla připravena v poměru: 3 díly vaječného žloutku, 1–2 díly lněného oleje zahuštěného na slunci a 1 díl vody. Našlehaný žloutek byl scezen, byla přidána voda a postupně vmíchán lněný olej [79].

Příprava chrysinového laku v temperě /U3-7/, kvercetinového laku v temperě /U3-6/ a purpurinového laku v temperě /U3-5/ probíhala smícháním každého modelového laku zvlášť se žloutkovou temperou tak, aby bylo dosaženo správné konzistence.

3.2.7 Příprava zlatého laku I

7,1 g šelaku bylo smícháno se 2,3 g benátského balzámu a se 45 ml ethylalkoholu 0,5 g sušeného šafránu bylo rozdrobeno v achátové misce a ponecháno po dobu dvou dnů louhovat se ve 3 ml ethylalkoholu. Rozpuštěná směs šelaku, benátského balzámu a ethylalkoholu (bylo nutno mírně zahřívát) byla přidána do připraveného šafránu. Vše bylo přefiltrováno přes Büchnerovu nálevku. Lak byl nanesen na dubovou destičku, ošetřenou bílou podkladovou vrstvou a ponechán zaschnout [80].

3.2.8 Příprava zlatého laku II

10,2 g šelaku, 2,2 g sandaraku a 2,0 g mastixu bylo rozpuštěno ve 45 ml ethylalkoholu. Zároveň bylo ve 20 ml ethylalkoholu rozpuštěno za mírného ohřátí také 1,5 g gumiguty, 0,8 g dračí krve a přidáno 0,5 g šafránu. Po rozpuštění byly oba roztoky smíchány a přefiltrovány přes Büchnerovu nálevku. Lak byl nanesen na dubovou destičku, ošetřenou bílou podkladovou vrstvou a ponechán zaschnout [80].

3.2.9 Šafrán s bílkem – tradiční výroba laku sloužící k iluminování

V achátové misce bylo rozdrobeno 0,5 g šafránu, ke kterému byl přidán nešlehaný, přecezený vaječný bílek z jednoho vejce – zbavený zárodečných poutek a obalů. Do druhého dne se směs ponechala louhovat. Následně bylo vše přefiltrováno přes bílé pláténko. I tento lak byl nanesen na dubovou destičku, ošetřenou bílou podkladovou vrstvou a ponechán zaschnout [80].

3.3 Odebrané vzorky uměleckého díla pro identifikaci pomocí LDI

Zkoumané vzorky umělecké tvorby pro identifikaci pomocí LDI-TOF MS byly poskytnuty z obrazu – olej na plátně (obr. 27) od autora Josefa Čapka s názvem *Procházka* – který je datovaný do roku 1936. Vzorky (několik zrněk modrého pigmentu) byly odebrány

ze dvou míst obrazu, z modrého šátku a modré sukně (obr. 26). Podle datování obrazu bylo ve vzorcích očekáváno přírodní modré barvivo – indigo.



Obrázek 27. *Procházka*, 1936 (nahore); vzorek modrého pigmentu odebraný ze dvou míst nástěnného obrazu – z modrého šátku a modré sukně (dole).

3.4 Příprava vzorků a analýza pomocí LDI–TOF MS

Na (MA)LDI destičku byl nanesen 1 μ l destilované vody, do které bylo vneseno několik zrněk analyzované látky, která byla převedena opatrným promícháním špičky pipety přímo na ocelovou měřicí desku, a ponechán zaschnout. Ocelová měřicí deska s nanesenými vzorky byla vložena do přístroje (hmotnostní spektrometr Bruker-Daltonics Biflex IV MALDI-TOF se standardním dusíkovým laserem /337 nm/), na kterém bylo nastaveno napětí 19 kV a na elektrodě deflektoru 15,05 kV. Spektra byla zpracována softwarem Bruker Flex III a Bruker Xtof.

Měření probíhalo v pozitivním i negativním reflektorovém módu, na němž bylo nastaveno napětí 20 kV, při intenzitě laseru 50 až 60 %. Interval detekovaných analyzovaných látek byl od 146 do 1702 Da s přesností měření $\pm 0,2$ Da.

Pro kvadratickou kalibraci byly používány dvě standardní směsi peptidů M-Pep a Pepmix. Pro kalibraci bylo nasbíráno alespoň 200 shotů [61].

Měření probíhalo za pomalého zvyšování energie, současného posouvání terčíku se vzorkem a sledováním spektra jednotlivých laserových pulsů [60]. Pro jednotlivé vzorky bylo nakumulováno alespoň 200 shotů. Výsledné spektrum bylo získáno zprůměrováním jednotlivých měření [61].

Všechna hmotnostní spektra, která měří závislost intenzity iontů (a.i.) na měrném náboji (m/z) iontů analyzované látky, byla vyhodnocována v počítačovém programu mMass (verze 2.4) [81].

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Anthrachinonová barviva a pigmenty

Experimentálně bylo zjištěno, že anthrachinonová barviva jsou velmi stabilní v chemické struktuře anthrachinonového kruhu. Všechny vzorky (alizarin, purpurin, emodin /Příloha 1/, kyselina karmínová (obr. 28)) byly dle svých molekulových hmotností v hmotnostních spektrech identifikovány. Nepřesnosti při měření vznikaly při kalibraci přístroje, bylo také potřeba počítat s přesností měření hmotnostního spektrometru $\pm 0,2$ Da. V oblastech molekulových hmotností byly tedy u všech analyzovaných anthrachinonových barviv (tab. VII) zjištěny průkazně radikály ($M^{\bullet+}$, resp. $M^{\bullet-}$) – základní píky. U emodinu se vyskytovaly v negativním módu jako málo intenzivní, zato v oblasti 540 m/z byl tvořen dimer analytu.

U kyseliny karmínové nebyly základní píky v pozitivním módu zjištěny vůbec. V molekule kyseliny karmínové fragmentuje C–C vazba mezi uhlíkem C7 anthrachinonového skeletu a uhlíkem C2 tetrahydropyranového zbytku (obr. 28). Anthrachinonový kruh byl identifikován v hmotnostním spektru s měrným nábojem iontů 329 (m/z). Důvodem fragmentace molekuly kyseliny karmínové může být její velká relativní molekulová hmotnost ($M_r = 492,39$).

Stability anthrachinonového kruhu molekuly může být vysvětlena přítomností konjugované struktury molekuly, kombinované různými variantami hydroxylových substituentů.

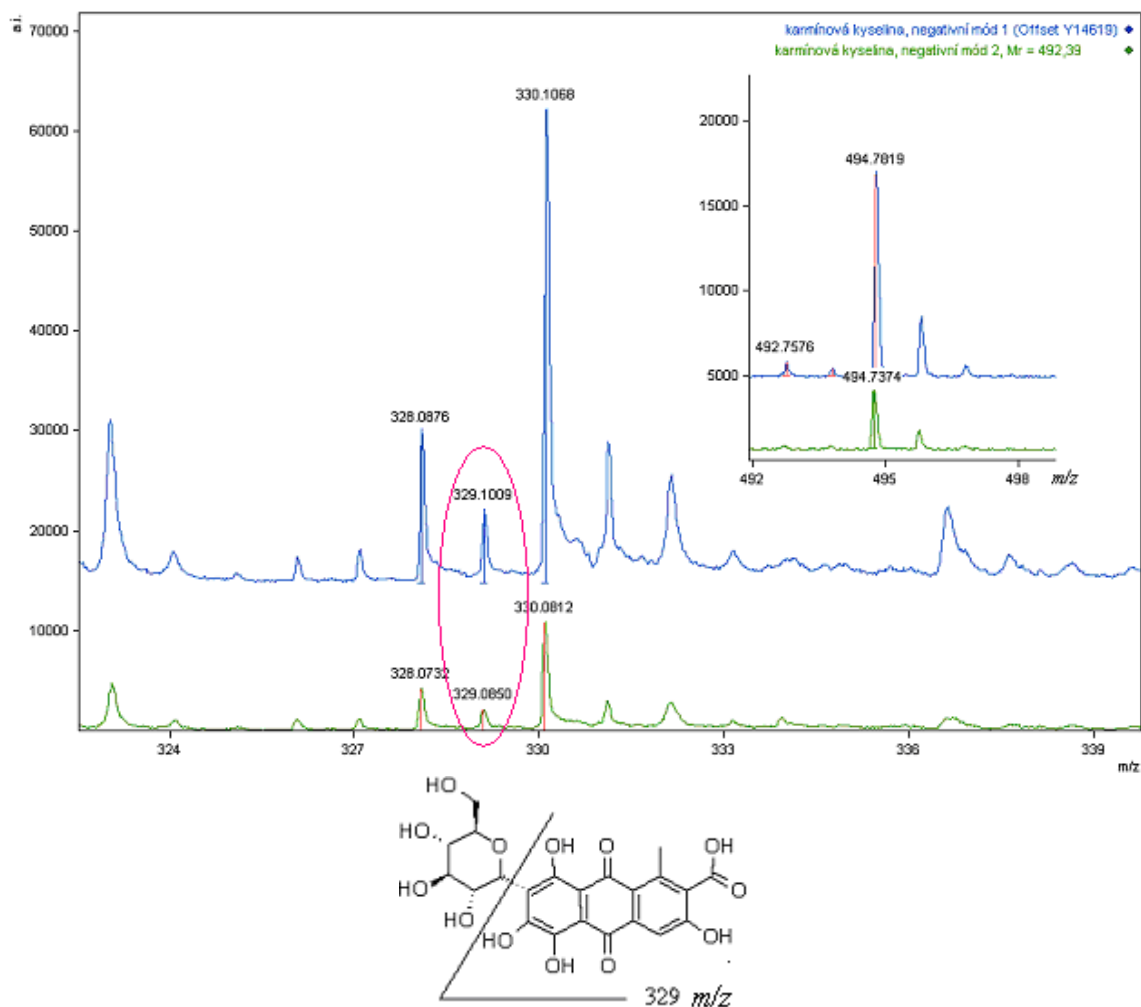
U analytů alizarinu, purpurinu a emodinu byly zjištěny sodné² adukty $[M+Na]^+$ v oblastech 263, 279 a 293 m/z . Purpurin tvořil také adukty draselné³ $[M+K]^+$ v oblasti 295 m/z . Alkalické molekulové adukty byly identifikovány pouze v pozitivním módu. Přítomnost sodíkových a draslíkových aduktů koresponduje s největší pravděpodobností s alkalickými ionty, navázanými v oblasti laserové ablace.

² $M_r(\text{Na}) = 23$

³ $M_r(\text{K}) = 39$

Tabulka VII. Vyjadřuje hlavní charakteristické ionty při zkoumání anthrachinonových barviv pomocí LDI.

Antrachinonová barviva/ Mr	M^{•+}/ M^{•-} základní píky (m/z)	[M+Na]⁺ (m/z)	[M+K]⁺ (m/z)	dimer analytu (m/z)
Alizarin 240,21	240	263	-	-
Purpurin 256,21	256	279	295	-
Emodin; frangula 270,24	270	293	-	540
Karmínová kyselina 492,39	492	-	-	-



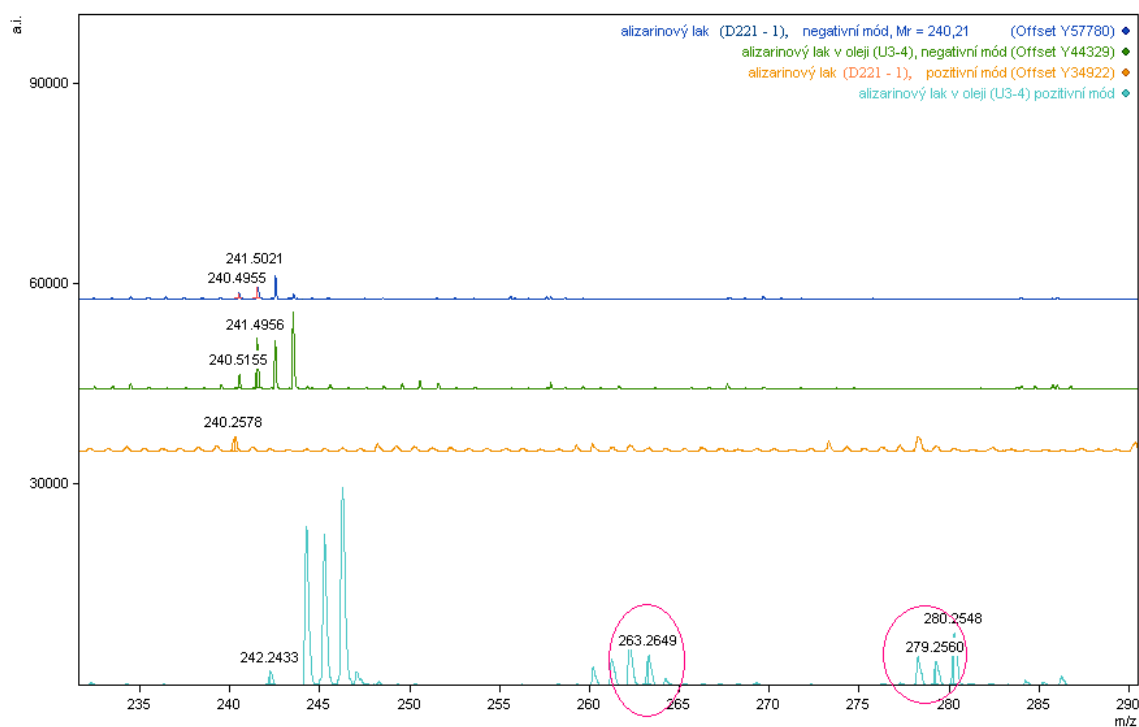
Obrázek 28. Hmotnostní spektrum kyseliny karmínové ($M_r = 492,39$) ve dvou měření v negativním módu. V molekule fragmentuje C–C vazba mezi uhlíkem C7 anthrachinonového skeletu a uhlíkem C2 tetrahydropyranylového zbytku. Anthrachinonový kruh byl identifikován v hmotnostním spektru s měrným nábojem iontů 329 (m/z).

Kvalitativní analýzou LDI byly ověřovány modelové vzorky anthrachinonových barviv – alizarinové a purpurinové laky (obr. 29 a 30). Pigment alizarin v alizarinovém laku a alizarinovém laku v oleji byl prokázán v oblasti 240 m/z v negativním módu, v pozitivním módu se podařil určit pouze v samotném alizarinovém laku.

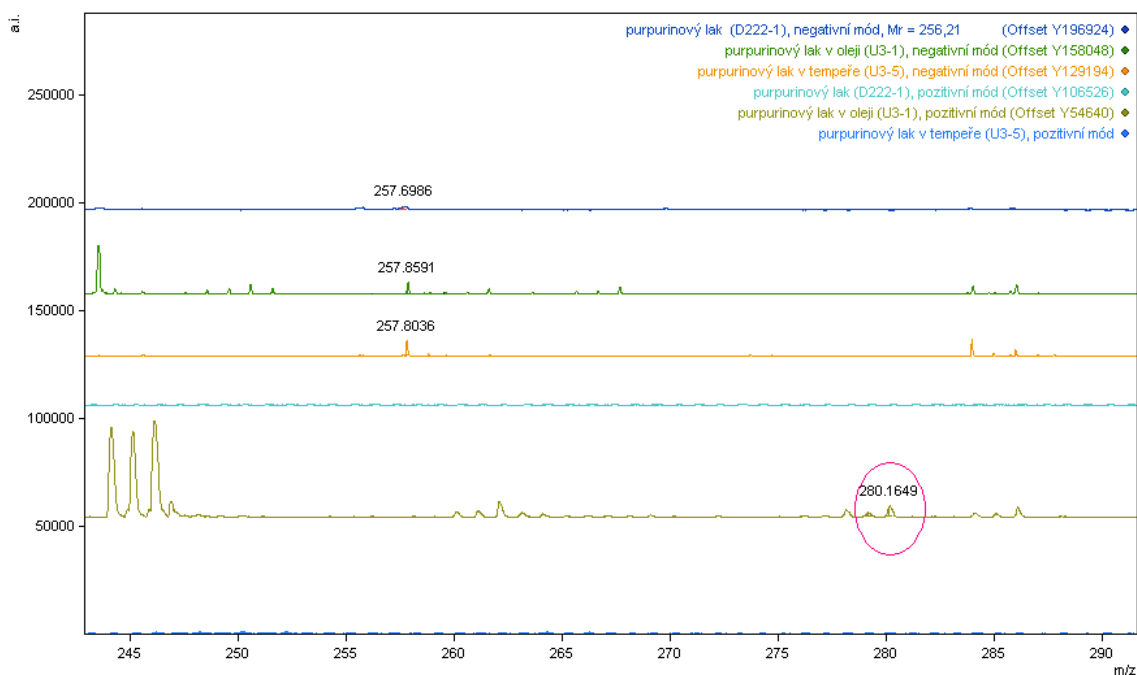
V pozitivním módu byly u alizarinu v oleji zjištěny alkalické adukty $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$ v oblasti 263 a 279 m/z .

Zatímco alizarin byl v alizarinových lacích (vzorových modelech) identifikován poměrně snadno, u purpurinu v purpurinových lacích (purpurinový lak, purpurinový lak v oleji a

purpurinový lak v temperě) výsledky jednoznačné nebyly. U purpurinového laku v oleji se podařil určit v pozitivním módu sodný adukt purpurinu $[M+Na]^+$ v oblasti $279\ m/z$.



Obrázek 29. Hmotnostní spektra alizarinového laku a alizarinového laku v oleji, měřené v negativním i pozitivním módu. Alizarin ($M_r = 240,21$). V pozitivním módu byly také u alizarinu v oleji zjištěny alkalické adukty $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$ v oblasti 263 a $279\ m/z$.



Obrázek 30. Hmotnostní spektra purpurinového laku, purpurinového laku v oleji a purpurinového laku v tempeře – měřené v negativním a pozitivním módu. Purpurin ($M_r = 256,21$). U purpurinového laku v oleji, v pozitivním módu, byl ale zjištěn sodný adukt purpurinu $[M+Na]^+$ v oblasti $279\ m/z$.

4.2 Pyranová barviva a pigmenty

Pyranová barviva a pigmenty jsou stabilní ve své molekulové struktuře. Všechny vzorky (xanthon, flavanon, flavon, apigenin, baicalein, chrysin, kvercetin, morin hydrát, rhamnetin, isorhamnetin a chromon /Příloha 2/ byly dle svých molekulových hmotností v hmotnostních spektrech identifikovány. Příčiny nepřesností měření byly obdobného charakteru jako u barviv anthrachinonových. V oblastech molekulových hmotností byly tedy ve všech vzorcích pyranových barviv kromě kyseliny taninové (tab. VIII) zjištěny průkazně radikály (M^{*+} resp. M^{*-}) – základní píky. U chromonu ($M_r = 146,14$) se vyskytoval v pozitivním módu málo intenzivní signál základního píku (a. i.: 1292).

Metodou LDI nemohla být identifikována, snad pro svoji velikou relativní molekulovou hmotnost ($M_r = 1701,20$) kyselina taninová. Molekula kyseliny taninové neposkytla ani alkalické molekulové adukty, ba dokonce ani molekulové dimery. V hmotnostních spektrech byly však nalezeny intenzivní píky v oblasti měrného náboje iontů 153 a 305 (m/z), což odpovídalo s největší pravděpodobností fragmentům molekuly (obr. 31). Tyto výsledky byly

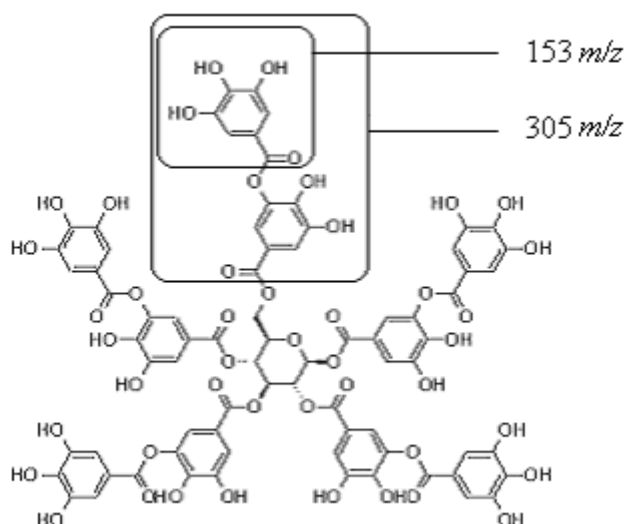
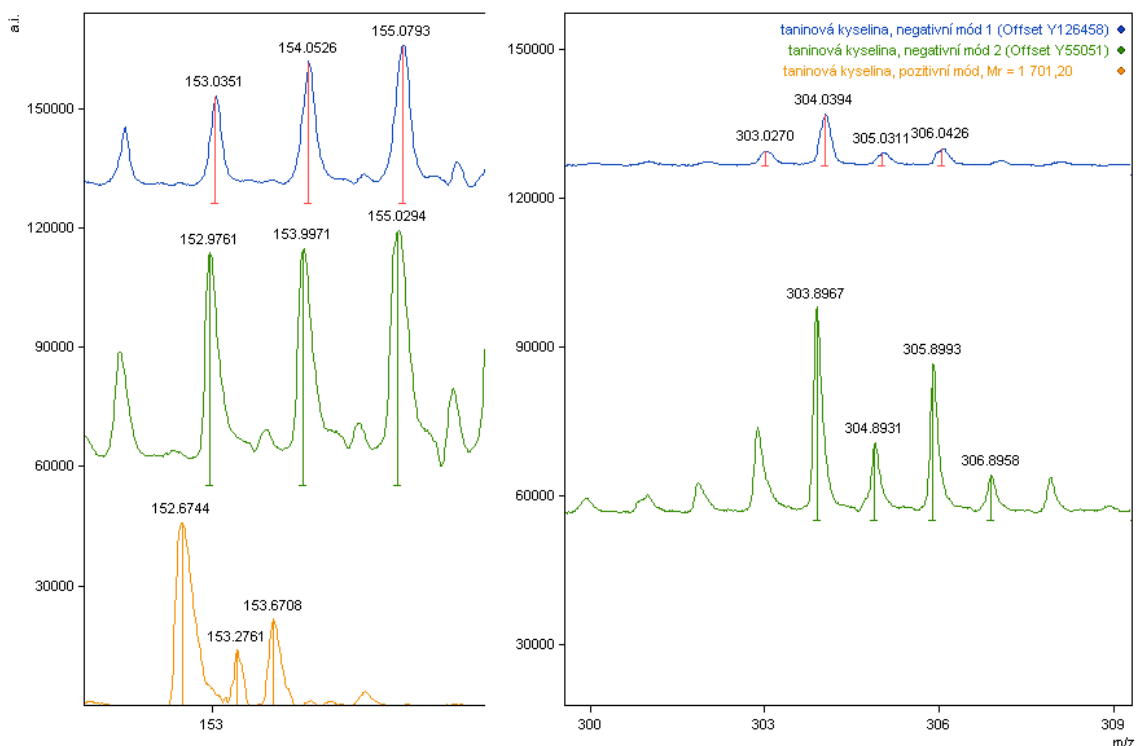
ověřovány dvojím měřením v negativním módu. V pozitivním módu byl identifikován pouze fragment o měrném náboji iontů 153 (m/z). Vysvětlení fragmentace molekuly by mohlo spočívat v nestabilních esterových vazbách molekulové struktury, které jsou ve vodném prostředí náchylné k hydrolýze.

U vzorků flavonů a flavonolů byly zjištěny sodné adukty $[M+Na]^+$. Flavon, kvercetin a rhamnetin tvořily také adukty draselné $[M+K]^+$ v oblasti 261, 341 a 355 m/z . Všechny alkalické molekulové adukty byly naměřeny v pozitivním módu.

Analyzované látky xanthon, flavon a apigenin tvořily také molekulové dimery.

Tabulka VIII. Vyjadřuje hlavní charakteristické ionty při zkoumání pyranových barviv pomocí LDI.

Pyranová barviva/ Mr	M⁺/ M⁻ základní píky (m/z)	[M+Na]⁺ (m/z)	[M+K]⁺ (m/z)	dimer analytu (m/z)
Xanthon 196,21	196	-	-	392
Flavanon 224,25	224	-	-	-
Flavon 222,24	222	245	261	444
Apigenin 270,24	270	293	-	540
Baicalein 270,24	270	293	-	-
Chrysin 254,24	254	277	-	-
Kvercetin 302,24	302	325	341	-
Morin hydrát 302,24	302	325	-	-
Rhamnetin 316,26	316	339	355	-
Isorhamnetin 316,26	316	339	-	-
Chromon 146,14	146	-	-	-
Taninová kyselina 1701,20	-	-	-	-



Obrázek 31. Hmotnostní spektrum kyseliny taninové ($M_r = 1701,20$) v pozitivním a ve dvou měření v negativním módu, kdy molekula fragmentuje o měrném náboji iontů $153 (m/z)$ a $305 (m/z)$.

Modelové vzorky pyranových barviv byly zastoupeny chrysinovými (chrysinový lak, chrysinový lak v oleji, chrysinový lak v tempeře) a kvercetinovými laky (kvercetinový lak, kvercetinový lak v oleji, kvercetinový lak v tempeře).

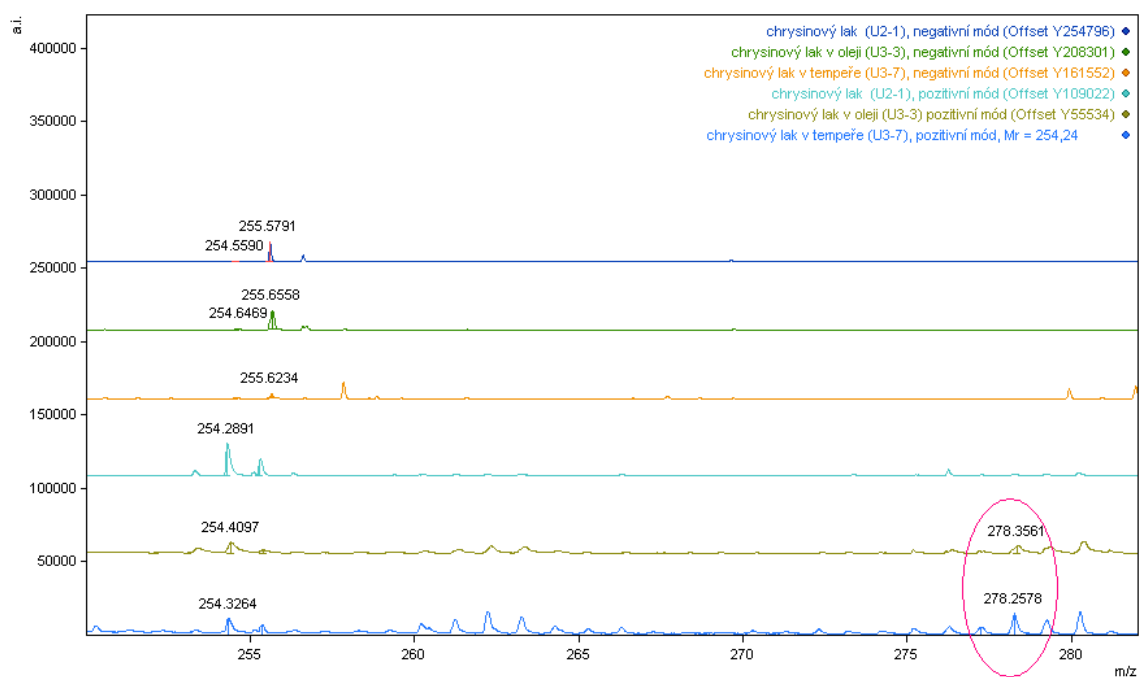
Chrysin byl dle své relativní molekulové hmotnosti ($M_r = 254,24$) identifikován v chrysinových lacích (obr. 32) v pozitivním módu. U chrysinového laku v oleji a

chrysinového laku v tempeře byly určeny v pozitivním módu sodné adukty chrysinu $[M+Na]^+$ v oblasti 277 m/z .

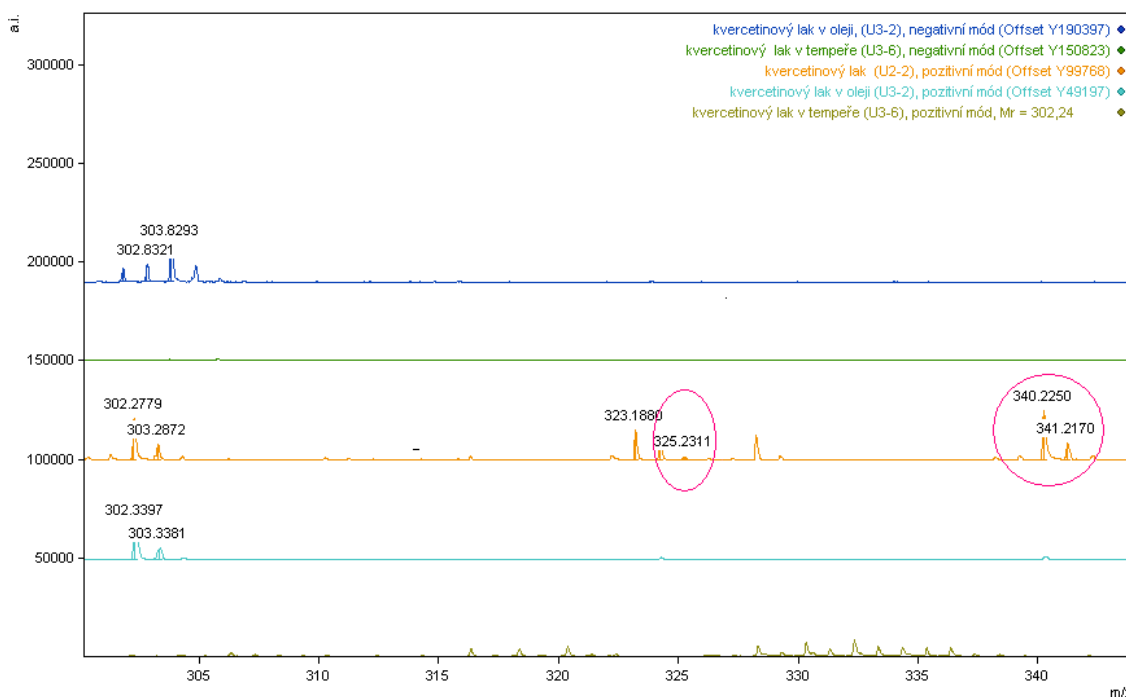
Kvercetin byl pomocí LDI naměřen v samotném kvercetinovém laku a kvercetinovém laku v oleji (obr. 33). Měrný náboj iontů v oblasti 302 (m/z) odpovídal relativní molekulové hmotnosti kvercetinu ($M_r = 302,24$).

Samotný kvercetinový lak v pozitivním módu poskytl také alkalické adukty kvercetinu $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$ v oblastech 325 a 341 m/z . (Samotný kvercetinový lak byl měřen pouze v pozitivním módu.)

Kvercetinový lak v tempeře neukázal v měřených oblastech žádné píky kvercetinu, a proto nebyl identifikován ani v pozitivním, ani v negativním módu. Je možné, že měření rušila tempera, která zastínila měřené píky kvercetinu.



Obrázek 32. Srovnání hmotnostních spekter chrysinového laku, chrysinového laku v oleji a chrysinového laku v tempeře – měřené v negativním a pozitivním módu. Chrysin ($M_r = 254,24$). U chrysinového laku v oleji a v tempeře byly určeny v pozitivním módu sodné adukty chrysinu $[M+Na]^+$ v oblasti 277 m/z .

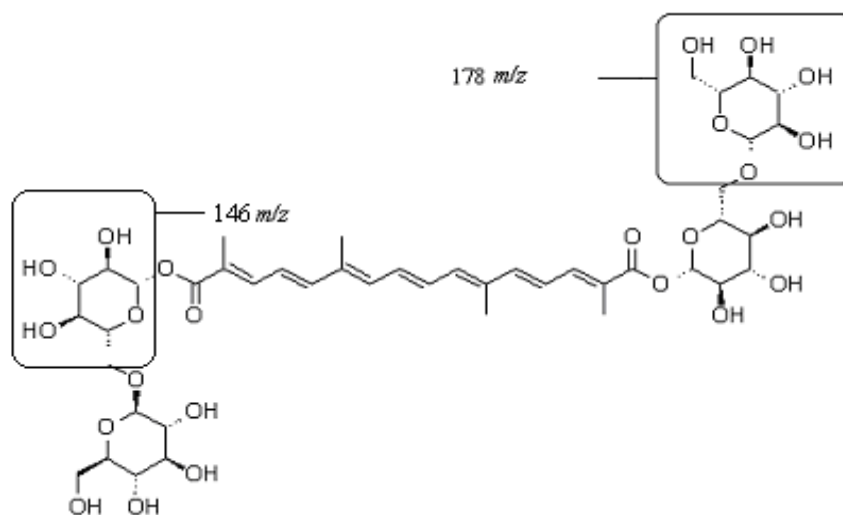
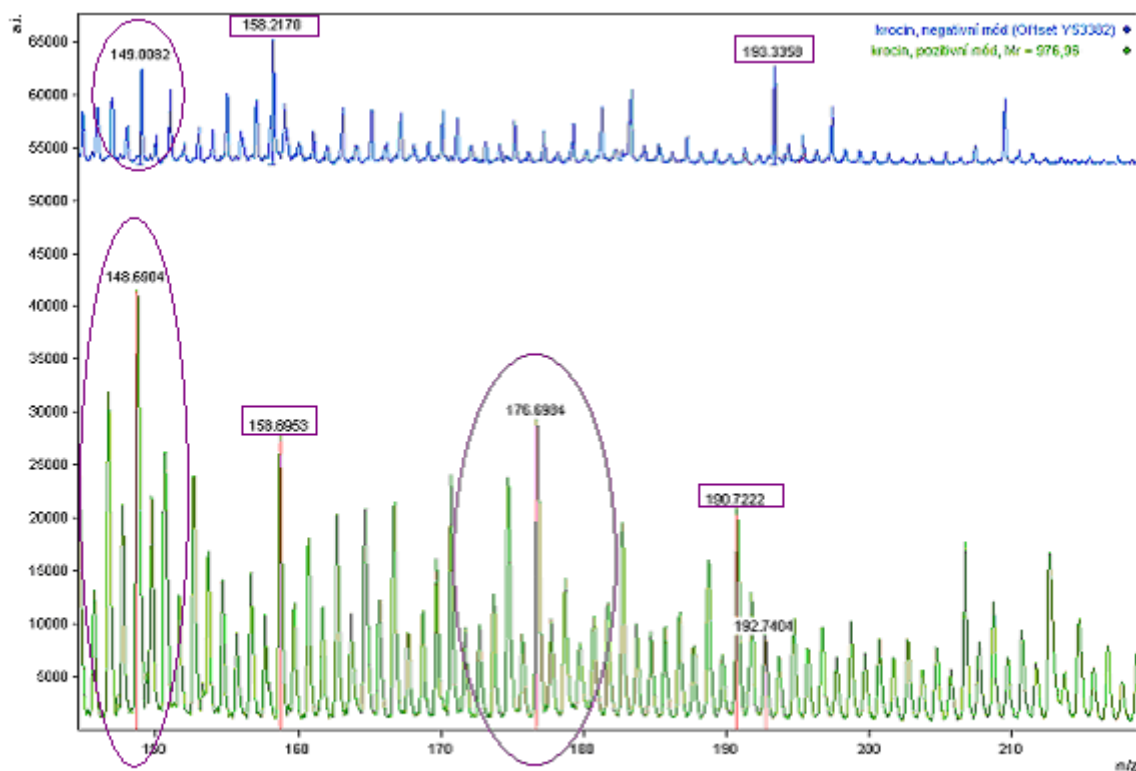


Obrázek 33. Hmotnostní spektra kvercetinového laku (měření v pozitivním módu), dále potom kvercetinového laku v oleji a kvercetinového laku v tempeře – měřené v negativním a pozitivním módu. Kvercetin ($M_r = 302,24$). Samotný kvercetinový lak v pozitivním módu poskytl také alkalické adukty kvercetinu $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$ v oblastech 325 a 341 m/z .

4.3 Karotenoidní barviva a pigmenty

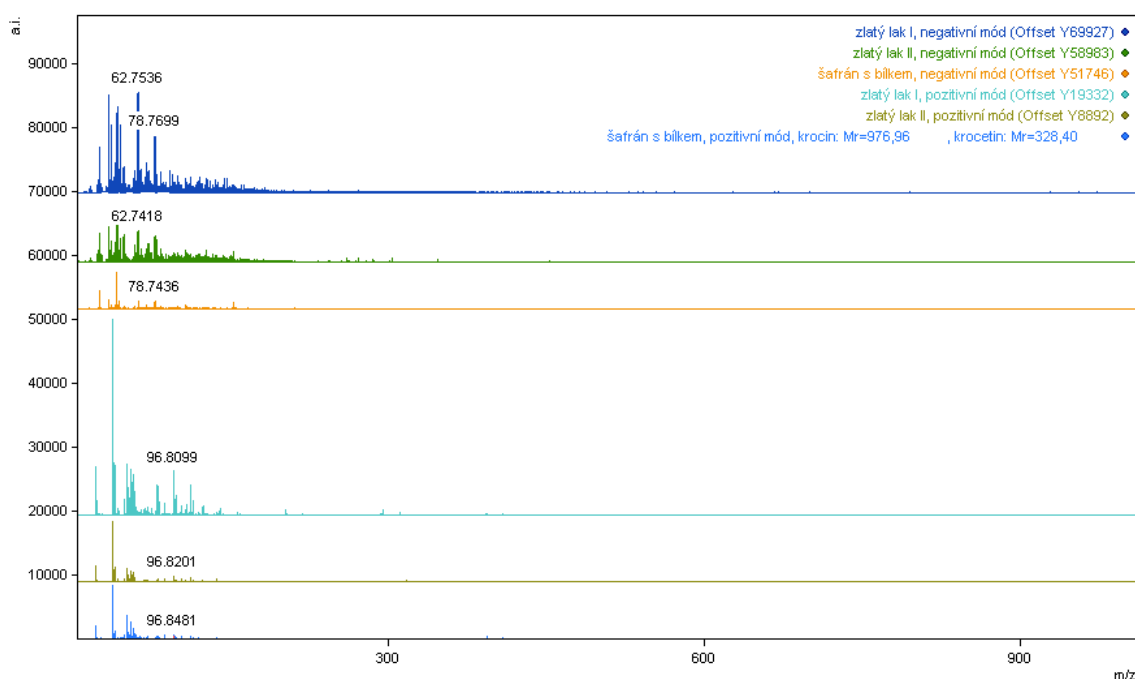
Experimentálně bylo zjištěno, že krocín má velmi stabilní chemickou strukturu ve 20ti uhlíkatém skeletu konjugovaných vazeb, přičemž další části molekuly snadno fragmentují: například glykosidická vazba C—O mezi monoglykosidem (s měrným nábojem iontů 178 m/z) a zbytkem molekuly, nebo esterová vazba C—O, která vzniká při biosyntéze krocínu (digentiobiosylester krocetinu) esterifikací krocetinu a disacharidu gentiobiosy za přítomnosti enzymu glykosyltransferasy. Vzniká tak fragmentovaná molekulová struktura o měrném náboji iontů 146 m/z (obr. 34). Fragmentace molekuly je dána pravděpodobně velikou molekulovou hmotností krocínu ($M_r = 976,96$) a nestabilními glykosidickými a esterovými vazbami (viz. výše). Ze srovnání hmotnostních spekter pozitivního a negativního módu bylo zjištěno, že k fragmentaci molekuly krocínu (tvorbě intenzivních píků) dochází i v oblastech 158 m/z a 190-192 m/z . Důvod této fragmentace a tvorby intenzivních píků je předmětem dalšího zkoumání.

Nepřesnosti při měření vznikaly při kalibraci přístroje, bylo také potřeba počítat s již zmiňovanou přesností měření hmotnostního spektrometru $\pm 0,2$ Da.



Obrázek 34. Srovnání hmotnostních spekter krocínu ($M_r = 976,96$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V molekule krocínu se objevují fragmenty měrných nábojů iontů 146 (m/z) a 178 (m/z).

Příkladem modelových vzorků u karetenoidů byly šafránové laky (zlatý lak I, zlatý lak II a šafrán s bílkem) (obr. 35). Z měření hmotnostních spekter šafránových laků v pozitivním i negativním módu, nebyl identifikován ani krocín ($M_r = 976,96$), ani krocetin ($M_r = 328,40$). Důvodem negativních výsledků měření šafránových laků může být opět velká molekulová hmotnost krocínu (resp. krocetinu). Fragmenty, naměřené v hmotnostních spektrech při identifikaci samotného krocínu, u laků obsahující taktéž pigment krocín, nebyly prokázány. Identifikované látky mohly být rušeny v hmotnostních spektrech složkami laků.



Obrázek 35. Srovnání hmotnostních spekter šafránových laků (měřené v negativním i pozitivním módu), krocín ($M_r = 976,96$), krocetin ($M_r = 328,40$).

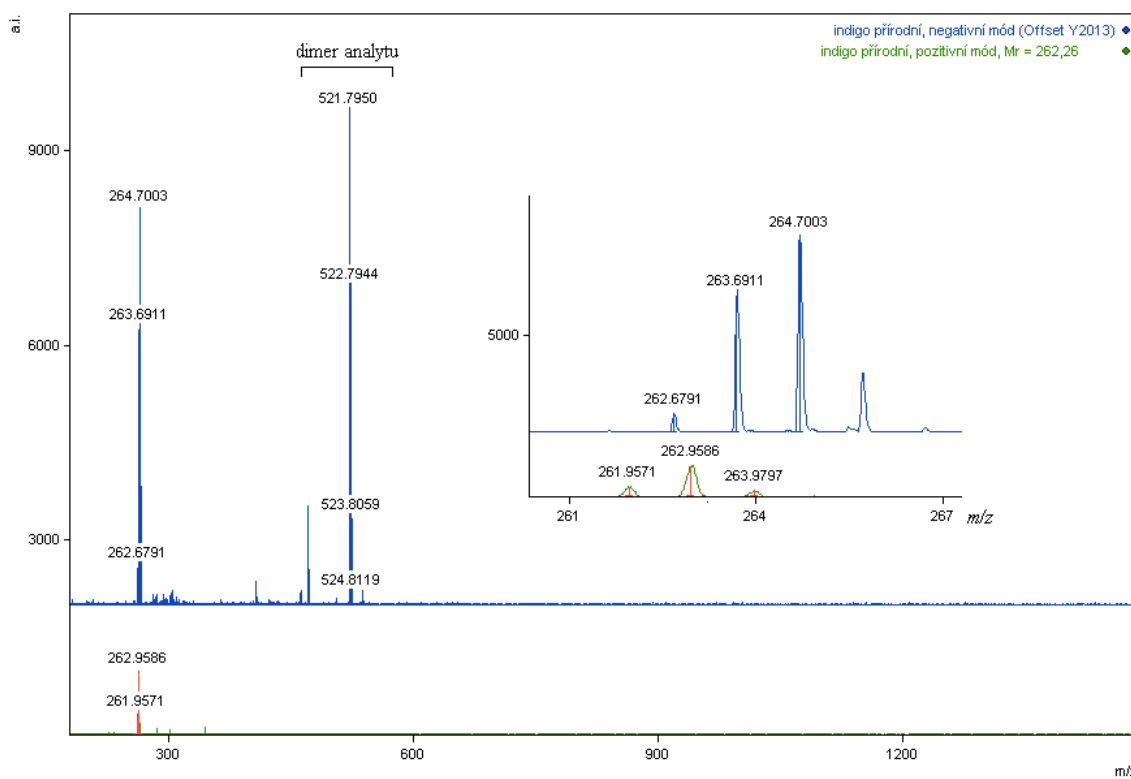
4.4. Indolová a pyrrolová barviva a pigmenty

Předpokladem měření vzorků uměleckého díla *Procházka* z roku 1936 od autora Josefa Čapka bylo dokázat pomocí LDI modrý pigment indigo, který byl v roce 1936 běžně používaným uměleckým pigmentem modré barvy.

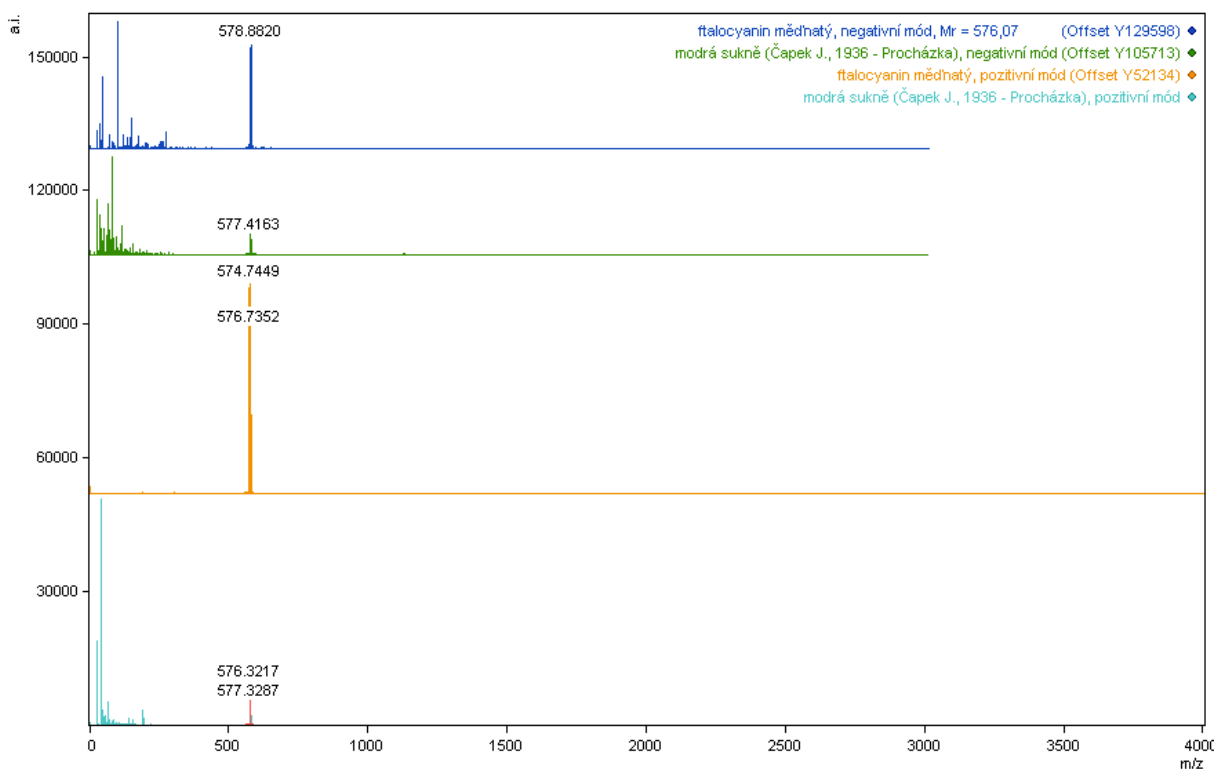
Porovnáním hmotnostních spekter odebraných vzorků a hmotnostních spekter pigmentu indiga (obr. 36) bylo zjištěno, že se hmotnostní spektra odebraných vzorků se neshodují s hmotnostními spektry přírodního indiga, ale s hmotnostními spektry modrého pigmentu ftalocyaninu měďnatého ($M_r = 576,07$) (obr. 37,38). Ten byl jako pigment představen

na výstavě v Londýně teprve roku 1935 a jako umělecký pigment byl rozšířen až od roku 1938. [63].

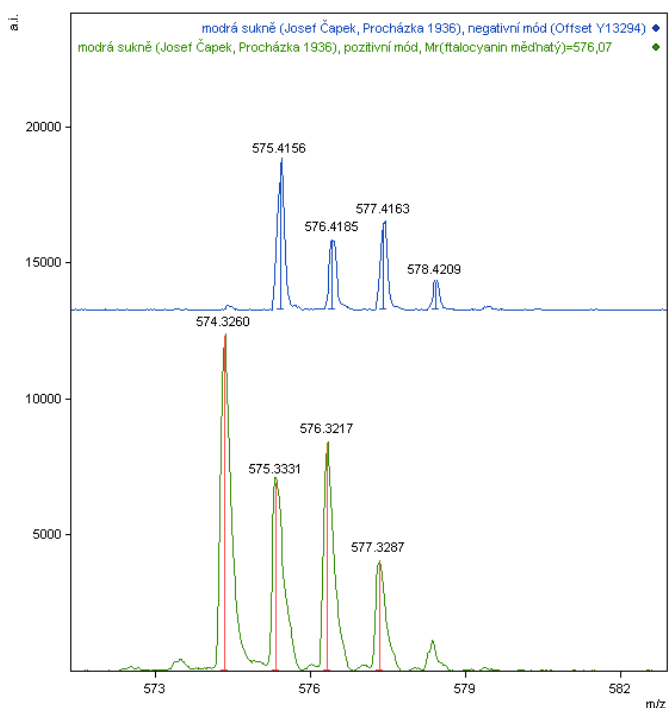
Z tohoto důvodu bylo prokázáno, že zkoumaný nástěnný obraz od Josefa Čapka s názvem *Procházka* z roku 1936 nemohl být originálním uměleckým dílem, nýbrž falzem.



Obrázek 36. Srovnání hmotnostních spekter indiga (měřené v negativním i pozitivním módu), indigo ($M_r = 262,26$). V oblasti 524 m/z (negativní mód) je tvořen dimer analytu.



Obrázek 37. Porovnání hmotnostních spekter odebraných vzorků uměleckého a hmotnostních spekter ftalocyaninu měďnatého (měřené v negativním i pozitivním módu), ftalocyanin měďnatý (Mr = 576,07).



Obrázek 38. Srovnání hmotnostních spekter odebraných vzorků uměleckého díla (měřené v negativním i pozitivním módu), ftalocyanin měďnatý (Mr = 576,07).

5. ZÁVĚR

Výsledná LDI hmotnostní spektra představovala tvorbu základních píků (radikálů), jednoduchých alkalických (sodných či draselných) aduktů. Zároveň byla pozorována také fragmentace molekul a tvorba dimerů analytů.

Vybraná přírodní organická barviva a pigmenty s relativní molekulovou hmotností iontů do 500 Da pomocí LDI MS bez matrice byla identifikována. Podařilo se určit i ftalocyanin měďnatý s relativní molekulovou hmotností 576,07, který není sice přírodní organickou látkou, ale výsledky kvalitativní analýzy pomocí LDI MS byly prokazatelné. Základní píky podléhaly často izotopové distribuci v okolí své příslušné relativní molekulové hmotnosti.

Při měření vzorků vznikaly alkalické adukty (sodné a draselné kationty) pouze v pozitivním módu. Anthrachinonová barviva tvořila sodné adukty kromě kyseliny karmínové. Sodné adukty pyranových barviv byly určeny u všech flavonů a flavonolů.

Draselné adukty tvořilo například anthrachinonové barvivo purpurin, dále potom pyranová barviva flavon, kvercetin a rhamnetin.

Porovnáním spekter modelových vzorků alizarinových a purpurinových laků vyplývá, že alkalické adukty alizarinu a purpurinu ($[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$) vznikaly pouze u těchto laků v oleji. Chrysin tvořil pouze sodné adukty, a to jak v oleji, tak v tempeře. Kvercetin a jeho alkalické adukty byly určeny pouze v samotném kvercetinovém laku.

Obecně menší četnost výskytu molekulových aduktů (především sodných a draselných kationtů, vyskytující se pouze v pozitivním módu) může naznačovat, že by měření v negativním módu mohlo být preferováno pro rychlou identifikaci látek dle svých molekulových hmotností.

V hmotnostních spektrech byly pozorovány také dimery analytů. Z anthrachinonových barviv tvořil dimer analytu jen emodin, z pyranových barviv xanthon, flavon a apigenin, z indolových barviv potom indigo. Barviva či pigmenty obsažená v modelových vzorcích laků dimery molekulových hmotností zkoumaných barviv a pigmentů netvořila. Taktéž nebyly pozorovány žádné trimery analytů.

V místě kvalitativní analýzy (m/z) se vyskytovaly také píky s malou intenzitou signálu nebo se dokonce píky neobjevovaly vůbec. Aby měření přineslo výsledek, je třeba kombinovat jak režim negativní, tak pozitivní.

Přírodní barviva a pigmenty s relativní molekulovou hmotností iontů nad 500 Da (krocín a kyselina taninová) se podle svých molekulových hmotností identifikovat – bez jejich

molekulových fragmentací – nepodařilo. Příčinou byly pravděpodobně nestabilní chemické vazby molekul (glykosidické vazby v molekule krocínu, esterové vazby v molekule krocínu a kyseliny taninové). Kyselina karmínová fragmentovala v chemické vazbě C—C mezi uhlíkem C7 anthrachinonového skeletu a uhlíkem C2 tetrahydropyranového zbytku, avšak také se podařila identifikace celé molekuly kyseliny karmínové dle své příslušné molekulové hmotnosti.

Krocín ani krocetín (hlavní barviva získávaná ze šafránových blizen) v šafránových lacích identifikována nebyla. Co bylo důvodem těchto negativních výsledků, je předmětem dalšího zkoumání.

V případně shodných molekulových hmotností strukturně odlišných látek nelze jednoznačně identifikaci pomocí LDI MS uplatnit. Proto je pro kvalitativní analýzu vhodné kombinovat LDI MS s jinými analytickými metodami.

Výhodou analytické metody LDI MS je její rychlá spolehlivá identifikace bez chemických a časově náročných předběžných ošetření (rychlá příprava vzorků k identifikaci spolu s přínosem okamžitých výsledků). LDI MS může být také využita k ověření pravosti uměleckých děl a v restaurátorství, protože je považována za téměř nedestruktivní metodu, která analyzuje velmi malé množství vzorků.

Vizí do budoucna je prověřit například kyselinu taninovou, krocín nebo další přírodní organická barviva (pigmenty) s velkými molekulovými hmotnostmi pomocí LDI MS s využitím NALDI (desorpce a ionizace za účasti nanopovrchu). Povrch z křemíkových nanovláken by mohl zamezit nežádoucí fragmentaci iontů.

6. LITERATURA

- [1] HOLEČKOVÁ, M. *Šátečková modř*. Praha, 9.4. 2010. Bakalářská práce. Pedf UK, Praha.
- [2] LEE, D. W. *Nature's palette: the science of plant color*. Vyd. 1. Chicago: University of Chicago Press, 2007, 409 s. ISBN 02-264-7052-0.
- [3] Barviva: klasifikace a základní vlastnosti barviv. *Www.jergym.cz* [online]. 8.5.2010 [cit. 2011-12-28]. Dostupné z: <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/barva/a/b.html>.
- [4] Barviva. *Http://www2.zf.jcu.cz/* [online]. [cit. 2012-01-02]. Dostupné z: <http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Barviva.htm>.
- [5] ŠIMŮNKOVÁ, E., KARHAN, J. *Pigmenty, barviva a metody jejich identifikace*. Vyd. 1. Technická 5, 166 28 Praha 6 : VŠCHT Praha, 1993. 113 s. ISBN 80-7080-194-8.
- [6] ZAHRADNÍK, M. *Barviva používaná v technické praxi*. Vyd. 1. Spálená 51, 113 02 Praha 1 : SNTL-Nakladatelství technické literatury, n. p., 1986. 352 s.
- [7] MORGANS, W. M. *Outlines of Paint Technology*. Vyd. 3.. London: Edward Arnold, 1990. 503 s.
- [8] JIRÁSEK, J., VAVRO, M. *Nerostné suroviny a jejich využití*. Ostrava: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR & Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2008. ISBN 978-80-248-1378-3.
- [9] SLÁNSKÝ, B. *Technika v malířské tvorbě : Malířský a restaurátorský materiál*. Vyd. 1. Spálená 51, 113 02 Praha 1 : SNTL-Nakladatelství technické literatury, n. p., 1973. 192 s.
- [10] *Http://www.jergym.hiedu.cz/* [online]. 11.3.2002, 11.3.2002 [cit. 2011-11-14]. Dostupné z WWW: <<http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/barva/b.pdf>>.
- [11] BORODKIN, V. F. *Chemie organických barviv*. 1. Praha : SNTL-Nakladatelství technické literatury, n. p., 1987. Struktura barviv a barva, s. 19-21. ISBN 04-621-87.
- [12] Spektrofotometrie. In *Wikiskripta* [online]. Praha : MEFANET, 18.8.2009, stránka naposledy změněna 22.9.2011 [cit. 2011-11-18]. Dostupné z WWW: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Spektrofotometrie>>.
- [13] KOGAN, J. M. *Chemie barviv*. 1. Praha : SNTL-Státní nakladatelství technické literatury, n. p., 1960. 744 s.
- [14] Thermo-chromism. In *Wikipedia : the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 9.3. 2005, last modified on 30.11. 2011 [cit. 2011-12-05]. Dostupné z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Thermo-chromism>>.

- [15] ISO 105-A02. *Textiles-Tests for colour fastness-Part A02: Grey scale for assessing change in colour*. 4. GB-London: British Standards Institution, 1993. 59: 080, 01. Dostupné z: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=3785.
- [16] HOFENK DE GRAAFF, J. H., W. G. TH ROELOFS. *The colourful past: origins, chemistry and identification of natural dyestuffs*. 1. Riggisberg, Switzerland: Abegg-Stiftung, 2004. ISBN 1873132131, 9781873132135.
- [17] ISO 105-B02. *Textiles-Tests for colour fastness-Part B02: Colour fastness to artificial light: Xenon arc fading lamp test*. 4. GB-London: British Standards Institution, 1994. 59: 080, 01. Dostupné z: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=20023.
- [18] WYPLOSZ, N. *Laser desorption mass spectrometric studies of artists' organic pigments*. Amsterdam, The Netherlands, 2003. 212 s. Dizertační práce. FOM Institute for Atomic and Molecular Physics, Amsterdam, The Netherlands. ISBN 90-77209-02-6.
- [19] Www.referaty10.com: Sumerská civilizace. [online]. [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://www.referaty10.com/referat/Dejepis-Historie/2/tema-2-50-Dejepis-Historie.php>.
- [20] Pigment. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001, 18.2.2012 [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pigment>.
- [21] O'HANLON, G. Historical pigments: Hues or Mixed Colors of Historical Origin. [online]. © 2012, 7.2.2012 [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://www.naturalpigments.com/vb/list.php/category/116-Historical-Pigments>.
- [22] KUČEROVÁ, I. Materiály památkových objektů: Pigmenty. In: *Www.vscht.cz* [online]. VŠCHT Praha: Ústav chemické technologie restaurování památek [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/rud/sklad/studium/mpo/pigmenty.pdf>.
- [23] KARAPANAGIOTIS, I. Identification of Natural Organic Dyes Used in Art Objects of the Cultural Heritage of the S.E. Mediterranean Area by High Performance Liquid Chromatography. In: *International Meeting: Icons: Approaches to research, conservation and ethical issues* [online]. Athens, 2006 [cit. 2012-02-20]. Dostupné z: <http://www.iconographyalmanac.com/pdf/karapanagiotis.pdf>.
- [24] KUCKOVA, S., NEMEC, I., HYNEK, R., HRADILOVA, J., GRYGAR, T. Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, roč. 382, č. 2, s. 275-282. ISSN 1618-2642. DOI:

- 10.1007/s00216-005-3108-5. Dostupné z:
<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00216-005-3108-5>.
- [25] KARAPANAGIOTIS, I., MINOPOULOU, E., VALIANOU, L., DANILIA, S., CHRYSSOULAKIS, Y. Investigation of the colourants used in icons of the Cretan School of iconography. *Analytica Chimica Acta*. 2009-08-11, roč. 647, č. 2, s. 231-242. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2009.06.012. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009007430>.
- [26] KARAPANAGIOTIS, I., SIST, DANILIA, TSAKALOF, A., CHRYSSOULAKIS, Y. Identification of Red Natural Dyes in Post-Byzantine Icons by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography* [online]. 2005-02-23, roč. 28, č. 5, s. 739-749 [cit. 2012-03-05]. ISSN 1082-6076. DOI: 10.1081/JLC-200048896. Dostupné z:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-200048896>.
- [27] LÓPEZ-MONTES, A., BLANC GARCÍA, R., ESPEJO, T., HUERTAS-PEREZ, J. F., NAVALÓN, A., VÍLCHEZ, J., L. Simultaneous identification of natural dyes in the collection of drawings and maps from The Royal Chancellery Archives in Granada (Spain) by CE. *ELECTROPHORESIS*. 2007, roč. 28, č. 8, s. 1243-1251. ISSN 01730835. DOI: 10.1002/elps.200600446. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200600446>.
- [28] MAGUREGUI, M., ALONSO, R., BARANDIARAN, M., JIMENEZ, R., GARCIA, N. Micellar electrokinetic chromatography method for the determination of several natural red dyestuff and lake pigments used in art work. *Journal of Chromatography A*. 2007-06-22, roč. 1154, 1-2, s. 429-436. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.089. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307006140>.
- [29] CORREIA, A. M., CLARK, R. J. H., RIBEIRO, M. I. M., DUARTE, M. L. T. S. Pigment study by Raman microscopy of 23 paintings by the Portuguese artist Henrique Pousão (1859?1884). *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2007, roč. 38, č. 11, s. 1390-1405 [cit. 2012-03-05]. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.1786. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1786>
- [30] PUCHALSKA, M., POŁEĆ-PAWLAK, K., ZADROZNA, I., HRYSZKO, H., JAROSZ, M. Identification of indigoid dyes in natural organic pigments used in historical art objects by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2004, roč. 39, č. 12, s. 1441-1449 [cit. 2012-03-05]. ISSN 1076-5174. DOI: 10.1002/jms.728. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.728>.

- [31] BURGIO, L., CLARK, R. J. H., MURALHA, V. S. F., STANLEY, T. Pigment analysis by Raman microscopy of the non-figurative illumination in 16th- to 18th-century Islamic manuscripts. *Journal of Raman Spectroscopy*[online]. 2008, roč. 39, č. 10, s. 1482-1493 [cit. 2012-03-05]. ISSN 03770486. DOI: 10.1002/jrs.2027. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.2027>.
- [32] Colour Index International. *Www.colour-index.com* [online]. United Kingdom: Society of Dyers and Colourists and American Association of Textile Chemists and Colorists, 2011, 2.1. 2012 [cit. 2012-01-02]. Dostupné z: <http://www.colour-index.com/en/introduction/index.cfm>.
- [33] POLÍVKA, F. Užitéčné a pamětihodné rostliny cizích zemí: Mořena barviřská (*Rubia tinctorum*). [online]. [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?324>.
- [34] Přírodní barevné látky[online]. Praha: Česká společnost chemická, 2005 [cit. 2012-02-21]. ISSN Chem. Listy 99, 802 – 816 (2005). Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_11_802-816.pdf.
- [35] MOUDRÝ, J. Barviva. [online]. [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Barviva.htm>.
- [36] Šelak. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 11.7.2011 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0elak>.
- [37] Emulgatory.cz: E904 - Šelak. [online]. © 2010 [cit. 2012-02-21]. Dostupné z: <http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E904>.
- [38] *Leccos: Alizarin* [online]. [cit. 2012-02-22]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/alizarin>.
- [39] STRATIL, P. Barviva v potravinách. *Share.centrax.cz* [online]. Brno: MENDELU [cit. 2012-02-22]. Dostupné z: http://share.centrax.cz/CPO-9-12_Barviva_v_potravinach,_str_306-336.pdf.
- [40] Alizarin. *R&D Chemicals: Chemical catalog* [online]. © 2006-2012 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7496.
- [41] Product Article: The History and Production of Rose Madder and Alizarin pigments. *Winsor & Newton: The World's Finest Artists' Materials* [online]. © 2003 - 2011 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: <http://www.winsornewton.com/resource-centre/product-articles/rose-madder-and-alizarin>.

- [42] Chemical information search: Emodin, Frangula. *Chemindustry.com* [online]. © 1999-2012 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z:
<http://www.chemindustry.com/chemicals/085097.html>.
- [43] Emodin. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Emodin>.
- [44] Emodin. *ChemicalBook* [online]. © 2010 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z:
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB2258856.htm.
- [45] Karmín. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 10. 2. 2012 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Karm%C3%Adn>.
- [46] Slovník: Slovník ke čtení historických receptů. HŘEBÍČKOVÁ, B. A. *Sandragon* [online]. 27.9.2007 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: <http://sandragon-sandragon.blogspot.com/2009/09/slovník-odborných-terminů-abfeil-z.html>.
- [47] Historické panorama zušlechtování 1. *Škola textilu* [online]. [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: <http://www.skolertextilu.cz/history/zus/index.html>.
- [48] 100211 Kyselina karmínová (C.I. 75470). *Merck Chemicals* [online]. Germany: Merck KGaA, Darmstadt, 2012 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: http://www.merck-chemicals.com/czech-republic/kyselina-karminova-c-i-75470/MDA_CHEM-100211/p_G5ib.s1LZb4AAA EWZuEfVhTl.
- [49] LACASSE, K., BAUMANN, W. *Textile chemicals: environmental data and facts*. New York: Springer, 2004, s. 335-337. ISBN 3-540-40815-0.
- [50] TARASOVIČOVÁ, M. Garcinia. *NWA* [online]. © 2011 [cit. 2012-02-24]. Dostupné z: <http://maria-nwa.cz/produkty/garcinia.html>.
- [51] Xanthon. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 13.5.2011 [cit. 2012-02-24]. Dostupné z:
<http://de.wikipedia.org/wiki/Xanthon>.
- [52] ANDERSEN, Ø. M., MARKHAM, K. R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor, 2006, 1237 s. ISBN 08-493-2021-6.
- [53] SAHELIAN, R. Apigenin. *Raysahelian.com* [online]. © 2011 [cit. 2012-02-24]. Dostupné z: <http://www.raysahelian.com/apigenin.html>.
- [54] Baicalein. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 16.1.2012 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Baicalein>.

- [55] Baicalein. *Cayman Chemical Company* [online]. USA, 2012 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/70610>.
- [56] Chrysin (Passiflora coerulea). *Physicians' Select Herbal Supplements* [online]. [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <http://www.physiciansselect.co.uk/chrysin-passiflora-coerulea-information.htm>.
- [57] WOLFMAN, C., VIOLA, H., PALADINI, A., DAJAS, F., MEDINA, J. H. Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from Passiflora Coerulea. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* [online]. 1994, roč. 47, č. 1, s. 1-4 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305794901031>.
- [58] Isorhamnetin. *ChemicalBook* [online]. © 2010 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0472359.htm.
- [59] What Is Tannic Acid?. *WiseGEEK* [online]. © 2003 - 2012 [cit. 2012-02-26]. Dostupné z: <http://www.wisegeek.com/what-is-tannic-acid.htm>.
- [60] 1401-55-4 Tannic acid. *Cas.ChemNet.com* [online]. 2012 [cit. 2012-02-26]. Dostupné z: <http://www.chemnet.com/cas/es/1401-55-4/Tannic-acid.html>.
- [61] KHADEM, S., MARLES, R. J. Chromone and Flavonoid Alkaloids: Occurrence and Bioactivity. *Molecules* [online]. 2012, roč. 17, č. 1, s. 191-206 [cit. 2012-02-26]. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules17010191. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/1/191/>.
- [62] Chromone. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 19.1.2012 [cit. 2012-02-26]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chromone>.
- [63] ŠIMŮNKOVÁ, E., BAYEROVÁ, T. Pigmenty. *STOP*. Praha: Společnost pro technologie opravy památek, 1999. s. 82.
- [64] FITZGERALD, M.C., PARR, G.R, SMITH, L.M. Basic matrixes for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Analytical chemistry* [online]. 1993, roč. 65, č. 11, s. 3204-3211 [cit. 2012-03-21]. DOI: 10.1021/ac00070a007. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00070a007>.
- [65] Matrix-assisted laser desorption/ionization: Matrix. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 19.2.2012 [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Matrix-assisted_laser_desorption/ionization#Matrix.

- [66] STRUPAT, K., KARAS, M., HILLENKAMP, F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1991, roč. 111, č. 12, 89–102. DOI: 10.1016/0168-1176(91)85050-V. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016811769185050V>.
- [67] BEAVIS, R.C., CHAIT, B.T., STANDING, K.G. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid communications in mass spectrometry* [online]. 1989, roč. 3, č. 12, s. 436-439 [cit. 2012-03-21]. DOI: 10.1002/rcm.1290031208. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1290031208>.
- [68] BEAVIS, R.C., CHAIT, B.T., FALES, H.M. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid communications in mass spectrometry* [online]. 1989, roč. 3, č. 12, s. 432-435 [cit. 2012-03-21]. DOI: 10.1002/rcm.1290031207. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1290031207>.
- [69] BEAVIS, R.C., CHAUDHARY, T., CHAIT, B.T. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* [online]. 1992, roč. 27, č. 2, s. 156-158 [cit. 2012-03-21]. DOI: 10.1002/oms.1210270217. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/oms.1210270217>.
- [70] TANG, K., TARANENKO, N.I, ALLMAN, S.L., CHÁNG, L.Y., CHEN, C.H., LUBMAN, D.M. Detection of 500-nucleotide DNA by laser desorption mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*[online]. 1994, roč. 8, č. 9, s. 727-730 [cit. 2012-03-21]. DOI: 10.1002/rcm.1290080913. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1290080913>.
- [71] WU, K.J., STEDING, A., BECKER, C.H. Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix. *Rapid communications in mass spectrometry* [online]. 1993, roč. 7, č. 2, s. 142-146 [cit. 2012-03-21]. DOI: 10.1002/rcm.1290070206. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1290070206>.
- [72] POUSTKA, J. *Hmotnostní spektrometrie - Mass Spectrometry (MS)*. VŠCHT, Praha, 2007. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20MS%20PRINCIP%20A%20IONI%20ZACE%20%20102007.pdf>.
- [73] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.

- [74] CRHOVÁ, M. *Studium vlivu umělého stárnutí na identifikaci proteinových aditiv v historických maltách*. Praha, 2009. Diplomová práce. VŠCHT v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie.
- [75] HAVLIŠ, J. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* [online]. Praha: Euromedia Group, 1999, roč. 78, č. 8, s. 448 [cit. 2012-02-27]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof>.
- [76] Hmotnostní spektrometrie proteinů a peptidů pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI MS). *Ústav biochemie a mikrobiologie: VŠCHT, Praha* [online]. 2005 [cit. 2012-02-27]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>.
- [77] DIKLER, S., KOWALSKI, P. LC-NALDI: Using Matrix-Free Nanostructured Targets for Peptide Fractionation and Analysis. *Bruker Daltonics* [online]. 2009 [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: http://www.bdal.com/uploads/media/ASMS09-MPZ572-LC-NALDI_SYD_01.pdf.
- [78] MANURA, J.J, MANURA, D.J. Isotope Distribution Calculator and Mass Spec Plotter. *Scientific Instrument Services* [online]. 1996-2009 [cit. 2012-03-21]. Dostupné z: <http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>.
- [79] SLÁNSKÝ, B. *Technika malby. Díl I.: malířský a conservační materiál*. 1. vyd. Praha: SNKLHU, 1953, 299 s.
- [80] STÝBLOVÁ, M. Zlaté šafránové laky. Praha, 2010. Bakalářská práce. Pedf UK, Katedra chemie a didaktiky chemie.
- [81] STROHALM, M. Mmass – Open Source Mass Spectrometry Tool *Mmass* [online]. 2012 [cit. 2012-03-29]. Dostupné z: <http://www.mmass.org/>.

7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

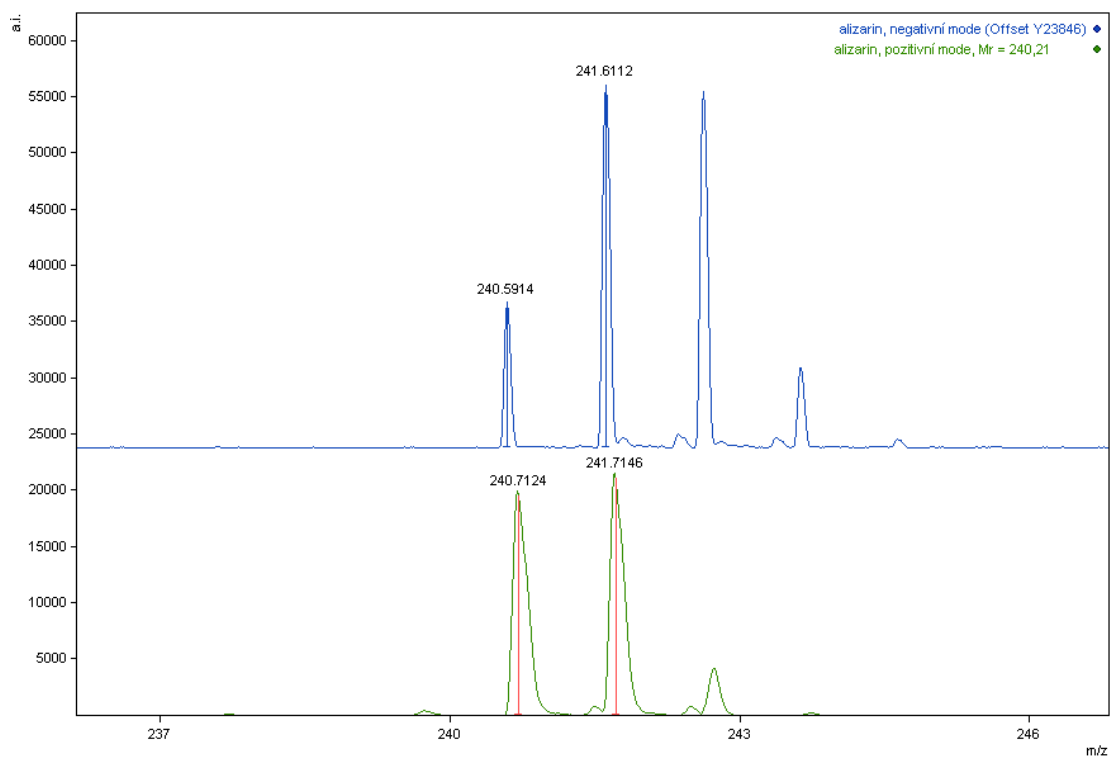
AATCC	The American Association of Textile Chemists and Colorists
a. i.	(arbitrary intensity) četnost iontů – intenzita signálu
AV ČR	Akademie věd České republiky
CE-UV	(Capillary Electrophoresis-Ultraviolet Light) kapilární elektroforéza s UV detekcí
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
C. I. Number	indexové číslo
Da	Dalton – základní jednotka relativní molekulové hmotnosti vzniklého iontu (m)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
ČSN	Československá norma
ϵ_{λ}	molární absorpční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
E_k	kinetická energie [J]
EI	(Electron Ionisation) elektronová ionizace
ESI	(Electrospray Ionisation) elektrosprejová ionizace
ESI-MS	(Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry) elektrosprejová ionizace v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
ESI-MSD	(Electrospray Ionisation-Mass Spectrometric Detector) elektrosprejová ionizace s hmotnostně spektrometrickým detektorem
FA	ferulová kyselina
FTIR	(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) infračervená spektroskopie
GC-FID	(gas chromatography-flame ionisation detector) plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem
GC-MS	(Gas Chromatography-Mass Spectrometry) plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
HPA	3-hydroxypikolinová kyselina
HPLC	(High Performance Liquid Chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem
IPP	isopentenyl-difosfát
ISO	International Organisation for Standardization

LC-MS	(Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
LD	(Laser Desorption) laserová desorpce
LDI	(Laser Desorption/Ionisation) laserová desorpce a ionizace
LDMS	(Laser Desorption Mass Spectrometry)
MALDI	(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
<i>m</i>	relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu [Da]
<i>m/z</i>	měrný náboj iontů analyzované látky
MEKC	(Micellar Electrokinetic Chromatography) elektrokinetická micelární chromatografie
M-Pep	(Peptide Mixture) směs peptidů
Mr	relativní molekulová hmotnost [bezrozměrná veličina]
Mr st	střední relativní molekulová hmotnost [bezrozměrná veličina]
<i>m_u</i>	atomová hmotnostní konstanta [kg]
N	negativní mód
P	pozitivní mód
PA	pikolinová kyselina
(P)DAD	(Diode Array Detector) detektor diodového pole
Pepmix	(Peptide Mixture) směs peptidů
Py-GC-MS	(Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry) pyrolýzní plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
RM	(Micro-Raman Spectroscopy) Ramanova spektroskopie
RP-HPLC	(Reserved-Phase High Performance Liquid Chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
<i>s</i>	délka dráhy letu iontu [m]
SA	sinapová kyselina
SDC	The Society of Dyers and Colourists
<i>t</i>	doba letu iontu [s]
TOF MS	(Time of Flight Mass Spectrometry) hmotnostní spektrometr s průletovým analyzátozem
U	potenciál [V]
UV-VIS	(Ultraviolet Light-Visible Spectroscopy) UV-VIS spektroskopie

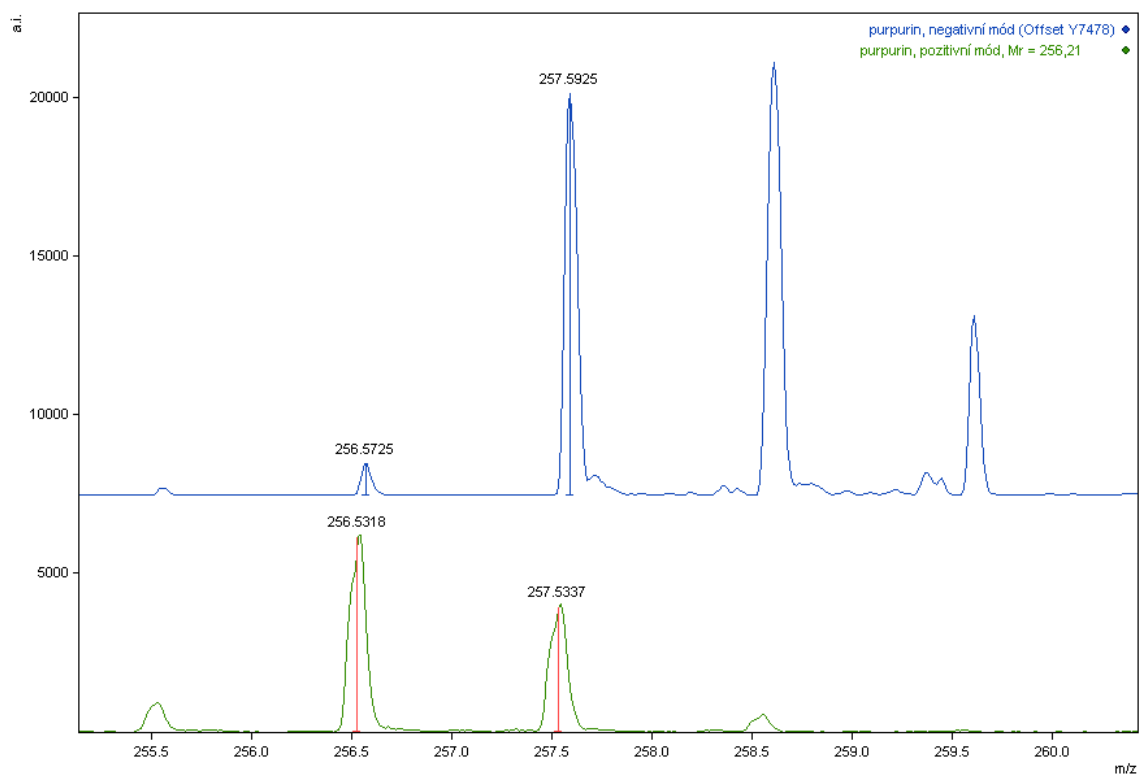
v	rychlost iontu [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
XRF	(X-ray Fluorescence) rentgenfluorescenční spektrometrie
z	počet nábojů vzniklého iontu ($z = 1, 2, 3, \dots$)

8. PŘÍLOHY

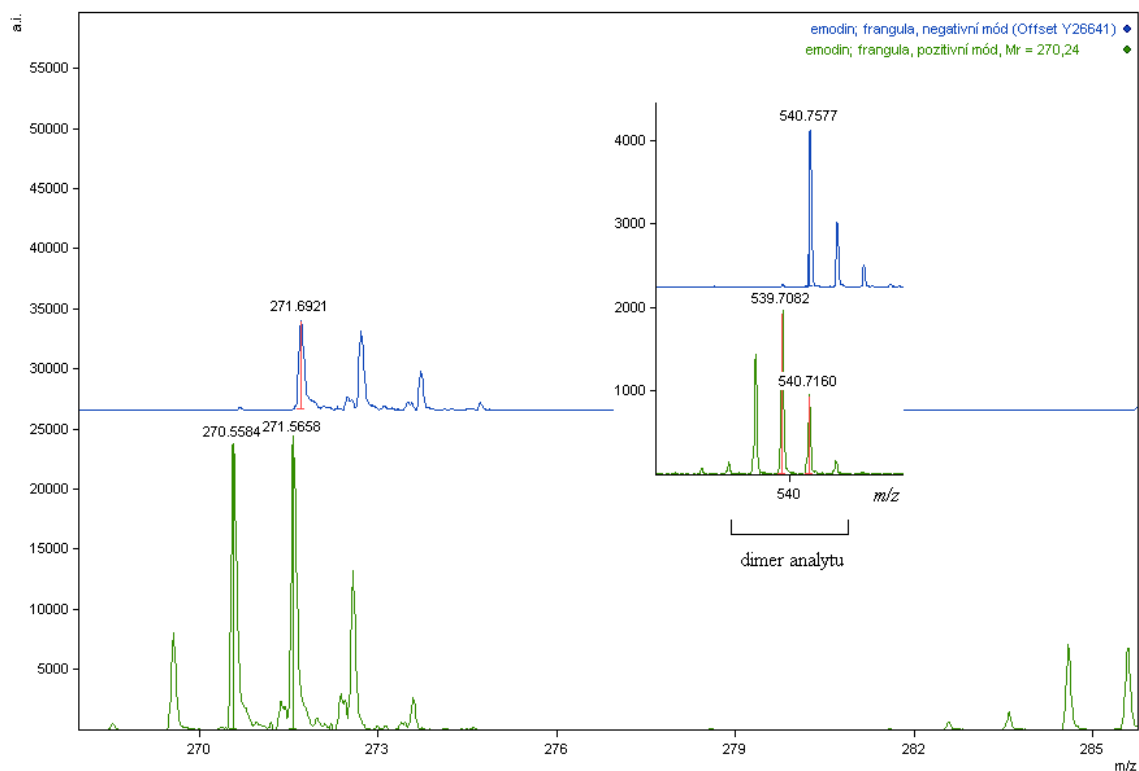
Příloha 1. Hmotnostní spektra antrachinonových barviv a pigmentů (alizarin, purpurin a emodin).



Obrázek 39. Srovnání hmotnostních spekter alizarinu ($M_r = 240,21$), naměřených v negativním a pozitivním módu.

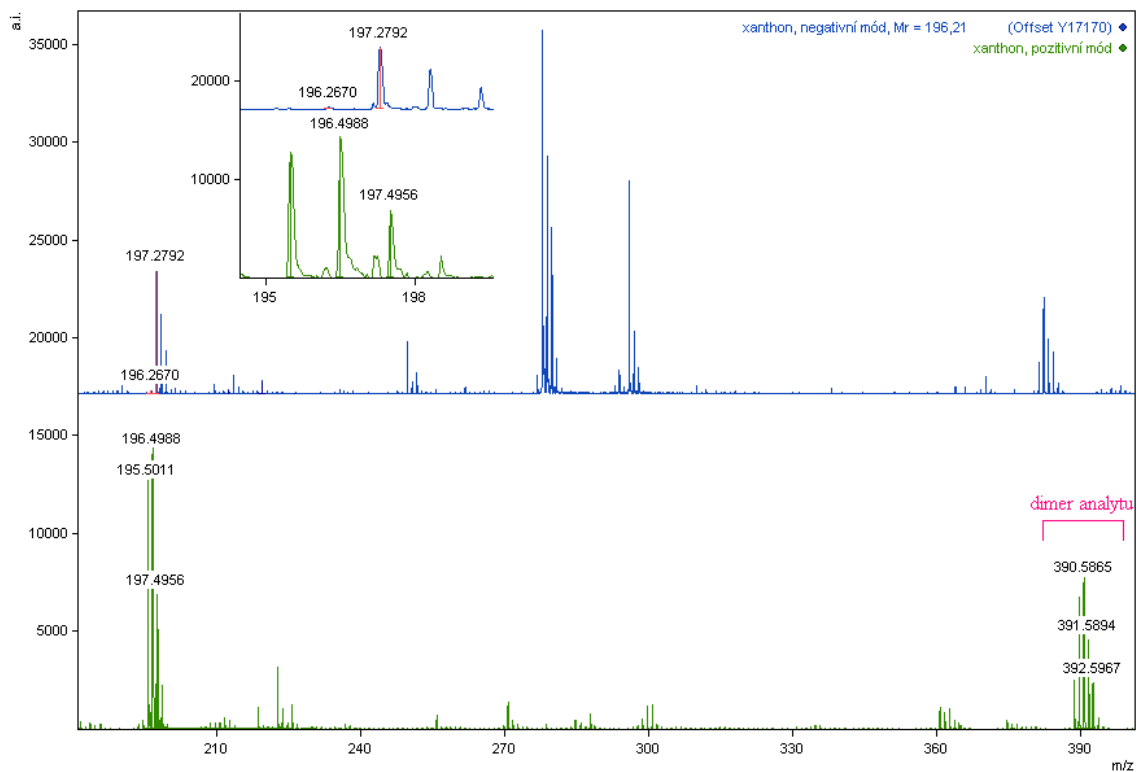


Obrázek 40. Srovnání hmotnostních spekter purpurinu ($M_r = 256,21$), naměřených v negativním a pozitivním módu.

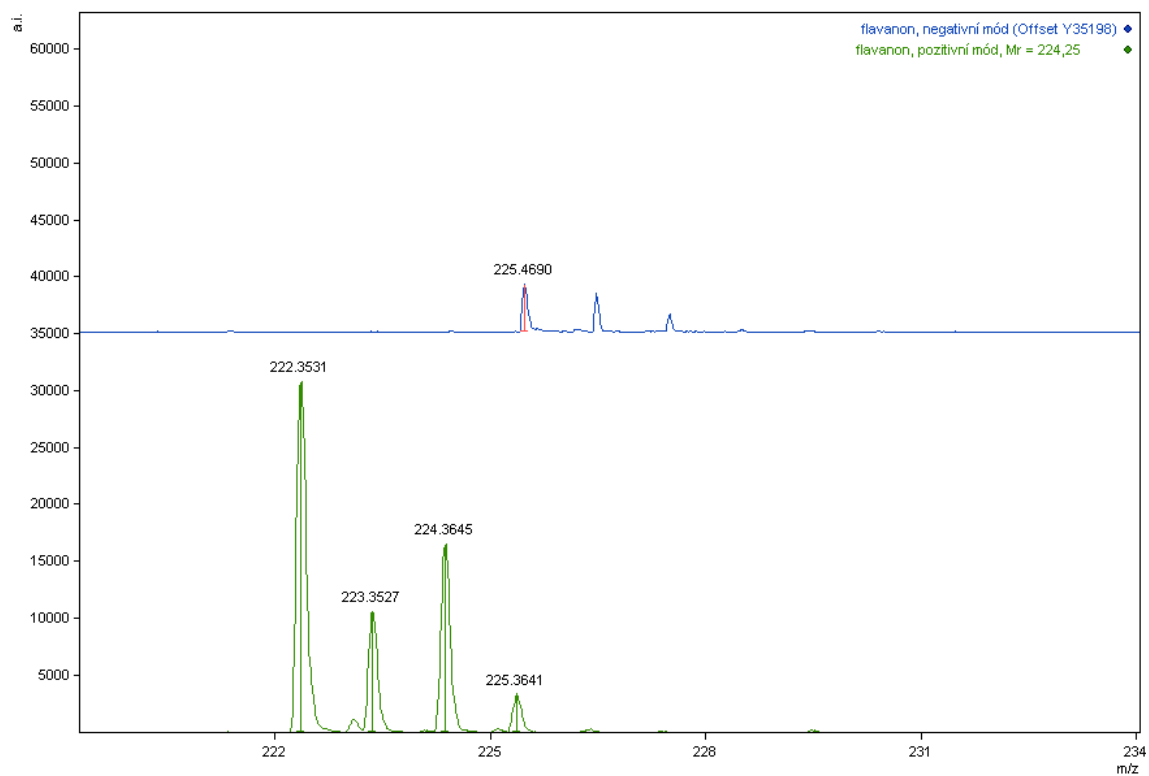


Obrázek 41. Srovnání hmotnostních spekter emodinu frangula ($M_r = 270,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti jednotkové hmotnosti 540 m/z molekula tvoří dimer.

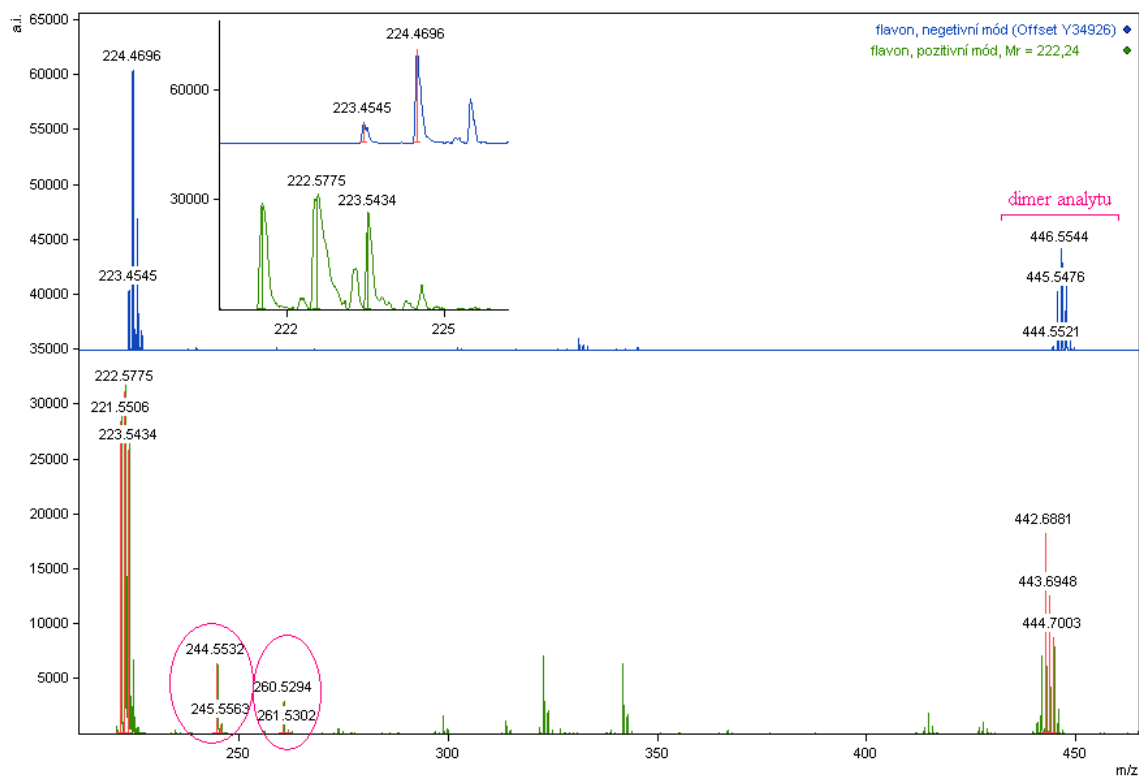
Příloha 2. Hmotnostní spektra pyranových barviv a pigmentů (xanthon, flavanon, flavon, apigenin, baicalein, chrysin, kvercetin, morin hydrát, rhamnetin, isorhamnetin, chromon).



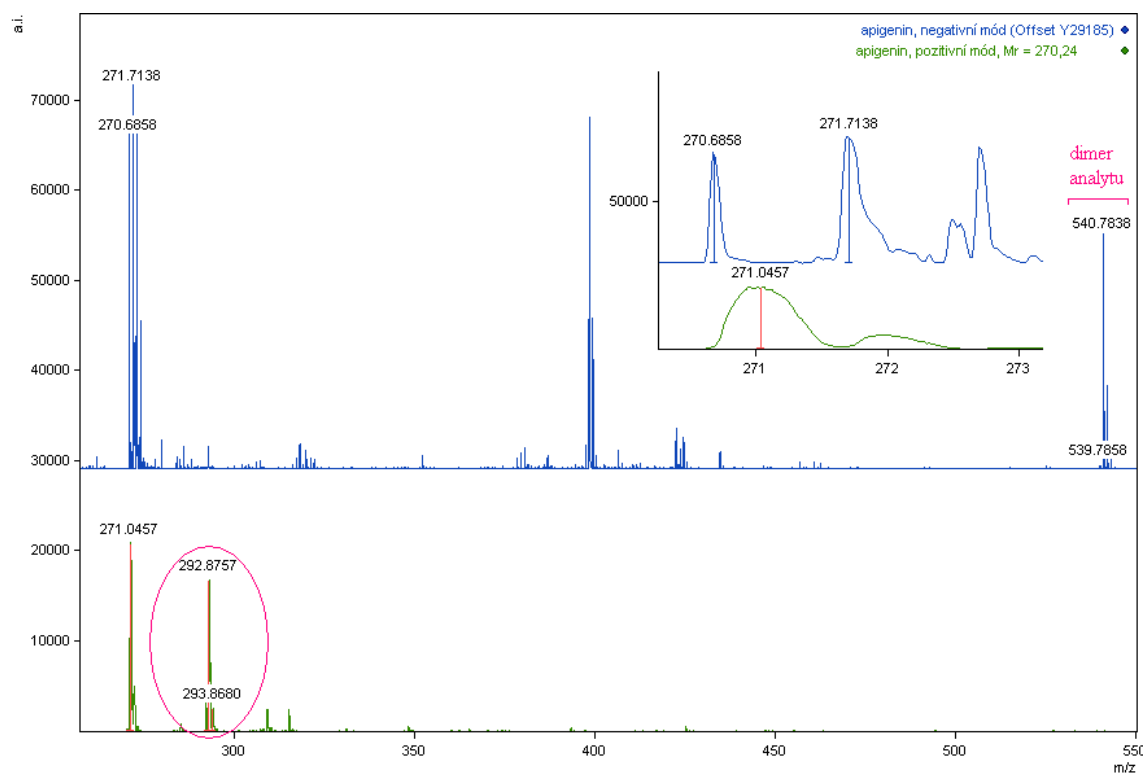
Obrázek 42. Srovnání hmotnostních spekter xanthonu ($M_r = 196,21$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti $392\ m/z$ (v pozitivním módu) tvoří molekula xanthonu dimer.



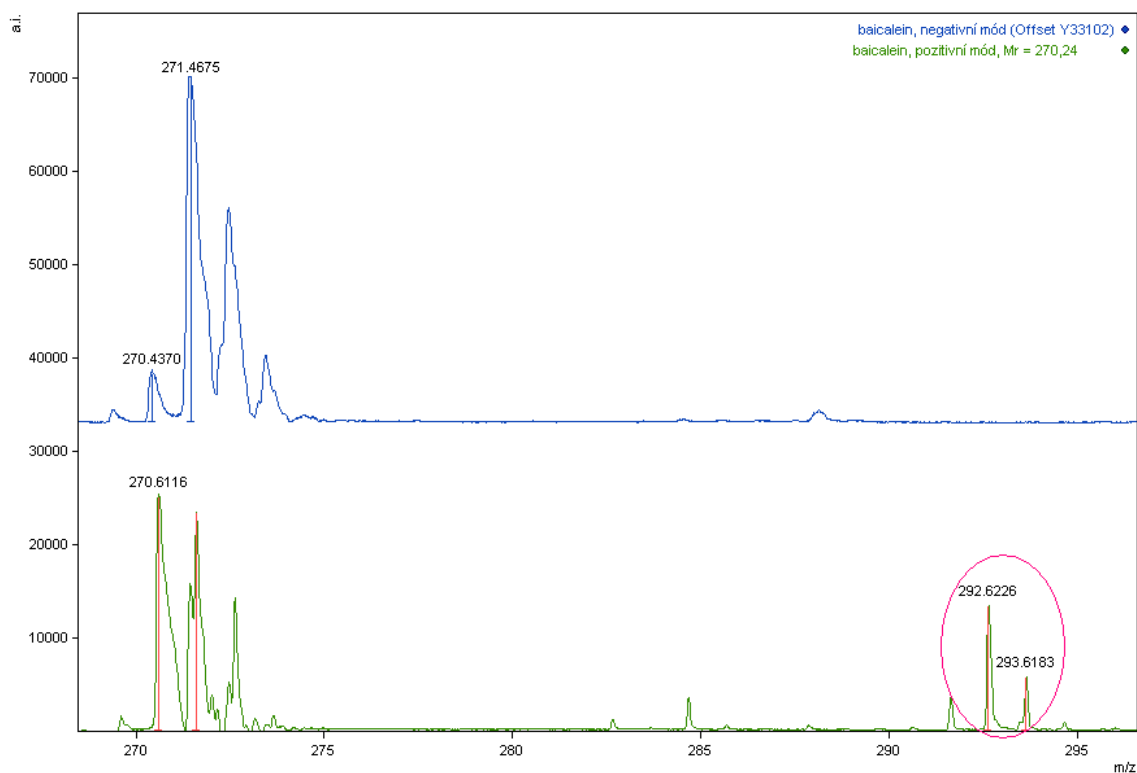
Obrázek 43. Srovnání hmotnostních spekter flavanonu ($M_r = 224,25$), naměřených v negativním a pozitivním módu.



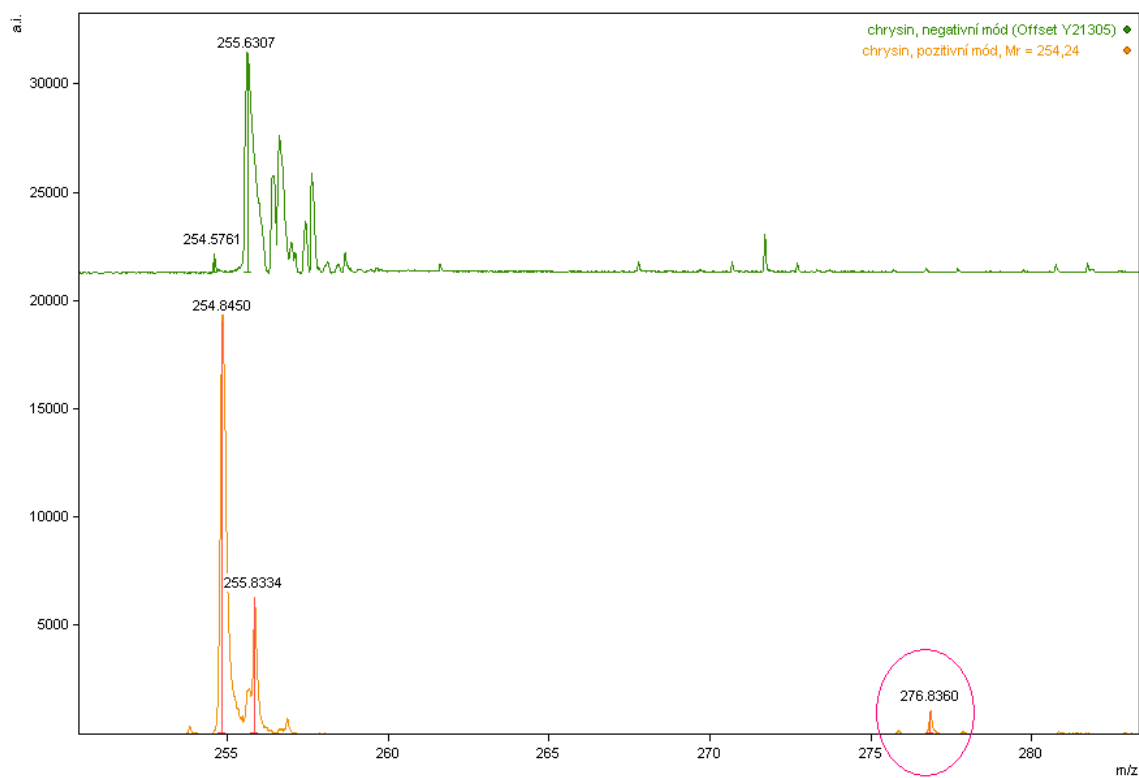
Obrázek 44. Srovnání hmotnostních spekter flavonu ($M_r = 222,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblastech 245 a 261 m/z byl pozorován v pozitivním módu sodný a draselný adukt. Molekula flavonu tvoří v oblasti 444 m/z dimer.



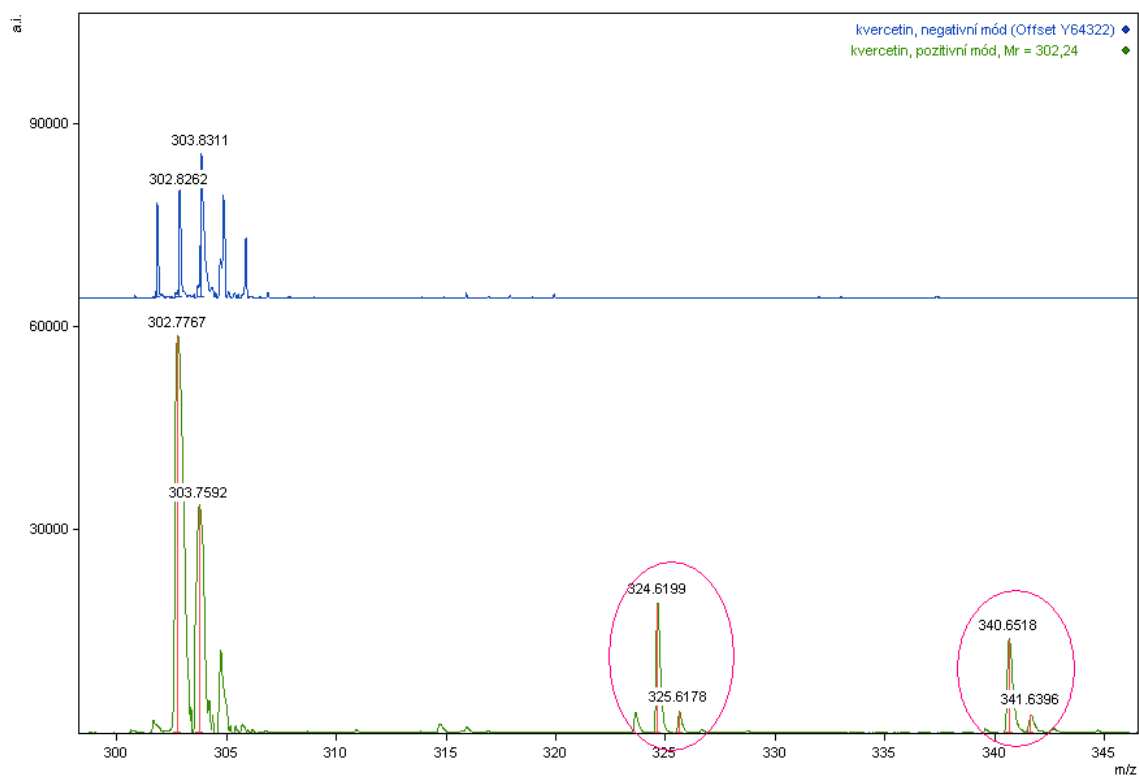
Obrázek 45. Srovnání hmotnostních spekter apigeninu ($M_r = 270,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti $293\ m/z$ byl pozorován v pozitivním módu sodný adukt. Molekula apigeninu tvoří v negativním módu v oblasti $540\ m/z$ dimer.



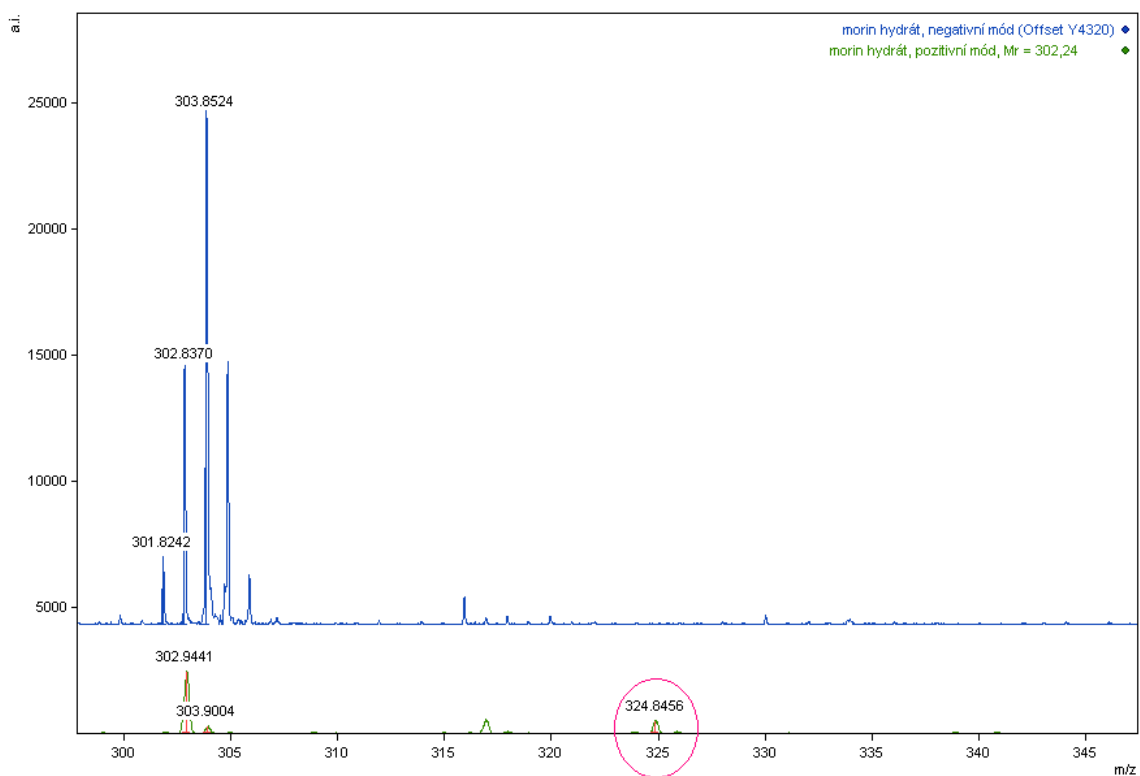
Obrázek 46. Srovnání hmotnostních spekter baicaleinu ($M_r = 270,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti $293\ m/z$ byl pozorován v pozitivním módu sodný adukt.



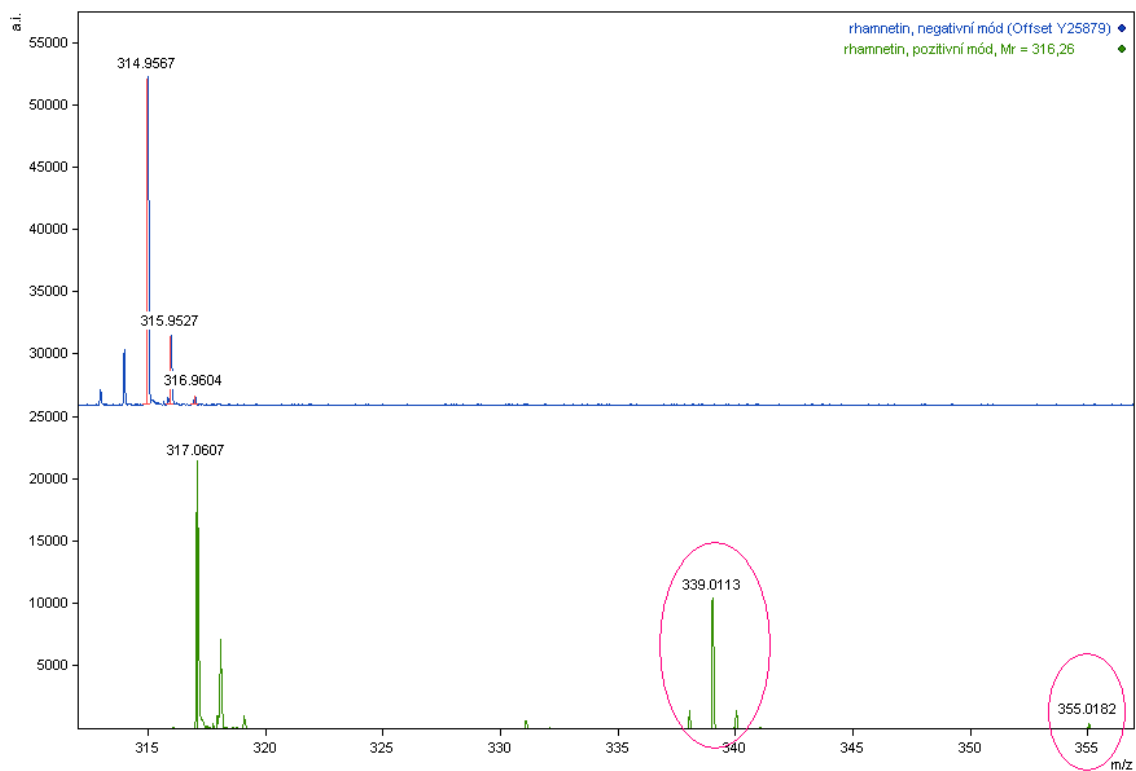
Obrázek 47. Srovnání hmotnostních spekter chrysinu ($M_r = 254,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti $277 m/z$ byl pozorován v pozitivním módu sodný adukt.



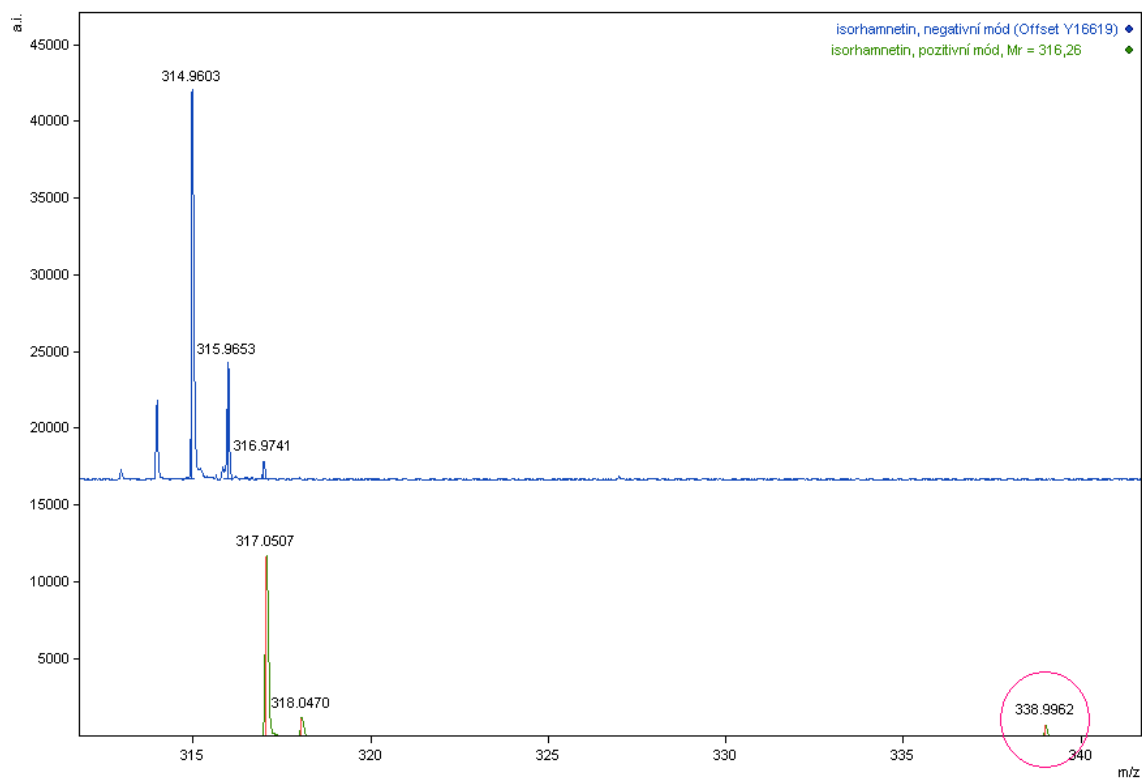
Obrázek 48. Srovnání hmotnostních spekter kvercetinu ($M_r = 302,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblastech 325 a 341 m/z byly pozorovány v pozitivním módu sodný adukt a draselný adukt.



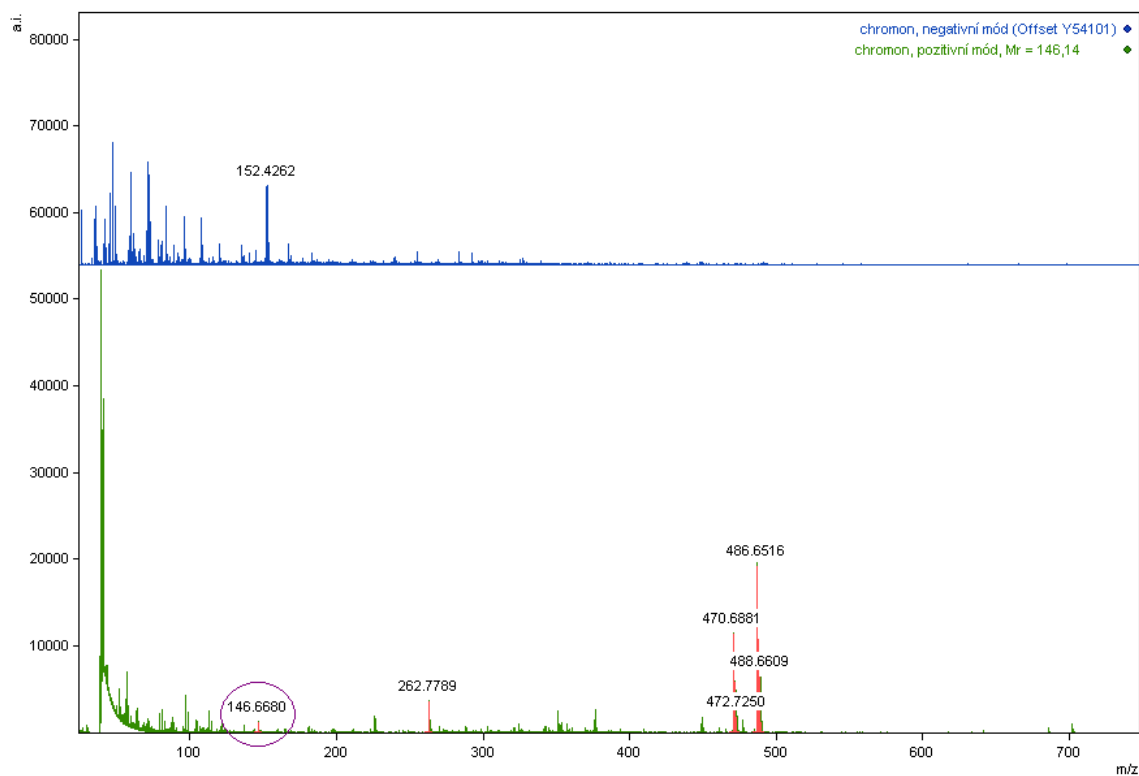
Obrázek 49. Srovnání hmotnostních spekter morin hydrátu ($M_r = 302,24$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti $325\ m/z$ byl pozorován v pozitivním módu sodný adukt.



Obrázek 50. Srovnání hmotnostních spekter rhamnetinu ($M_r = 316,26$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblastech 339 a 355 m/z byly pozorovány v pozitivním módu sodný adukt a draselný adukt.



Obrázek 51. Srovnání hmotnostních spekter isorhamnetinu ($M_r = 316,26$), naměřených v negativním a pozitivním módu. V oblasti $339\ m/z$ byl pozorován v pozitivním módu sodný adukt.



Obrázek 52. Srovnání hmotnostních spekter chromonu ($M_r = 146,14$), naměřených v negativním a pozitivním módu. Chromon byl dle své molekulové hmotnosti určen pouze v pozitivním módu, avšak s píkem malé intenzity (a. i.: 1292).