Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Aplikace analytických metod pro analýzu barviv využívaných v uměleckých dílech

DISERTAČNÍ PRÁCE

Eva Svobodová

Praha 2011

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie

Mgr. Eva Svobodová

Aplikace analytických metod pro analýzu barviv využívaných v uměleckých dílech

Application of Analytical Methods for Analysis of Dyes Employed in Works of Art

Disertační práce

Školitel:

doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Školitel - konzultant:

prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.

Praha, 2011

Tato disertační práce shrnuje výsledky dosažené v rámci doktorského studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2006 – 2011.

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitelek doc. RNDr. Zuzany Bosákové, CSc. a prof. RNDr. Věry Pacákové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Disertační práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne Eva Svobodová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli dokončit doktorské studium na Katedře analytické chemie PřF UK. Jmenovitě děkuji svým školitelkám prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. a doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., a dále pak prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za jejich ochotu, cenné rady a odborné vedení. Děkuji také všem z Centrálních laboratoří Vysoké školy chemicko-technologické v Praze za pomoc a umožnění spektrometrických měření, především Ing. Martině Ohlídalové a Ing. Miroslavě Novotné, CSc. Dále děkuji Ing. Lence Kučerové, Ing. Jindřišce Drozenové a Dr. Ing. Michalu Ďurovičovi za poskytnutí materiálu pro přípravu modelových vzorků a jejich urychleného stárnutí. Mgr. Květě Kalíkové, Ph.D. děkuji za notnou psychickou i odbornou pomoc a dále přátelům Ing. Nadě Kolářové a RNDr. Jaroslavu Šimůnkovi za vytrvalost, s jakou mě ve studiu podporovali. V neposlední řadě můj největší dík patří mé rodině, která mi byla vždy tou největší oporou a bez níž by tato práce nikdy nevznikla. Děkuji tak rodičům Marii a Jaroslavu Svobodovým, sourozencům Ing. Marušce Svobodové, Ph.D. a Bc. Jirkovi Svobodovi, že ve mě nepřestali věřit ani v těch nejtěžších chvílích.

Tuto práci bych ráda věnovala své mamince Marii Svobodové.

Tato disertační práce byla finančně podporována granty Grantové Agentury Univerzity Karlovy (projekty 69807 a SVV 261204) a granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty MSM0021620857 a RP 14/63).

Předmětová hesla

barviva, infračervená spektrometrie, Ramanova spektrometrie, TLC, CZE, MEKC

Klíčová slova

hydroxyderiváty anthrachinonu, separace, identifikace, urychlené stárnutí

Abstrakt

Přírodní organická barviva postupem času degradují a vyžadují restaurátorský zásah. Proto je vývoj analytických metod pro identifikaci barviv důležitý. Tato práce srovnává možnosti identifikace organických barviv separačními a spektrometrickými metodami. Pro identifikaci organických přírodních barviv (akaroid, brazil, dračí krev, kamala, kampeška, košenila, kraplak, laka a santal) byly vybrány tři separační techniky (tenkovrstvá chromatografie - TLC, kapilární zónová elektroforéza - CZE a micelární elektrokinetická chromatografie - MEKC) a dvě spektrometrické techniky (infračervená mikrospektroskopie - IR a Ramanova mikrospektroskopie).

V TLC se stacionární fází tvořenou oktadecylem navázaným na silikagel a vyvíjecí fází 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 mol·dm^{-3} octanovém pufru, pH 5 a 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm^{-3} tetraborátovém pufru o pH 7 a 9 se skvrny barviv santal, kampeška, akaroid, dračí krev a brazil rozmývaly. Karmínovou kyselinu, hematein a purpurin se nepodařilo detekovat.

Optimalizované podmínky v MEKC, která je oproti CZE vhodnější pro identifikaci barviv, byly 0,01 mol·dm^{-3} tetraborátový pufr o pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm. Za těchto podmínek byla metoda validována a ověřena pro identifikaci přírodních barviv a reálných vzorků bylin *Rubia tinctorum*, *Rubia cordifolia* a mycelia houby *Geosmithia lavendula*.

IR a Ramanova mikrospektroskopie byla použita pro nalezení významných vibračních pásů barviv po srovnání se spektry jejich hlavních barvicích složek (IR spektra: kamala 1551, 1346, 1167 a 1130 cm^{-1}, kampeška 1503, 1476, 1293, 1209 a 1056 cm^{-1}, a laka 1715, 1378, 1309, 834, 812 a 774 cm^{-1}). Specifické vibrační pásy ostatních barviv jsou překryty vibracemi matrice či jejich hlavní barvicí složky nebyly komerčně dostupné. V Ramanově mikrospektroskopii lze jednoznačně identifikovat pouze barvivo kampeška (1607, 1565, 1413, 1394 a 701 cm^{-1}) a kamala (1626, 1600, 1573, 1552 a 1001 cm^{-1}). Ostatní barviva vykazují příliš vysokou fluorescenci. Obě techniky byly ověřeny pro identifikaci barviv v modelových vzorcích olejové barevné vrstvy a barvených vlněných a viskózových vláken před a po urychleném stárnutí. Metoda IR byla také použita pro identifikaci červeného barviva v reálných barevných vláknech.

Abstract

Natural organic dyes suffer from degradation during the time. Therefore, the works of art need to be restored and the identification of dyes by analytical methods is important here. The possibilities of using three separation (thin-layer chromatography - TLC, capillary zone electrophoresis – CZE, and micellar electrokinetic chromatography - MEKC) and two spectroscopic (infrared microspectroscopy - IR and Raman microspectroscopy) methods for the identification of red dyes (acaroid, brazil, dragon blood, kamala, logwood, cochineal, madder, lac, and sandalwood) were studied and critically discussed.

In TLC, under optimised conditions (silicagel with octadecyl, 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA in 0.1 $mol \cdot dm^{-3}$ acetate buffer, pH 5, and 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA in 0.025 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborate buffer, pH 7 and 9), the stain broadening of sandalwood, logwood, acaroid, dragon blood, and brazil was observed. Carminic acid, haematein and purpurin were not detected.

A comparison of CZE and MEKC showed that MEKC was superior as it permits separation of all analytes, using 0.015 $mol \cdot dm^{-3}$ sodium dodecyl sulfate in 0.01 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborate buffer, pH 8.5, at a voltage of 20 kV. The developed method was validated and applied to the identification of dyes in *Rubia tinctorum*, *Rubia cordifolia,* and in the mycelium of fungi *Geosmithia lavendula.*

The IR and Raman microspectroscopic techniques for identification of selected dyes were studied. The specific vibrational bands found for the dyes in IR are 1715, 1378, 1309, 834, 812 and 774 cm^{-1} for dye lac, 1551, 1346, 1167 and 1130 cm^{-1} for dye kamala, and 1503, 1476, 1293, 1209 and 1056 cm^{-1} for dye logwood. The characteristic vibrational bands of the dyes madder and cochineal are hidden under the matrices of these dyes. The Raman microspectroscopy permits only reliable identification of kamala (with specific vibrational bands at 1626, 1600, 1573, 1552 and 1001 cm^{-1}) and logwood (1607, 1565, 1413, 1394 and 701 cm^{-1}). Other dyes exhibit pronounced fluorescence.

Both the microspectroscopic methods were applied to identification of dyes in model samples of the colour layers of oil paintings and of the dyed wool and viscose fibres before and after an accelerated ageing. Finally, IR was verified for the identification of red dyes in the real dyed textile fibres, too.

Obsah

1 ÚVOD **12**

2 TEORETICKÁ ČÁST **13**

2.1 Barviva, pigmenty a barevné látky **13**

2.1.1 Pigmenty 13

2.1.2 Barviva 14

2.1.3 Malba a barevná vrstva 15

2.2 Barviva jako chemické látky **16**

2.2.1 Indigo 17

2.2.2 Chinonová barviva 17

2.2.2.1 Kermes *18*

2.2.2.2 Košenila polská a arménská *18*

2.2.2.3 Košenila *19*

2.2.2.4 Laka *20*

2.2.3 Mořenová barviva 21

2.2.3.1 Mořena *21*

2.2.4 Červená dřeva 24

2.2.4.1 Brazilské dřevo *24*

2.2.4.2 Santal *25*

2.2.5 Kampeška 26

2.2.6 Kamala 27

2.2.7 Akaroid a dračí krev 28

2.3 Degradace **29**

2.4 Identifikace přírodních barviv **29**

2.4.1 Separační metody 30

2.4.2 Spektrální metody 36

2.5 Principy metod **39**

2.5.1 Tenkovrstvá chromatografie – TLC 39

2.5.2 Kapilární elektroforéza – CZE a MEKC 40

2.5.3 Infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie 41

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **43**

3.1 Použité chemikálie **43**

3.1.1 Barviva 43

3.1.2 Standardy 43
3.1.3 Reálné vzorky 43
3.1.4 Další chemikálie 44
3.2 Použité přístroje 44
3.3 Příprava modelových vzorků olejové malby 46
3.4 Příprava modelových vzorků barvené textilie 46
3.4.1 Barvení košenilou 46
3.4.2 Barvení kraplakem 47
3.4.3 Barvení santalem 47
3.4.4 Barvení brazilem 47
3.4.5 Barvení kampeškou 48
3.4.6 Barvení kamalou 48
3.4.7 Barvení lakou 48
4 VÝSLEDKY A DISKUSE 49
4.1 Separační metody 50
4.1.1 CZE a MEKC (publikace I-III) 50
4.1.1.1 Deriváty anthrachinonu (publikace I) 50
4.1.1.2 Reálné vzorky (publikace I) 55
4.1.1.3 Barviva (publikace II-III) 58
4.1.2 TLC (publikace III) 60
4.1.2.1 Deriváty anthrachinonu 60
4.1.2.2 Barviva 63
4.1.3 Dílčí závěr 64
4.2 Spektrometrické metody 65
4.2.1 IR spektroskopie barviv (publikace III-V) 65
4.2.1.1 Směs barviva s lněným olejem (publikace IV-V) 69
4.2.1.2 Barvená textilie (publikace V) 71
4.2.1.3 Reálné vzorky (publikace V) 73
4.2.2 Ramanova spektroskopie barviv (publikace III-V) 74
4.2.2.1 Směs barviva s lněným olejem (publikace IV-V) 76
4.2.2.2 Barvená textilie (publikace V) 77
4.2.3 Dílčí závěr 78
5 ZÁVĚR 80
6 LITERATURA 83

PŘÍLOHA **88**

Publikace I **89**

Publikace II **120**

Publikace III **126**

Publikace IV **136**

Publikace V **159**

Seznam zkratek

AgFON	stříbrný film na křemičitanové vrstvě
ATR krystal	krystal pro měření metodou zeslabené totální reflektance
FT-Raman	Ramanova spektroskopie s Fourierovou transformací
BGE	základní elektrolyt
CIELab	barevný prostor ustanovený komisí Commission Internationale de L'Éclairage roku 1976
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DRIFT	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a difúzním odrazem
EOF	elektroosmotický tok
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IR	infračervená spektroskopie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MALDI-TOF-MS	ionizace laserem za přítomnosti matrice s hmotnostním detektorem doby letu
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
Py-GC/MS	pyrolytická plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
RPLC	kapalinová chromatografie s reverzní fází
RSD	relativní směrodatná odchylka
SERRS	povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
TLC	tenkotvrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření

Vis	viditelné záření

Chemikálie

ACN	acetonitril
ARS	sůl 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon-3-sulfonové kyseliny
BBMA	sodná sůl kopolymeru butyl akrylát-butyl metakrylát-metakrylová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
hydroxypropyl-β-CD	hydroxypropyl-β-cyklodextrin
hydroxypropyl-γ-CD	hydroxypropyl-γ-cyklodextrin
MeOH	methanol
SDC	deoxycholát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
STC	taurocholát sodný
Sudan III	1-[4-(fenylazo)fenylazo]-2-naftol
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
α-CD	α-cyklodextrin
β-CD	β-cyklodextrin
γ-CD	γ-cyklodextrin

Analyty

1-HA	1-hydroxy-9,10-anthrachinon
2-HA	2-hydroxy-9,10-anthrachinon
alizarin (1,2-DHA)	1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon
danthron (1,8-DHA)	1,8-dihydroxy-9,10-anthrachinon
penta-HA	1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-anthrachinon
purpurin (1,2,4-THA)	1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon
quinizarin (1,4-DHA)	1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon
tetra-HA	1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthrachinon

Seznam symbolů

d_i	vnitřní průměr
d_o	vnější průměr
L_C	celková délka kapiláry
L_D	délka kapiláry k detekčnímu okénku
log P	hydrofobicita (dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi vodnou a nevodnou fázi)
m	střední intenzita pásů
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
R_F	retardační faktor
s	silná intenzita pásů
t_{eof}	migrační čas elektroosmotického toku
t_{mig}	migrační čas analytu
U	napětí vložené mezi elektrody
vs	velmi silná intenzita pásů
vw	velmi slabá intenzitu pásů
w	slabá intenzita pásů
δ_a	asymetrická deformační vibrace
δ_s	symetrická deformační vibrace
λ	vlnová délka
μ_{eff}	efektivní elektroforetická pohyblivost
ν_a	asymetrická valenční vibrace
ν_s	symetrická valenční vibrace

1 ÚVOD

Přírodní červená organická barviva jsou díky své barevnosti a nerozpustnosti ve vodě hojně využívána především k tvorbě organických pigmentů a laků, převážně pak k barvení mořeného textilu. Pro barvení je oproti synteticky připraveným barvivům potřeba přírodní barvivo extrahovat z rostlin či živočichů a následně vysrážet na vhodný anorganický substrát. Podle lokality a klimatických podmínek, ve kterých se hmyz a rostliny vyskytují, přírodní barviva obsahují rozmanité organické sloučeniny, které jsou pro ně typické. Toho se využívá při potvrzování pravosti, datace a místa vzniku uměleckých děl. Postupem času tyto látky degradují a následně vyžadují konzervátorský či restaurátorský zásah. Pro restaurátorskou praxi je tak podstatná nejen identifikace pojivových látek, ale i použitých barviv. Proto je vývoj analytických metod pro identifikaci barviv důležitý.

Organická přírodní barviva jsou převážně deriváty indolu (modré odstíny), fenolu (žluté odstíny) či chinonu (červené odstíny). Jednotlivá barviva mají velmi podobnou strukturu, a proto se k jejich identifikaci využívají účinné separační techniky. Tyto metody ale vyžadují odběr vzorku a jsou převážně destruktivní, neboť k jejich použití je většinou nezbytné převést vzorek do roztoku. Vzhledem k nedestruktivnosti jsou v popředí zájmu spektroskopické metody, které jsou dostatečně citlivé a umožňují identifikaci barviv přímo *in situ*.

Cílem této práce byla optimalizace a porovnání možností identifikace organických barviv separačními metodami, jmenovitě tenkovrstvé chromatografie – TLC, kapilární zónové elektroforézy – CZE a micelární elektrokinetické chromatografie – MEKC, a metodami spektroskopickými, tj. infračervenou spektroskopií – IR a Ramanovou spektroskopií. Techniky byly nejprve optimalizovány pro hydroxyderiváty anthrachinonu a poté aplikovány pro identifikaci vybraných přírodních, převážně červených, organických barviv, jmenovitě akaroidu, brazilu, dračí krve, kamaly, kampešky, košenily, kraplaku, laky a santalu, jejichž majoritními složkami jsou anthrachinonové deriváty. Metodiky byly ověřeny pro identifikaci barviv ve vybraných bylinách, myceliu houby a reálných barvených textilních vláknech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BARVIVA, PIGMENTY A BAREVNÉ LÁTKY

Barevné látky absorbují elektromagnetické záření ve viditelné části spektra v rozsahu 380 – 780 nm. Při absorpci elektromagnetického záření může dojít ke třem jevům: 1) molekuly látky absorbují elektromagnetické záření v celém rozsahu viditelné části spektra, pak látka má černou barvu; 2) veškeré elektromagnetické záření se odrazí, látka má pak barvu bílou a 3) molekuly látky absorbují jen část viditelného spektra dané vlnové délky a látka tak získává barevný odstín odraženého elektromagnetického záření tzv. doplňkové barvy. Za barevnost látek jsou dle Wittovy teorie barevnosti (1876) [1] odpovědny systémy chromoforů. Jsou jimi především násobné vazby mezi dvěma uhlíky a funkční skupiny (>C=O, >C=S, —N=O), k jejichž excitaci stačí slabá energie viditelné části spektra. Vedle chromoforů k barevnosti přispívají auxochromy, tedy skupiny atomů s volnými elektronovými páry (amidové, hydroxylové, karboxylové, sulfonové skupiny a další), které interagují s π elektrony a jsou nezbytné pro vazbu barevných látek k substrátu. Vzájemná kombinace chromoforů a auxochromů ovlivňuje intenzitu výsledného zabarvení. K výslednému odstínu přispívá i mezomerní efekt přítomných kationtů přechodných kovů, které se využívají k barvení vláken mořidlovými barvivy. Dle elektronové a mezomerní teorie barevnosti je výsledná barva látky způsobena selektivní absorpcí, tedy že energie pro excitaci elektronů je „kvantována“ a závisí na charakteru struktury molekuly čili jejich vazeb.

2.1.1 Pigmenty

Barevné látky můžeme rozdělit na pigmenty a barviva. Pigmenty jsou práškové látky, které po rozptýlení ve vhodném prostředí, nejčastěji pojivu, mají především krycí a vybarvovací schopnost. Kryvost je schopnost pigmentu zabránit průchodu světla prostředím, ve kterém je dispergován, a to difúzním rozptylem (mnohonásobným odrazem a lomem světla na fázovém rozhraní mezi částicemi pigmentu a pojiva). Pigmenty jsou v pojivech či jiných prostředích, ve kterých se aplikují, nerozpustné. Mohou být přírodní, umělé, anorganické i organické. Organické pigmenty, které vznikly vysrážením organického barviva na

anorganický substrát, označujeme za tzv. barevné laky. Barviva slouží k barvení textilií, dobarvování laků, lazurních vrstev apod. Barvivy jsou organické látky přírodní či uměle vyrobené, které jsou na rozdíl od pigmentů rozpustné v aplikačním prostředí, tedy ve vodě či organických rozpouštědlech. Aplikují se tak v roztocích, jejichž zbarvení je transparentní a proto se barviva musí vázat na substrát. [1]

2.1.2 Barviva

Barviva můžeme dále rozdělit dle řady kritérií, např. podle původu, chemického složení, rozpustnosti, barevnosti a technice barvení. Přírodní barviva jsou živočišného či častěji rostlinného původu. Jsou známa již od 3. tisíciletí před n. l., kdy se z rostlin a hmyzu získávala extrakcí pro barvení textilií. Klimatické podmínky a ekosystémy, ve kterých se tyto rostliny a živočichové vyskytovali, specificky ovlivnily zastoupení organických i anorganických látek v buněčných tkáních. Těchto individualit se v současnosti využívá především k určování pravosti uměleckých děl a jejich dataci. První synteticky vyrobené barvivo alizarin bylo připraveno až v druhé polovině 19. století, přesněji roku 1868 [2,3]. Dle rozpustnosti rozdělujeme barviva na ve vodě rozpustná, disperzní, rozpustná v organických rozpouštědlech a nerozpustná barviva. Nerozpustná barviva se označují jako barviva kypová a vlastnostmi jsou velmi podobná pigmentům.

Mořidlová barviva jsou nejčastějšími přírodními barvivy. Textilní vlákna se před barvením těmito barvivy musí upravit tzv. mořením. Moření je děj, při kterém se do struktury vlákna pomocí adheze naváže tzv. mořidlo, tedy sůl vícemocného kovu (Al^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Fe^{3+}, Fe^{2+} a další). Tento kation přechodného kovu M^{z+} reaguje s organickým barvivem za vzniku nerozpustného barevného komplexu, tedy za vzniku laku. Výhoda barvení mořidlovými barvivy je ve stálosti barev během praní.

Přímá barviva nevyžadují předchozí úpravu textilních vláken, k barvení dochází přímo v roztocích barviv. Přímá barviva můžeme rozdělit na tzv. substantivní barviva, která se poutají na celulosová vlákna (bavlna, len, konopí) pomocí vodíkových můstků, a na barviva kyselá či zásaditá dle převládajících funkčních skupin, kterými se váží na proteinová vlákna (vlna, hedvábí). [4,5]

2.1.3 Malba a barevná vrstva

Pigmenty a barviva se využívaly a využívají nejen k barvení textilií, ale také k dekoraci skla, keramiky, soch, v nástěnných malbách, v malbě na dřevo, papír, plátno i k tvorbě barevných plastů apod. K již zmíněné dataci uměleckých děl nepřispívá pouze identifikace použitých materiálů, ale i například tahy štětce a technika malby. Základem malby je barevná vrstva, která je nanesena na podložku, kterou bylo nejčastěji dřevo, později plátno, papír, kámen, kov, kosti a další. Dřevěné podložky byly používány pro temperovou barvu až po dlouhodobé úpravě dřeva. K těmto účelům se využívaly rozličné dřeviny podle krajové zvyklosti a dostupnosti (v Českých zemích to byl především topol a buk), které se upravovaly dlouhodobým máčením ve vodě a posléze několikaletým sušením, obvykle minimálně po dobu pěti let. Výhodou dřevěné podložky byla pevnost podkladů, nevýhodou její reakce na změnu teploty a vlhkosti a časté napadení plísněmi, dřevokaznými houbami a dřevokazným hmyzem. Od 16. století se jako podklad obrazů využívá plátěná podložka, tvořená rostlinnými vlákny lnu, konopí, juty a bavlny a později také hedvábí. Plátěné podložky se nejprve impregnují klihem, který je chrání před vzdušnou vlhkostí a prosáknutím pojiv, a poté napínají na rám. Plátno během času degraduje, ztrácí svou pevnost, ale dá se od malby oddělit a poté malbu nažehlit na nové podkladové plátno. V současnosti se využívá směsných pláten, která jsou tvořena přírodními i syntetickými vlákny.

Při tvorbě samotné malby se na podložku nejprve nanášejí podkladové vrstvy, jejichž kvalita ovlivňuje trvanlivost obrazu. Na dřevo se využívá křída či sádra v klihu, někdy i s klíženým plátnem proti popraskání barevné vrstvy. Při malbě na plátno jsou podkladové vrstvy tvořeny také křídou či sádrou v klihu, ale o nižších koncentracích těchto bělob, nebo se k směsi přidávají oleje, nejčastěji lněný olej, v současnosti akryláty či pryskyřice. Na plátno lze malovat i přímo bez podkladových vrstev, ale takto vzniklá malba pak nelze restaurovat. Na podkladové vrstvy se pak nanášejí samotná barviva či pigmenty ve více vrstvách, jejichž překrýváním či transparentností autor docílí výsledného barevného odstínu. V případě temperové či olejové malby je barevná vrstva na závěr překryta ochranným lakem. Dříve byly k tomuto účelu využívány pryskyřice a dnes syntetické polymery jako polyakrylátové pryskyřice či se obrazy nelakují a jejich povrch je chráněn v prachotěsných rámech.

Temperová malba je jednou z nejrozšířenějších malířských technik. Tempera je emulzní barva tvořená emulzí oleje ve vodě, do které jsou přidány pigmenty. Klasickou temperou je vaječná tempera, která zvyšuje lesk malby, nemění se barevně a chrání malbu před vzdušnou vlhkostí.

Z temperové malby ve 14. století vznikla olejomalba, kdy bylo do tempery přidáno hodně oleje, aby výsledná barva byla lesklejší. Pro olejomalbu se jako pojivo používají pouze vysychavé oleje, tj. oleje, které polymerizací za přístupu kyslíku v přítomnosti pigmentů tvoří hladký elastický film.

2.2 BARVIVA JAKO CHEMICKÉ LÁTKY

Informace o studovaných barvivech, tj. akaroid, brazil, dračí krev, kamala, kampeška, košenila, kraplak, laka a santal, lze nalézt nejen v publikacích týkajících se analýz barviv, ale i v souhrnech [1-5], ze kterých byla sepsána teoretická část o barvivech.

Z chemického hlediska jsou přírodní organická barviva směsí látek, které byly extrahovány z rostlin či živočichů společně s tzv. hlavní barvicí složkou barviva. Hlavní barvicí složka je organická látka, která je zodpovědná za barevnost barviva, tedy obsahuje chromofory a auxochromy. Většina těchto organických látek patří především mezi polyenová, chinonová, indolová, pyranová, oligopyrrolová, pteridinová a isochinolinová barviva. Polyenová barviva, například lutein, karoteny, rhodoxanthin, krocin a kurkumin, jsou tvořena lineárními nenasycenými konjugovanými uhlovodíky a jejich deriváty. Vytvářejí žluté, oranžové a červené odstíny a vyskytují se především ve vaječném žloutku, v zelenině, ovoci, obilí, mořských řasách, houbách, rybách, krabech a v bylinách. V živých organismech jak rostlinných, tak živočišných nalezneme řadu oligopyrrolových barviv. Nejznámějšími oligopyrrolovými barvivy jsou zelené chlorofyly z rostlin, červený hem tvořící hemoglobin a dále oxidovaná forma hemu billirubin, který je hlavním barvivem žluči. Dále sem patří sterkobillin, který se tvoří ve střevech a je dalším metabolitem hemu, a barviva fykocyanobilin a fykoerythrobilin, která jsou zodpovědná za modré či červené zbarvení oddělení řas *Rhodophyta*, *Cyanophyta* a *Cryptophyta*. Žlutě či červeně zbarvená pteridinová barviva (erythropterin, leukopterin, xanthopterin a další) nalezneme především u hmyzu, obojživelníků, plazů a ryb. [2]

Barviva používaná v uměleckých dílech, k barvení textilií, k dekorování různých předmětů apod. patří především mezi pyranová, chinonová a indolová barviva, tedy mezi deriváty flavonu (žluté odstíny), anthrachinonu (červené odstíny) a indolu (modré odstíny).

2.2.1 Indigo

Nejznámějším indolovým barvivem je kypové barvivo indigo (též perská modř či indigová modř) používané k barvení vlny a bavlny, do doby než bylo nahrazeno syntetickými barvivy. Indigo se získávalo z rostlin indigovníku *Indigofera tinctoria* či *I. suffraticosa* a obsahuje hlavní barvicí složky indigotin (též indigo) a jeho izomer indirubin či indigo karmín (disodná sůl 5,5'-indigotindisulfonové kyseliny). Purpurově zbarvené bromované deriváty indigotinu: dibromindigo (6,6'-dibromindigotin), 6,6'-dibromindirubin a 6-bromindigotin, se vyskytují v mořských měkkýších *Murex brandaris, M. trunculus, Helix ianthina* či *Purpura lapillus* a *P. patula*. Tyto hlavní barvicí látky můžeme také najít v barvivu tzv. punicin antický (tyrský purpur). [2-5]

2.2.2 Chinonová barviva

Chinonová barviva jsou zastoupena deriváty benzochinonu, naftochinonu a anthrachinonu. Ořech vlašský (*Juglans regia*) a další ořešáky (*J. cinerea*, *J. nigra*) obsahují ve slupce ořechu juglon, hlavní barvicí složku tmavého barviva známého jako nucin (též juglon, juglandová kyselina). Dalším naftochinonem, strukturně podobným juglonu, je lawson, který je hlavní barvicí složkou barviva henna (hena) získávaného z výhonků keře *Lawsonia inermis*. Barvivo alkana obsahuje také naftochinovou hlavní barvicí složku alkannin (anchusin, alkanetová červeň), která se připravuje z kořene kamejníku barvířského (*Alkanna tinctoria*). Strukturně podobnou látkou je lapachol, který je součástí barviva tecomin, tj. směs pigmentů ze dřeva *Bigonia tecoma*.

Anthrachinonová barviva patří mezi barviva s dlouhou historií a díky své rozmanitosti také mezi velmi početná barviva převážně červených odstínů. Tato barviva můžeme rozdělit podle rostlinného či živočišného původu do podskupin barviv získávaných z hmyzu nadčeledě červců (*Coccoidea*) tzv. coccid dyestuffs

(anglický výraz), poté mořenových barviv získávaných z mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*) a dalších rostlin čeledě mořenovitých (*Rubiaceae*) a v neposlední řadě do skupiny tzv. červených dřev.

2.2.2.1 Kermes

Mezi červená živočišná barviva skupiny coccid dyestuffs patří barvivo kermes (angl. kermes frains), jehož hlavními barvicími složkami jsou kermesová kyselina (též karmazínová kyselina) a flavokermesová kyselina (lakaová kyselina typu D). Kermesová kyselina je majoritní složkou tohoto barviva. Kermes se získává ze sušených těl samiček *Kermes vermilio* či *K. ilicis* (dříve označovaných *Coccus ilicis*), které žijí na stále zeleném evropském dubu *Quercus coccifera*. Kermes byl dříve hojně využíván jako náhrada drahého barviva karmín již obyvateli Judeje a starého Říma. V průběhu staletí rostla jeho obliba i v malbě v technice akvarelu, tempeře, oleji, k iluminování a výrobě orientálních koberců až do 16. století. Kermesová kyselina je rozpustná v horké vodě za vzniku žlutočerveného roztoku a v ethyletheru. Kermes jako většina anthrachinonových barviv je mořidlovým barvivem, které pro barvení textilií vyžaduje již upravená mořená vlákna. Různá mořidla použitá k moření textilních vláken, kterými jsou nejčastěji kamence ($M^{I}N^{III}(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) či sírany přechodných kovů, ovlivňují výslednou barvu vlákna. V případě kermesu získáme karmínovou, tedy krvavě rudou barvu, použijeme-li jako mořidlo hlinitou sůl. Při použití chromité či železité soli získáme růžovou barvu a v případě ciničité soli připravíme šarlachově (jasně červeně) zbarvená textilní vlákna.

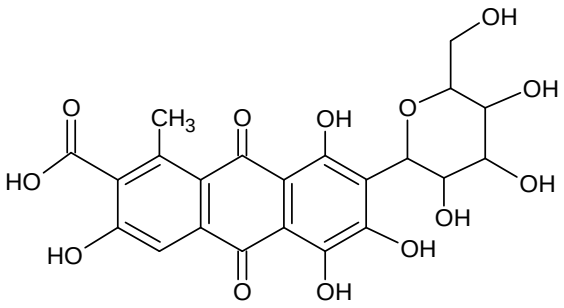
2.2.2.2 Košenila polská a arménská

Z těl červce *Porphyrophora polonica* (dříve *Margarodes polonicus*) žijícího na kořenech chmelku vytrvalého (*Scleranthis perennis*) ve východní Evropě se získává barvivo zvané polská košenila či kermes pokostový (angl. Polish cochineal). Za červené zbarvení polské košenily zodpovídají tři hlavní barvicí složky: karmínová kyselina (62 – 88 %), kermesová a flavokermesová kyselina (společně 12 – 38 %). Stejné hlavní barvicí složky obsahuje i arménská košenila (angl. Armenian cochineal). Vzájemně se liší v zastoupení karmínové kyseliny, v případě košenily arménské je to 95 – 99 %. Arménská košenila se získává z těl *Porphyrophora hameli*, který žije na kořenech a nižších částech trav

druhu *Aeluropus littoralis* čeledě lipnicovité rostoucí pouze na arménských a ázerbajdžánských pláních. Podobně jako u barviva kermes zvolené mořidlo ovlivní výsledný barevný odstín barvené textilie a to pro obě barviva stejným způsobem jako u kermesu. Tedy použití kationu hliníku při moření dává vláknu po jeho barvení polskou či arménskou košenilou rudě červenou barvu, v případě kationtů chromu a železa purpurovou barvu a jasně červenou barvu v případě iontů cínu. Kromě barvení textilu byla ve středověku a novověku používána i jako barvivo nábytkových laků.

2.2.2.3 Košenila

Košenila, zvaná též šarlat, karmín či magenta (angl. cochineal) je červené barvivo získávané z rozdrcených těl oplodněných samiček hmyzu červce nopálového (*Dactylopius coccus*, dříve *Coccus cacti*). Tento hmyz žije na různých druzích opuncií (např. *Opuntia cochenillifera*) a kaktusů v Mexiku a Střední Americe. Tento druh hmyzu je v současnosti pěstován uměle s celkovou roční produkcí 300 – 350 tun. Hlavní barvicí složkou košenily je karmínová kyselina (obr. 1) a dále může obsahovat stopy kermesové kyseliny a flavokermesové kyseliny. Karmínová kyselina je jedním ze zástupců přírodních tzv. „*C*-glykosidů“. Je rozpustná ve vodě, kterou zbarvuje černočerveně, a v alkoholech a roztocích kyselin, které barví žlutě až fialově. Košenila byla poprvé přivezena do Evropy roku 1518 [4,5] či 1516 [3] po objevení Mexika a po roce 1523 ovládla španělskou módu. V průběhu 16. století se košenila rozšířila po celé Evropě. Od 17. století byla používána při výrobě vlámských goblénů a později od 19. století na anatolské či perské koberce. Užívá se především pro barvení textilu (lze i bez mořidel) na červeno, růžovo a purpurovo. V případě moření vláken před barvením získáme výsledný odstín rudě červený (kation hliníku), purpurový (kationty chromu a železa), jasně červený (kation cínu) a vínový (kation mědi). Uplatnění našla dále v malířských technikách akvarelu, tempeře, oleji a k iluminování. Akvarelová a olejová barva tvořená hlinitovápenatou solí karmínové kyseliny je označována jako „karmín“, který stářím hnědne a bledne na přímém světle. Košenila se dnes používá také ke kosmetickým účelům a jako potravinářské barvivo (E120), např. do nápoje Campari.



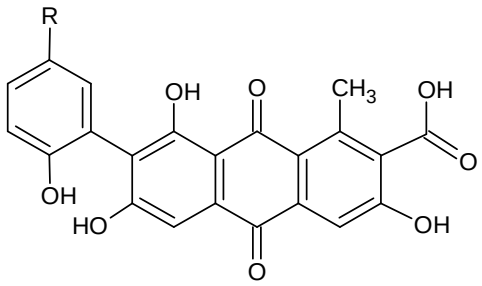
Obr. 1 Karmínová kyselina

2.2.2.4 Laka

Posledním uváděným barvivem z podskupiny barviv získávaných z těl hmyzu (coccid dyestuffs) je barvivo laka (též lac, angl. lac dye). Získává se z výměšků indického hmyzu červce lakového (*Kerria lacca*, dříve *Coccus laccae*). Tento hmyz žije na větvích či mladém listí stromů rodu *Ficus* či na stromech *Croton lacciferus* a *Butea monosperma*. Barvivo laka obsahuje řadu látek, přičemž majoritní zastoupení náleží hlavní barvicí složce lakaové kyselině, která se vyskytuje současně v několika formách. Nejhojnějším typem je lakaová kyselina A (obr. 2), která je též zvaná „karmín“. Záměna názvů a pojmů v oblasti barev a umění vůbec je dost matoucí, přesto velmi častá.

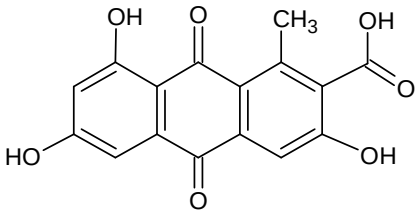
Kromě typu A jsou známy další čtyři typy: lakaová kyselina B, C, D a E (obr. 2). Lakaová kyselina typu D (obr. 3) je značně podobná kermesové kyselině a bývá také označována jako flavokermesová či xanthokermesová kyselina, která se vyskytuje též v barvivech kermes a v různých druzích barviva košenila, jak bylo uvedeno výše. Lakaová kyselina je rozpustná ve vodě, kterou se z barviva extrahuje či pomocí roztoku uhličitanu sodného. Ve vodě nerozpustný zbytek obsahuje chinony erythrolaccin, deoxyerythrolaccin a další. Nerozpustná residua se dále čistí a využívají k přípravě šelaku. Šelak je přírodní pryskyřice z ochranného obalu larev. Má různé složení dle druhu stromu, na kterém hmyz parazituje, a používá se jako pojivo v malbě, politura na nábytek, dříve též jako izolační materiál pro elektroniku a až do toku 1950 k výrobě gramofonových desek. První zmínky o použití barviva laka pocházejí ze starověkého Japonska, odkud se rozšířilo do Evropy, kde se využívalo částečně pro výrobu pigmentů a barvení kůže. Později našlo uplatnění i při barvení textilií a výrobě koberců (turecké, perské, turkmenské, mamelucké), jako barvivo nábytkových laků a pro barvení hedvábí a vlny. I laka patří mezi mořidlová barviva s podobnými odstíny,

jaké tvoří košenila, tedy rudě červeným (mořidlem je Al^{3+}), jasně červeným (Sn^{4+}) a purpurovým (Fe^{3+}).



A: R = $-CH_2CH_2NHCOCH_3$
B: R = $-CH_2CH_2OH$
C: R = $-CH_2CH(NH_2)COOH$
E: R = $-CH_2CH_2NH_2$

Obr. 2 Lakaová kyselina typ A – C, E



Obr. 3 Lakaová kyselina typ D

2.2.3 Mořenová barviva

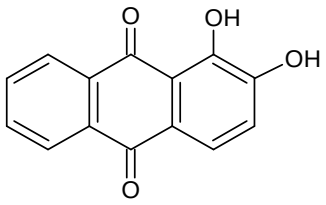
Další velkou podskupinou anthrachinonových barviv jsou tzv. mořenová barviva, tedy barviva získaná z mořeny barvířské a dalších rostlin obsahujících alizarin, převážně čeledě *Rubiaceae*. Mezi nejvýznamnější zdroje těchto barviv patří rostliny rodů *Rubia*, *Galium* a *Relbunium*; dále *Morinda* a *Oldenlandia*. Tyto rostliny obsahují řadu hlavních barvicích složek, především alizarin, munjistin, pseudopurpurin, purpurin, xanthopurpurin a rubiadin. Jejich vzájemné poměry v zastoupení, případně jejich absence či výskyt, jsou specifické pro danou rostlinu a klimatické podmínky, ve kterých žije. Těchto specifikací lze tedy využít nejen pro určování pravosti, ale i k dataci uměleckých děl.

Mořenová barviva patří též do skupiny mořidlových barviv, která vyžadují úpravu vláken mořením solemi kovů. Největší význam dosáhla mořidla obsahující soli hliníku, železa a vápníku, který se používal k získání zářivých stálých barev.

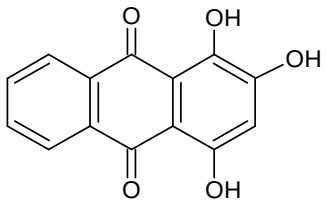
2.2.3.1 Mořena

Mořena, čili kraplak (angl. madder) patří mezi nejpoužívanější organická červená barviva. Zdrojem tohoto barviva jsou kořeny bylin rodu *Rubia*, především kořeny mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*), které byly již ve středověku vyšlechtěny k vyššímu obsahu barviva v kořenech. V kořenech se pak nacházejí

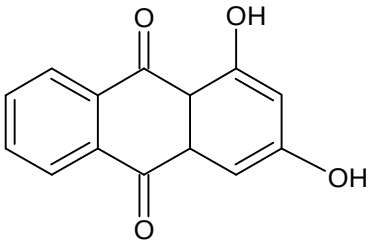
velká množství glykosidů alizarinu a pseudopurpurinu, které se hydrolýzou minerálními kyselinami z glykosidické formy uvolňují. Pseudopurpurin dále podléhá dekarboxylaci během skladování vysušených kořenů mořeny a přechází tak na purpurin. Glykosid alizarinu bývá označován jako tzv. ruberythrinová či ruberythrová kyselina (6'-*O*-β-D-xylopyranosyl-β-D-glukopyranosid) a je rozpustná ve vodě. Alizarin (obr. 4) s purpurinem (obr. 5) jsou nejvýznamnějšími hlavními barvicími složkami mořenových barviv. Společně s nimi můžeme v mořeně barvířské nalézt řadu derivátů anthrachinonu jako jsou xanthopurpurin (obr. 6), a pseudopurpurin (obr. 7). Hlavní barvicí složky dávají kořenům mořeny barvířské červené zbarvení.



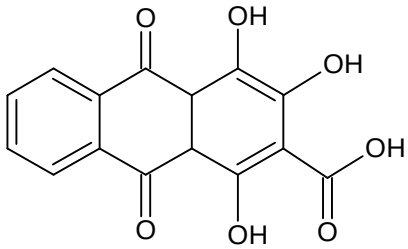
Obr. 4 Alizarin



Obr. 5 Purpurin



Obr. 6 Xanthopurpurin

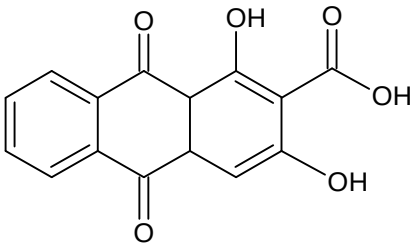


Obr. 7 Pseudopurpurin

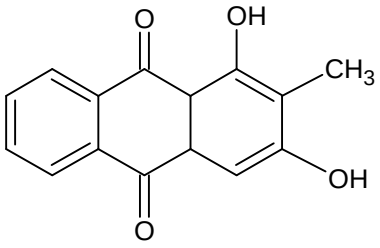
Alizarin je však se svou fenolickou strukturou příkladem acidobazického indikátoru, který v závislosti na bazicitě prostředí disociuje, čímž mění uspořádaní elektronů ve své struktuře a mění i tak své zbarvení v roztoku. V kyselém prostředí pod pH 5,5 jsou obě hydroxylové skupiny alizarinu protonizovány a roztok má oranžové zbarvení. Při zvýšení bazicity roztoku k hodnotě pH ~ 7 dochází k disociaci hydroxylové skupiny v poloze 2 a látka se jeví jako červená. Dalším zalkalizováním roztoku disociuje i hydroxylová skupina v poloze 1, a roztok získává při pH ~ 10 fialové zbarvení. Podobné chování nalezneme i u purpurinu, který má ve své struktuře dokonce tři hydroxylové skupiny v polohách 1, 2 a 4. Výsledný barevný odstín barvené textilie tak závisí nejen na pH aplikačního prostředí, ale také na kationu použitého mořidla a pohybuje se od

červené, fialové, oranžové barvy, přes lila až k hnědé barvě. K moření vláken byl nejčastěji používán tzv. alum, tedy alkalický síran (nejčastěji podvojný síran draselnohlinitý), který dával vlněným vláknům ve spojení s alizarinem cihlově červenou barvu. Fialové barvy se docílilo mořením železitými a hořečnatými ionty, modrého zbarvení mořením barnatými ionty. Použitím chromitých iontů vlákna získala hnědofialový odstín a odstín růžový byl docílen mořením kationty cínu. Dříve však mořidla bývala získávána z přírodních minerálů a nebývala tedy chemicky čistá, ale obsahovala stopy ostatních kovů. Vlněná vlákna pak po moření a barvení získala matné barvy. Pro rozjasnění těchto barev se do barvicí lázně přidával vinný kámen (hydrogenvinan draselný). Kořeny mořeny tak byly nejčastěji využívány k barvení proteinových (vlna a hedvábí) a celulosových vláken (len a bavlna). Historie využití mořeny k barvení a získávání barviva má své počátky již ve starověku.

Rostliny čeledě *Rubiaceae* rostou téměř po celém světě a jsou vystavovány různým klimatickým a geografickým podmínkám. Rozeznáváme tak řadu druhů mořenových barviv, které obsahují odlišné zastoupení hlavních barvicích složek alizarinu, purpurinu, xanthopurpurinu, pseudopurpurinu, rubiadinu a munjistinu. Podle výskytu získala tato barviva i svá označení jako například kraplak chayaver, pocházející z Indie, Ceylonu a Barmy, který obsahuje převážně hlavní barvicí složky alizarin a anthragalloldimethylether. Dalším je červeně až hnědě zbarvený kraplak indický, za jehož odstín jsou odpovědny deriváty anthrachinonu purpurin a pseudopurpurin. Jako kraplak indický je také označováno barvivo munjeet, které kromě purpurinu a pseudopurpurinu obsahuje i stopy alizarinu a především munjistin (obr. 8). Munjeet je získáván z byliny *Rubia cordifolia* rostoucí v oblastech Indie, Číny, Japonska a tropické Afriky. V Evropě v jižní Francii, Íránu a Turecku roste *Rubia peregrina*, ze které se získává barvivo tzv. wild madder, které na rozdíl od mořeny barvířské obsahuje pouze stopové množství alizarinu. Hlavní barvicí složky tohoto barviva jsou především purpurin, pseudopurpurin a rubiadin (obr. 9). Rostlin čeledě mořenovitých se na celém světě vyskytuje obrovské množství a s nimi roste i množství mořenových barviv lišících se odstínem, převládajícími hlavními barvicími složkami a svou bohatou historií barvení.



Obr. 8 Munjistin



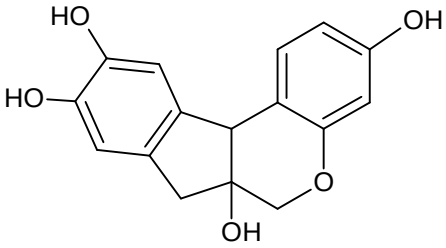
Obr. 9 Rubiadin

2.2.4 Červená dřeva

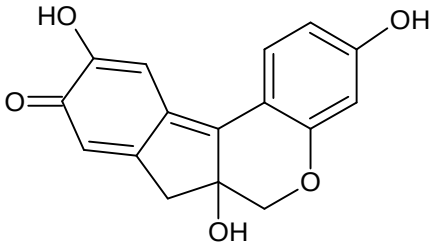
Další dvě studovaná červená organická barviva santal a brazilské dřevo patří do skupiny tzv. červených dřev. Červená dřeva můžeme dělit na dvě skupiny v závislosti na rozpustnosti hlavních barvicích složek ve vodě, tedy na rozpustná a nerozpustná červená dřeva. Brazilské dřevo, obsahující hlavní barvicí složku brazilin (patří mezi neoflavonoidy), patří do skupiny rozpustných červených dřev, obdobně jako sappanwood, pernambuco wood a řada dalších, jež jsou také tvořeny brazilinem. Nerozpustná červená dřeva obsahují jako hlavní barvicí složku santalin, který je zastoupen v barvivech santal, barwood, caliaturwood a dalších.

2.2.4.1 Brazilské dřevo

Mezi rozpustná červená dřeva patří i brazilské dřevo, známé též jako brazil (angl. brazilwood). Jeho hlavními barvicími složkami jsou brazilin a brazilein, který je oxidovanou formou brazilinu (obr. 10 a obr. 11).



Obr. 10 Brazilin



Obr. 11 Brazilein

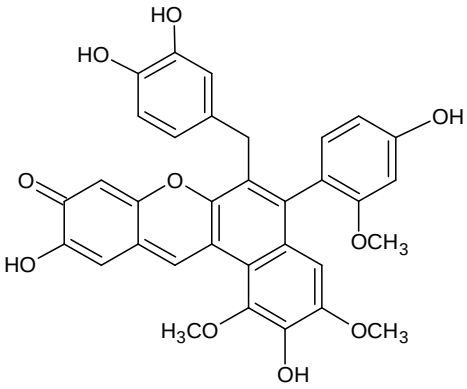
Brazilin můžeme nalézt v rozličných druzích stromů z rodu *Caesalpinia* [3]. Bezbarvý brazilin je ve vodě rozpustný a rozpouští se za vzniku žlutého roztoku, který vzdušnou oxidací či fermentací přechází do karmínově červeného

roztoku brazileinu, který dalším stáním na vzduchu až hnědne. Těchto barevných změn lze využít i k indikaci acidobazického děje.

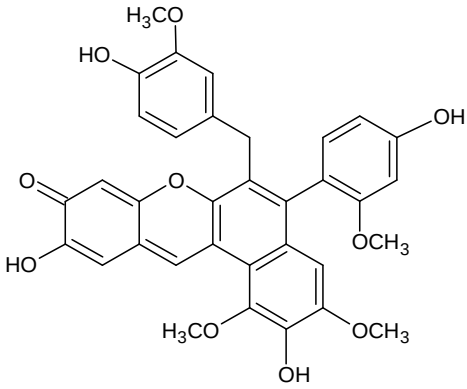
Brazilské dřevo bylo používáno k výrobě akvarelových barev, v knižní malbě, k malbě miniatur, k tvorbě inkoustů a samozřejmě k barvení textilií. Brazil patří mezi mořenová barviva, jehož odstíny připomínaly textilie barvené mořenou, a proto byl někdy přímo za mořenu zaměňován. Nejčastějším mořidlem byla hlinitá mořidla (červený odstín), dále cíničitá (růžový odstín) a železitá mořidla (hnědý odstín). Při barvení lněných a bavlněných vláken byla používána jako mořidlo žluč či rostliny rodu škumpa (*Rhus*). [5]

2.2.4.2 Santal

Do skupiny nerozpustných červených dřev lze zařadit barvivo santálové dřevo či santal (angl. sandalwood či red sanders wood). Jeho hlavní barvicí složkou je ve vodě nerozpustná směs santalinu typu A, B a C, společně nazývaná jako santalin. Chemické složení santalinu A a B bylo již klasifikováno (obr. 12 a obr. 13), oproti formě C, jejíž chemická struktura není dosud známa. Vedle santalinu můžeme v santálovém dřevě nalézt i santal, který patří mezi flavonové barvicí složky žlutých barviv.



Obr. 12 Santalin A



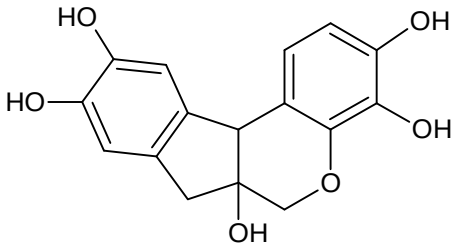
Obr. 13 Santalin B

Barvicí složka santalin se získává z drceného jádrového dřeva *Pterocarpus santalinus*, *P. indicus*, *P. soyauxii* a *Baphia nitida*. Dalším barvivem obsahujícím hlavní barvicí složky santalin A, B i C je barvivo camwood (tzv. africký santal) pocházející z jádrového dřeva *Baphia nitida*. Z dřeviny *Pterocarpus indicus* hojně rostoucí na Filipínách se získává barvivo narrawood, které je opět velmi podobné barvivu santal.

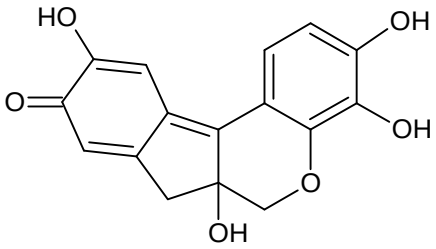
Santal byl již starými Indy používán k výrobě dekoračního nábytku, výrobě nábytkových laků, ale také k barvení textilu a to jak přímým barvením bavlny a vlny, tak barvením s použitím mořidla (nejčastěji soli cíničité). Použití hlinitých iontů k moření zajišťuje textilii červené zbarvení (případně oranžovo-červené při barvení africkým santalem), cíničité ionty poskytují modročervené (červené) odstíny, chromité ionty červenofialové (hnědočervené) a železité ionty při barvení santalem zajišťují fialové zbarvení či zbarvení kaštanové při použití afrického santalu. Nevýhodou barvení santalem je špatná světlostálost těchto odstínů.

2.2.5 Kampeška

Dalším studovaným přírodním organickým barvivem je barvivo kampeška (angl. logwood), které se získává z jádrového dřeva *Haematoxylum campechianum*. Hlavní barvicí složka kampešky je hematoxylin (obr. 14). Chemická struktura hematoxylinu (7,11b-dihydro-6*H*-indeno[2,1-*c*]chromene-3,4,6a,9,10-pentol) velmi připomíná hlavní barvicí složku brazilského dřeva brazilin (7,11b-dihydro-6*H*-indeno[2,1-*c*]chromene-3,6a,9,10-tetrol), liší se pouze jednou hydroxylovou skupinou v pozici 4. Hematoxylin je bezbarvá sloučenina, která se oxiduje vzdušným kyslíkem za vzniku hemateinu (obr. 15), který je barevný (červené krystaly). Hematein se mírně rozpouští v horké vodě a tvoří temně červený roztok s kyselinou sírovou, v hydroxidu sodném se zbarvuje temně fialově. Hematein, respektive hematoxylin lze také využít jako indikátor acidobazických dějů. 0,5% Roztok hematoxylinu v ethanolu mění zbarvení z červené na žlutou v rozsahu pH 0 – 1 a poté ze žluté na fialovou v rozsahu pH 5 – 6.



Obr. 14 Hematoxylin



Obr. 15 Hematein

Barvivo kampeška barví červeně, fialově až modře, a proto se nejčastěji zařazuje mezi modrá přírodní organická barviva, také se jí říká modré dřevo. Někteří autoři [3] jej přesto zařazují mezi barviva červená, díky červeným krystalům hlavní barvicí složky hemateinu.

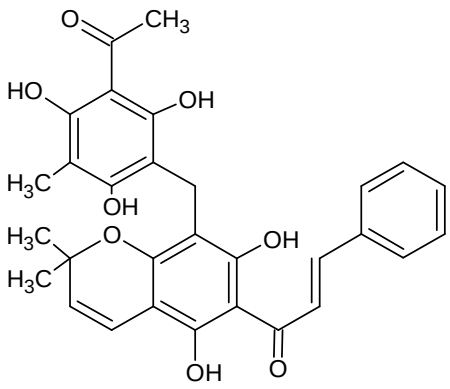
Do Evropy byla kampeška dovážena z centrální a Jižní Ameriky (stromy *Haematoxylum campechianum* rostou převážně v Mexiku a Brazílii, dále i v oblasti západní Indie) po jejím objevení Španěly v 16. století. V 17. – 19. století byla kampeška nejčastěji využívána v akvarelu, k tisku na kaliko [4] a k barvení textilu, nejčastěji hedvábí a vlny. V případě moření hlinitými ionty získáváme modré zbarvení, měďnatými ionty modročerné, cíničitými ionty fialové a černé zbarvení docílíme mořením ionty železa (barva je velmi odolná vůči světlu).

2.2.6 Kamala

Barvivo kamala se získává z plodů věčně zeleného stromu *Mallotus philippensis* rostoucího v Indonésii, na Filipínách, Thajsku a Vietnamu a z rostliny *Rottleria tinctoria* vyskytující se v Číně. Jeho hlavní barvicí složkou je rottlerin (obr. 16), který dává barvivu žlutooranžovou barvu. Rottlerin je však méně stálý, a proto světle oranžová barva kamaly vystavena slunečnímu záření postupně bledne. [3,4,6]

Kamala byla používána především ve východoasijských zemích k barvení textilu a posléze v 19. století byla exportována do Evropy. Barvivo kamala se extrahovalo z chloupků na vyzrálých plodech *Mallotus philippensis*, které se pomlely a prosívaly za vzniku hrubého prášku. Případně plody mohly být míchány ve vodě a usazený prášek kamaly ze dna byl přefiltrován a usušen. Přesto výtěžek výsledného práškového barviva z plodů byl pouhých 1,5 – 4 %. Později byl extrahován organickými rozpouštědly přímo krystalický rottlerin. [6]

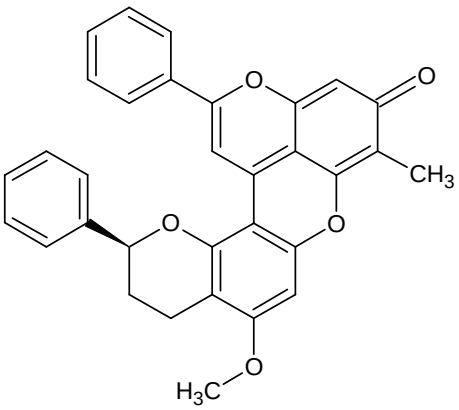
V současné době není světová produkce přírodní kamaly významná, jelikož ji zastínila stálejší a levnější syntetická barviva. Přesto nachází své uplatnění v lékařství [6,7], kosmetice a jako potravinářské barvivo.



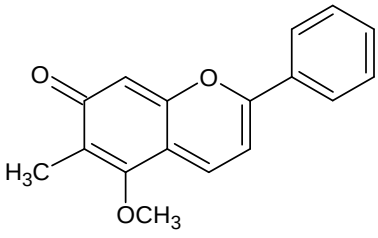
Obr. 16 Rottlerin

2.2.7 Akaroid a dračí krev

Akaroid je prášek červeno-hnědé barvy původem ze stromů rodu *Xantothrea* rostoucí v Tasmánii a Austrálii. Tato pryskyřice obsahuje 80 až 85 % derivátu fenolu resinotannol s kumarovou kyselinou, který je využíván jako balzám. Jedná se o pryskyřici rozpustnou v ethanolu a v etheru, která tvoří rychleschnoucí pevný film červené barvy, proto velmi často tvoří příměs šelakových a kopálových laků. Pryskyřice a třísloviny jsou též obsaženy v barvivu dračí krev. Její hlavní barvicí složky jsou pyryliová barviva dracorubin (obr. 17) a dracorhodin (obr. 18). Dračí krev je získávána ze stromů *Calamus draco*, *Xantothrea*, *Pterocarpus draco* (Venezuela), *Croton draco* (Mexiko), *Daemonorops draco* (Indie), *Dracanea cinabarit* (Sokotra) a dračinec obrovitý (*D. draco*, Kanárské ostrovy). Toto barvivo se využívalo k lazurování na stříbře a cínu, ke knižní malbě i jako lak na dřevo a bylo dováženo do Evropy z Indie od 18. století. [3]



Obr. 17 Dracorubin



Obr. 18 Dracorhodin

2.3 DEGRADACE

Degradace materiálů představuje souhrn fyzikálních, chemických a biologických procesů vedoucích ke zhoršení vlastností daného materiálu. Materiál se tak často stává nesoudržným, křehkým, ztrácí své původní zbarvení a je často mechanicky a biologicky poškozen.

Fyzikální degradace vzniká působením relativní vlhkosti vzduchu, světla a teplotními změnami. Chemickou degradaci zapříčiňují převážně roztoky chemických látek a směsí jak z okolního prostředí, tak ze struktury samotného uměleckého díla, jak už z barvy, tak podložky. Faktory uplatňující se v procesu fyzikální a chemické degradace působí převážně společně, proto častěji hovoříme o fyzikálně-chemické degradaci. V neposlední řadě k poškození uměleckých děl a nejen jich přispívají i biologické faktory. Mezi ně můžeme zahrnout především působení plísní, bakterií, hub, řas, hmyzu, hlodavců, ptáků i samotného člověka.

Organická barviva jsou většinou chemicky stabilní, ztrácejí však svou barevnost po časté přímé expozici světelným zářením. Nejcitlivější jsou barvy k UV složce viditelného záření, která má dostatečnou energii k radikálovému štěpení násobných vazeb, tzv. fotolýze. Degradaci podléhají taktéž pojiva, ochranné laky a vosky, podkladové vrstvy malby i samotná podložka. Podložkami bývá nejčastěji plátno a papír či dřevěná deska, které také mají organickou matrici, avšak degradaci podléhají snáz, především fyzikální a biologické.

2.4 IDENTIFIKACE PŘÍRODNÍCH BARVIV

Přírodní organická barviva tvořená směsí látek s majoritní hlavní barvicí složkou jsou v barevných vrstvách či v barvených textiliích zastoupena ve velmi malých množstvích. Nízká koncentrace barviv stačí k získání potřebného barevného odstínu díky jejich vysoké kryvosti, ale ztěžuje jejich identifikaci. K přesnému stanovení použitého organického barviva jsou tak potřeba vysoce citlivé analytické metody s nízkým detekčním limitem. Dalším omezením je výběr vhodné metody vzorkování. Pro potřeby restaurátorů je odběr vzorku a jeho destruktivní analýza nežádoucí. Proto jsou v současné době v popředí zájmu nedestruktivní a neinvazivní metody oproti destruktivním, které jsou využívány v případech, kdy odběr vzorku 1) nepoškodí umělecké dílo, 2) je nutný k vlastní

analýze či 3) pro přesnou identifikaci složitých směsí. Organická barviva je tak nutno často extrahovat například z barvených textilních vláken.

Identifikace organických barviv je založena na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Tvorba barevných komplexů s kovy se využívá k rychlé orientační identifikaci barviv tzv. mikrochemickými důkazy. Tyto selektivní vybarvovací či srážecí reakce jsou převážně využívány k rozlišení organických a anorganických barviv, respektive pigmentů [5,8]. Organická barviva, v jejichž struktuře jsou skupiny schopné redukce či oxidace, lze identifikovat pomocí elektrochemických metod. Autoři [9] identifikovali pomocí voltametrie barviva laka, košenila, dračí krev a mono- až tetrahydroxyderiváty anthrachinonu (včetně alizarinu a purpurinu) po hydrolýze laků a následné extrakci barviv kyselinou sírovou. Elektrochemickou charakteristikou anthrachinonových barviv různě substituovaných, jejich barvicí schopností a stálostí barevných odstínů se zabývali autoři [10] pomocí voltametrie a metody zjišťování změny barevnosti CIELab. Cyklická voltametrie je využívaná i k studiu interakce substituovaných anthrachinonů s centrálním kovem v komplexech, které hydroxyderiváty anthrachinonu ochotně tvoří. [11] K určení struktury přírodních barviv a studiu komplexů mořidlových barviv je používána nukleární magnetická rezonance [12,13] a RTG fluorescence [14,15], kterou lze identifikovat kation kovu, se kterým mořidlové barvivo tvoří barevné komplexy. Komplexy anthrachinonových barviv s kovy našly uplatnění i v lékařství jako antioxidanty, v histologii a cytologii. [16-19] Kromě léčivých účinků se studují i fyzikálně-chemické vlastnosti anthrachinonů a jejich komplexů, převážně určování pK_a hodnot a jejich vztahu k substituentům [20,21], studie intramolekulárních vazeb a přenosu protonu [22-26] či posuny barevnosti anthrachinonových barviv v závislosti na substituentech a použitém rozpouštědle a jeho pH [27]. Hodnoty pH roztoků a pK_a barviv jsou také spojovány jak s barvivostí a stabilitou barev, tak i s hydrofobicitou anthrachinonových barviv [17,28], která je zásadní pro separaci těchto barviv pomocí separačních analytických metod.

2.4.1 Separační metody

Organická barviva studovaná v této práci jsou převážně deriváty anthrachinonu, k jejichž identifikaci je nejčastěji využívána chromatografie, tedy

rozdělení látek mezi dvě nemísitelné fáze na základě jejich polarity. Pro separaci a posléze identifikaci organických barviv lze nejčastěji uplatnit papírovou chromatografii, tenkovrstvou chromatografii, plynovou chromatografii či v současnosti nejrozšířenější vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Papírová chromatografie byla nahrazena tenkovrstvou chromatografií (TLC) díky variabilitě stacionárních fází nanesených na vhodné desce. Tato metoda je díky své nenáročnosti na experimentální vybavení používaná k rychlé identifikaci barviv a určení jejich čistoty. Organická barviva byla dříve úspěšně separována na mikrokrystalické celulóze (jako stacionární fáze) s vyvíjecími roztoky tvořenými: nejčastěji 35/6/45 (v/v/v) tetrahydrofuran/octan ethylnatý/voda, dále 95/5 (v/v) methanol/mravenčí kyselina či 2/1/10 (v/v/v) *terc*-butanol/mravenčí kyselina/voda [4]. Alizarin a purpurin byly separovány po extrakci hydrolyzovaných kořenů mořeny barvířské na polyamidové desce roztokem 90/10 (v/v) toluen/octová kyselina s následnou UV detekcí či vybarvením parami amoniaku [9]. Autorka [5] uvádí jak přehled vyvíjecích soustav pro TLC analýzu jí popsaných organických barviv modrých, žlutých, černých a červených odstínů, stejně tak příklady analýzy reálných vzorků vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Plynová chromatografie (GC) vyžaduje převod analytu do plynné fáze a je tak častěji využívaná k identifikaci těkavých látek. Pro potřeby restaurování se uplatnila při identifikaci některých organických barviv, převážně pak pro identifikaci pojiv. Chemické složení žlutého oleje získaného z mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*) bylo identifikováno pomocí GC ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) [29]. Mořena, a další barviva, byla identifikována pomocí metody Py-GC/MS (pyrolytická plynová chromatografie s hmotnostní detekcí) po derivatizaci a následné identifikaci trimethylsilylderivátů alizarinu, purpurinu, quinizarinu a xanthopurpurinu [30]. Autoři [31] srovnávají identifikaci v malbě používaných proteinových pojiv metodami GC-MS a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenčním detektorem. Obě metody vykazují podobnou citlivost, limity detekce, ale dynamický lineární rozsah má vyšší GC-MS oproti HPLC. Metodou HPLC se ale podařilo identifikovat všechny proteiny, umožňuje použití netoxických derivatizačních činidel a je časově méně náročná. K identifikaci organických barviv lze také využít hmotnostní spektrometrii bez spojení se separační technikou. Metoda MALDI-TOF-MS (ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s hmotnostním detektorem doby letu) umožňuje

nejen identifikaci, ale i kvantifikaci organických barviv (mořena, laka, košenila, dále naftochinonová a indolová barviva). [32,33]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pro separaci barviv chinonového charakteru využívána nejčastěji v reverzním separačním uspořádání. RPLC (kapalinová chromatografie s reverzní fází) ve spojení s UV-Vis a MS detekcí a kolonou Zorbax SB-C18 s mobilní fází 80/20 (v/v) methanol/voda + 0,2 % octové kyseliny byla úspěšně použita pro identifikaci karmínové kyseliny, lakaové kyseliny, alizarinu a purpurinu [34]. Optimalizované techniky autoři ověřili i na extraktech košenily a kraplaku (mořeny). Mořena barvířská (*Rubia tinctorum*) byla také předmětem studia autorů [35]. Pomocí izokratické HPLC s UV detekcí při 254 nm na koloně Purospher RP-C18 s mobilní fází tvořenou směsí 45/55 (v/v) acetonitril/0,2 $mol \cdot dm^{-3}$ octanový pufr (pH 4,2) identifikovali v aglykonu *Rubia tinctorum* lucidin, purpurin, xanthopurpurin, rubiadin a majoritní alizarin. Alizarin a purpurin byly také separovány a stanoveny pomocí gradientové HPLC na koloně Cosmosil 5C18-AR s mobilní fází tvořenou 70/30 – 5/95 (v/v) 0,2 $mol \cdot dm^{-3}$ KH_2PO_4/methanol [36]. Identifikaci organických barviv a jejich extrakci z textilních vláken se věnují práce [37-41]. Novotná a kol. [37] identifikovala a kvantifikovala pomocí HPLC s reverzní fází devět přírodních chinonových barviv, mj. alizarin, purpurin, xanthopurpurin, karmínovou kyselinu a lakaovou kyselinu (forma A-E). Optimalizovanými podmínkami identifikace alizarinu, purpurinu a xanthopurpurinu v mořeně barvířské byla kolona Purospher RP18e s mobilní fází 75/25 (v/v) methanol/0,2 $mol \cdot dm^{-3}$ octanový pufr (pH 4,3) při izokratické eluci. V extraktu z textilních vláken po extrakci směsí 50/25/25 (v/v/v) HCl/voda/methanol autoři identifikovali alizarin a purpurin. Stejné extrakční směsi využili i autoři [38] k identifikaci organických barviv z vláken církevních rouch z řeckého Mount Athos z 15. - 19. století. Reverzní HPLC na koloně Alltima HP C18 s gradientovou elucí a směsí 0,1 % TFA (trifluoroctová kyselina) ve vodě a 0,1 % TFA v acetonitrilu autoři identifikovali alizarin, purpurin a lakaovou kyselinu typu A v červených vláknech roucha císaře Ioannis Tsimiskis a praotce Dionysiou Mouselimi, a karmínovou kyselinu v rouchách praotce Kirylou a biskupa Velegradon Ieremiou. Technikou šetrnější extrakce organických barviv kyselinou fluorovodíkovou se zabývá autorka [39]. V extraktech z barevných vrstev keramického džbánu, čínských papírových tapet a malířských pláten autorka identifikovala mj. alizarin, purpurin, karmínovou

kyselinu, lakaovou kyselinu typu A, brazilein, pseudopurpurin a munjistin pomocí HPLC s kolonou Alltima HP C18 a gradientovou elucí kvartérní směsí tvořenou methanolem, 5 % acetonitrilem ve vodě, 0,1 % TFA v 50/50 (v/v) methanol/voda a acetonitrilem. HPLC byla využita i v práci [40] k ověření strukturních změn vlněných vláken barvených mořenou (respektive alizarinem a purpurinem) vystavených přírodnímu či urychlenému (umělému) stárnutí. Technika HPLC byla doplněna UV-Vis spektroskopií, která sledovala průběh urychleného stárnutí z hlediska změny pozice absorpčního maxima, a tedy změny barevného odstínu. Degradační procesy jsou obecně vyšší u purpurinu oproti alizarinu a jsou jimi snížení absorbance a intenzity emise jak barviva, tak vlny, a modrý barevný posun barviva (posun fluorescence barviva směrem k nižším vlnovým délkám). Mořidlo má ochranný účinek na degradaci oproti přítomnosti kyslíku, který významně ovlivňuje stárnutí a celkově degradaci urychluje.

Mezi separační techniky patří i metody elektromigrační, především kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Autoři [42] popisují identifikaci přírodních pigmentů používaných jako potravinářská barviva. Laku a košenilu lze identifikovat metodou MEKC v nepokryté kapiláře s elektrolytem tvořeným mravenčanem amonným o pH 7,0 s přídavkem BBMA (sodná sůl kopolymeru butyl akrylát-butyl metakrylát-metakrylová kyselina) a 0,001 $mol \cdot dm^{-3}$ EDTA (disodná sůl ethylendiamin-tetraoctové kyseliny) s dobrým rozlišením do čtrnácti minut. Laku i košenilu identifikovali i v reálných vzorcích komerčních nápojů a želé. Alizarin a purpurin byly identifikovány v methanolickém extraktu byliny *Rhei Rhizoma* v nepokryté kapiláře s elektrolytem 10/90 (v/v) acetonitril/0,03 $mol \cdot cm^{-3}$ tetraboritan sodný o pH 10,6 do dvaceti minut, při aplikovaném napětí 23 kV a UV detekci při 260 nm [36]. Většina literatury je zaměřena na farmakologicky aktivní anthrachinonové deriváty obsažené v čínské bylině rhubarb (*Rheum rhabarbarum*), kterými jsou aloe-emodin, rhein, emodin, physcion a chrysophanol. Separaci těchto látek pomocí separačních metod TLC, HPLC, CZE, MEKC a mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC) se věnují autoři [43]. Tyto deriváty jsou velmi blízké alizarinu a purpurinu, proto byly podmínky stanovení složek bylin rodu *Rhein* převzaty i pro nalezení optimálních podmínek, nejlépe univerzálních, pro identifikaci anthrachinonových přírodních barviv studovaných v této práci. Aloe-emodin, rhein, emodin, physcion

a chrysophanol byly stanoveny v extraktu byliny *Rheum* a v přípravcích ji obsahujících metodou CZE s rozlišením až na základní linii do dvaceti minut v nepokryté kapiláře s elektrolytem tvořeným 0,015 mol·dm^{-3} tetraboritanem sodným (pH 9,30), 0,030 mol·dm^{-3} *β*-cyklodextrinem, 20 % acetonitrilu a 1 % ethandiolu při vloženém napětí 20 kV a detekci při 254 nm [44]. Využití cyklodextrinů (CD) v CZE či MEKC pro separaci derivátů anthrachinonu se zabývají i autoři [45-48]. V extraktu *Rhei rhizoma* stanovili autoři [45] emodin, chrysophanol, aloe-emodin, rhein a jejich glukosidy v nepokryté kapiláře s 0,005 mol·dm^{-3} *α*-cyklodextrinem (α-CD) v 0,03 mol·dm^{-3} tetraboritanu sodném (pH 10,0) obsahujícím 20 % acetonitrilu, aplikované napětí 20 kV a detekci při 254 nm. Kromě α-CD, který byl nejvhodnější, autoři vyzkoušeli i hydroxypropyl-*β*-CD, *γ*-CD, hydroxypropyl-*γ*-CD a *β*-CD. V práci [46] byl nejvýhodnějším systémem separace emodinu, chrysophanolu, aloe-emodinu, rheinu a physcionu 0,035 mol·dm^{-3} fosfátový pufr (pH 11,0) obsahující 0,020 mol·dm^{-3} *β*-CD a 2 mol·dm^{-3} močovinu při aplikovaném napětí 20 kV a detekcí při 254 nm v nepokryté kapiláře. 0,05 mol·dm^{-3} Hydroxypropyl-*γ*-CD v 0,1 mol·dm^{-3} borátovém pufru (pH 9) s přídavkem 10 % acetonitrilu byl nalezen jako optimální systém pro stanovení chrysophanolu a emodinu v extraktu z rostliny *Cassia siamea* v nepokryté kapiláře při vloženém napětí 20 kV a detekci při 254 nm [47]. V této práci byl studován i ternární fázový systém, kdy výše uvedený elektrolyt obsahoval přídavek 0,015 mol·dm^{-3} SDS (dodecylsulfát sodný), čímž byla využita metoda MEKC, ovšem autorům se za těchto podmínek nepodařilo analyty odseparovat s dostatečným rozlišením. MEKC analýza týchž analytů byla úspěšná v práci [48] za experimentálních podmínek: nepokrytá kapilára, napětí 15 kV, detekce při 254 nm, elektrolyt: 0,02 mol·dm^{-3} borátový pufr (pH 11) obsahující 0,02 mol·dm^{-3} SDS a 0,02 mol·dm^{-3} STC (taurocholát sodný) s 0,015 mol·dm^{-3} *β*-CD. Další autoři úspěšně využili ke stanovení chrysophanolu, emodinu a rheinu v extraktech rostlin MEKC, kde povrchovou aktivní látkou tvořící micelární systém byl deoxycholát sodný (SDC). Byl to 0,025 mol·dm^{-3} SDC v 0,050 mol·dm^{-3} borátovém pufru o pH 11 [49]; 0,02 mol·dm^{-3} SDC v 0,02 mol·dm^{-3} borátovém pufru o pH 9 s přídavkem 15 % acetonitrilu [50] a 0,02 mol·dm^{-3} SDC v 0,05 mol·dm^{-3} borátovém pufru (H_3BO_3-NaOH) o pH 10 [51]. Využitím SDS, který je v MEKC častějším anionogenním tenzidem, se zabývala řada autorů. Aby vůbec došlo k tvorbě micel, je potřeba dosáhnout alespoň tzv. kritické micelární

koncentrace SDS, která se liší dle zvoleného elektrolytu a rozpouštědla [52-55]. V práci [56] byl sledován vliv koncentrace SDS, acetonitrilu a pH elektrolytu na separaci rheinu, emodinu a aloe-emodinu v extraktech čínských léčivých bylin. Optimálním elektrolytem byl nalezen roztok 25/75 (v/v) acetonitril/(0,01 mol·dm^{-3} SDS v 0,015 mol·dm^{-3} tetraborátu sodném s 0,0125 mol·dm^{-3} dihydrogen-fosforečnanem sodným, pH 9,34). Kapilární elektroforéza bývá také často spojována s hmotnostní detekcí pro vyšší citlivost detekce oproti UV-Vis detekci. Autoři [57] srovnávají obě detekční techniky pro stanovení karmínové kyseliny, lakaové kyseliny typu A, B a E, alizarinu, purpurinu a emodinu v extraktech komerčně dostupných barviv laka, košenila a mořena (kraplak). Kapilární elektroforetická měření probíhala v nepokryté kapiláře s vloženým napětím 25 kV a elektrolytem tvořeným 0,005 mol·dm^{-3} fosforečnanem sodným (pH 8,5) v případě UV detekce (při 260 a 270 nm), respektive 0,02 mol·dm^{-3} uhličitanem amonným (pH 9,0) v případě hmotnostní detekce ionizací elektrosprejem. Autoři uvádějí, že hmotnostní detektor je selektivní a citlivější než detekce UV (DAD detektor) a lze jím identifikovat alizarin, purpurin či emodin i v případě separace analytů s nedostatečným rozlišením. Technika MS je speciálně použitelná pro identifikaci více polárních analytů, například karmínové a lakaové kyseliny. Navíc spojení CZE-MS umožňuje rozlišení typů lakaové kyseliny, což není možné například v případě HPLC. HPLC byla porovnávána i s metodou MEKC se spektrofotometrickou detekcí pro identifikaci přírodních flavonových a anthrachinonových barviv extrahovaných z vlněných vláken. I zde dosáhla MEKC vyšší účinnosti separace barviv [58]. MEKC byla použita i pro identifikaci barviv z barevných vrstev pláten [59]. Pro separaci červených organických pigmentů mořeny, košenily, santalu, brazilského dřeva, laky a dračí krve byl jako povrchově aktivní látka použit 0,02 mol·dm^{-3} SDS v 0,02 mol·dm^{-3} tetraboritanu sodném s přídavkem 10 % acetonitrilu. Měření probíhala na nepokryté kapiláře s vloženým napětím 20 kV a detekcí při 214 nm či 254 nm. Všechna barviva byla separována s dobrým rozlišením na základní linii do třinácti minut a optimalizovaná technika byla ověřena na identifikaci červeného pigmentu z olejové malby 17. století, kterou byla mořena, v níž byly identifikovány hlavní barvicí složky alizarin (majoritní složka), a dále quinizarin a purpurin. Kapilární elektroforéza je využívána také k forenzním analýzám anthrachinonových barviv

a jejich komplexů na nylonových vláknech, ze kterých jsou extrahovány pomocí mikroextrakce [60].

2.4.2 Spektrální metody

V popředí zájmu jsou však nejvíce spektrometrické metody, které jsou rychlé, nedestruktivní a mnohdy nevyžadují žádný odběr vzorku či odběr pouze malého množství. Nezastupitelnou roli zde představuje mikroskopie pod viditelným i ultrafialovým světlem. Obě techniky jsou v praxi restaurátorů - konzervátorů již samozřejmým rutinním postupem identifikace především anorganických pigmentů, ale také některých pigmentů organických. Molekulová absorpční spektrofotometrie je zařazována spíše jako detekční metoda spojená s některou výše uvedenou separační technikou, ale představuje nezbytnou techniku pro zjištění vlnové délky příslušející maximální absorbanci studovaného barviva v daném rozpouštědle. Jelikož organická barviva podléhají de/protonizaci, závisí jejich absorpční maximum také na pH rozpouštědla a pojiv, čehož se využívá nejen v malbě, ale také k stanovení hodnot pK_a barviv. Autoři [12] studovali změny vlnové délky absorpčního maxima hematoxylinu, hemateinu a jeho komplexu s hliníkem v methanolu a vodě při různých hodnotách pH jak molekulovou spektrofotometrií v oblasti UV-Vis, tak i infračervenou spektroskopií (IR) pro zjištění pozice a okolí C-O skupiny. UV-Vis a infračervená spektra komplexu platiny s quinizarinem (1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon) jsou uvedena a interpretována v práci [13]. Alizarin a jeho komplexy či krystaly jsou nejčastěji studovány pomocí RTG analýzy v kombinaci s infračervenou spektroskopií a popřípadě s elektronovým mikroskopem [61-63]. Alizarin, purpurin a quinizarin byly nejen separovány pomocí HPLC, ale také byl studován vliv jejich intramolekulární vodíkové vazby na jejich spektroskopické vlastnosti metodami UV-Vis a infračervené spektroskopie [24]. Infračervená spektra barviv byla měřena transmisně v bromidových tabletách (KBr) a UV-Vis spektra v methanolickém roztoku barviv. Infračervená spektroskopie je v současnosti významnou nedestruktivní technikou používanou především při identifikaci plošných barevných vrstev, jak už obrazů, tak i fresek, nástěnných tapet a tapisérií. Organická barviva silně absorbují infračervené záření, proto k jejich identifikaci byla zvolena technika zeslabené totální reflektance, tedy na ATR

krystalu [64,65]. Autoři [64] sledovali také homogenitu koncentrace alizarinu a dalších dvou pigmentů v modelovém vzorku barevné vrstvy nanesené na plátně pro predikci výběru odběrových míst či místa měření *in situ*. Barevnou vrstvou zde byla směs pigmentu a lněného oleje. V práci [65] autoři rozšířili mapování pigmentů na povrchové barevné olejové vrstvy po urychleném stárnutí zajištěné expozicí UV záření. V infračerveném spektru uměle stárnutého alizarinu v lněném oleji nedošlo ke změně pozice vibračních pásů oproti nestárnutému vzorku. Barviva, která nevykazují příliš silnou fluorescenci, jsou identifikována také Ramanovou spektroskopií. FT-Raman (Ramanova spektroskopie s Fourierovou transformací) byla použita pro nalezení oblasti „fingerprint“ brazilinu a brazileinu, hlavních barvicích složek barviva brazil [66]. Tyto vibrace C=O a C=C vazeb v spektrální oblasti mezi 1700 a 1500 cm^{-1} byly použity pro ověření identifikace brazilu v 80 let starém brazilském dřevu *Caesalpinia echinata*. Technika byla ověřena i pomocí infračervené spektroskopie. Spektroskopické chování derivátu alizarinu ARS (sůl 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon-3-sulfonové kyseliny) sorbovaného na fluorit při různých hodnotách pH je studováno také technikou FT-Raman a metodou DRIFT (FTIR s difúzním odrazem) [67]. Ramanova mikroskopie je využívána k analýze pojiv a podkladových vrstev malby, které jsou převážně proteinové povahy, například vaječný bílek, vaječný žloutek, mléko, kasein a klih [68]. Identifikace pojiv byla porovnána v přírodních a urychleně stárnutých vzorcích. Ramanova mikroskopie organických barviv navázaných na vlněné vlákno je předmětem studia autorů [69]. Přírodní vlněná vlákna a vlákna barvená mořenou, borytovou modří a rezedou barvířskou byla podrobena urychlenému stárnutí pod lampou simulující sluneční záření (150 klux) po dobu 200 – 800 hodin. Byl tak sledován vliv stárnutí na složení proteinových vláken vlny bez barviv a vláken barvených. Vlákno barvené mořenou vykazuje v Ramanově mikroskopii (excitace 532 nm) silnou fluorescenci samotného barviva, která zcela zakrývá vibrační pásy vlněného vlákna, a to i po urychleném stárnutí po dobu 800 hodin, a nedochází k výrazné degradaci vlákna. Přítomnost anthrachinonových barviv, konkrétně komplexu mořeny (respektive alizarinu) s ionty mořidla, ve vlněném vláknu zvyšuje jeho světelnou stálost. Vysoká fluorescence anthrachinonových barviv znemožňuje jejich identifikaci pomocí Ramanovy spektroskopie, proto se k jejich identifikaci využívá nejčastěji metoda SERS (povrchem zesílený Ramanův rozptyl). Alizarin tak byl identifikován

technikou SERS [70] s použitím stříbrných nanočástic rozpuštěných ve vodném roztoku dusičnanu stříbrného. Tato technika tak umožňuje identifikaci anthrachinonových barviv v uměleckých předmětech, textilních vláknech, potravinách a obecně v plošných vzorcích *in situ*, v případě umístění barviva na hydrofilní substrát. Stříbrné ionty mohou být však nahrazeny polymerem Zr-Ormosil (organicky modifikovaný silikát), který byl využit v práci [71] k identifikaci směsi alizarinu a karmínové kyseliny (excitace 785 nm). Podmínky měření byly optimalizovány pro identifikaci alizarinu v Zr-Ormosilu v různých rozpouštědlech, hodnotách pH a koncentracích barviva. Změna barevnosti byla také sledována UV-Vis spektrofotometrií alizarinu i karmínové kyseliny v roztoku 50/50 (v/v) 0,001 mol·dm^{-3} DMSO (dimethylsulfoxid)/voda při hodnotách pH 3, 6 a 12. Autoři [72] využili k semikvantitativní analýze a vzájemnému rozlišení alizarinu a purpurinu metodu SERRS (povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl) s koloidním stříbrem při excitaci 514 nm a 632 nm pro různé hodnoty pH. Alizarin, karmínová kyselina a barvivo laka byly identifikovány metodou SERS na substrátu tvořeném stříbrným filmem naneseným na nanočástice aluminy (oxid hlinitý) při excitaci 632 nm a 785 nm [73]. Autoři uvádějí srovnání Ramanovy spektroskopie a SERS všech tří barviv, z nichž v Ramanově spektroskopii je patrná vysoká fluorescence samotných barviv překrývající vlastní vibrační pásy. Identifikace alizarinu byla za optimalizovaných podmínek validována a ověřena na hedvábné textilii barvené extraktem z kořene mořeny barvířské. Barviva alizarin, purpurin, lakaová kyselina, karmínová kyselina, brazilin, brazilein, hematoxylin a hematein byly analyzovány metodou SERS [74] obsahující koloidní stříbro redukované citrónovou kyselinou či hydroxylaminem, Tollensovo zrcadlo a vakuově napařený stříbrný film (Ag nanoisland film) při excitaci 785 nm. Autoři dále optimalizovali extrakci barviv z textilních vláken a vyvinuli bezextrakční hydrolýzu vláken zahříváním v parách kyseliny fluorovodíkové, čímž dojde k odstranění uhličitanů a usnadnění FTIR analýzy barviv. Technika byla ověřena při analýze červeného vlákna z holandské tapisérie ze 16. století, ve kterém byl identifikován alizarin. Technice SERS a její uplatnění v restaurování a konzervování jsou věnovány i práce [75,76]. První práce se věnuje identifikaci jak syntetických barviv alizarinu, purpurinu a karmínové kyseliny, tak i přírodních historických pigmentů mořeny, košenily, brazilu, kermesu a laky. Ke snížení fluorescence barviv autoři využili stříbrný film (Ag island film) [75] a při excitaci

632 nm získali velmi kvalitní detailní Ramanova spektra barviv aplikovaných v rozličných pojivech a podložkách. Technika byla opět ověřena na reálných vzorcích barvených textilií. Druhá práce srovnává využití stříbrného filmu (Ag island film) a AgFON (silver film over nanosphere = stříbrný film na křemičitanové vrstvě) pro identifikaci alizarinu, purpurinu, karmínové kyseliny a laky obsahující lakaovou kyselinu typu A-E. Využitím AgFON byla získána spektra s vyšším rozlišením a přesností než u Ag island filmu, čehož lze využít nejen k identifikaci jednotlivých barviv, ale i směsi barev již od koncentrací 15 ng·µL [76]. V současnosti také vznikají knihovny spekter obsahující infračervená a Ramanova spektra samostatných pigmentů i organických barviv [77,78]. Jednotlivá spektra však nezohledňují podložky barevných vrstev, pojiva, podkladové vrstvy maleb a příměsi, které tvoří velmi složitou matrici.

2.5 PRINCIPY METOD

2.5.1 Tenkovrstvá chromatografie – TLC

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) patří mezi základní analytické separační metody. Díky své instrumentální nenáročnosti, rychlosti a v neposlední řadě nízké ceně se využívá převážně k určování čistoty a k orientační identifikaci široké škály látek anorganického i organického původu. Je vhodná především pro barevné látky, kdy již není potřeba následného vybarvování, kterého se případně využívá k detekci bezbarvých látek.

Principem separace analytů metodou TLC je rozdílná migrace látek v systému dvou fází. Jednou je tzv. stacionární (zakotvená) fáze a druhou je fáze vyvíjecí (pohyblivá), která s sebou unáší analyty ze startovací linie. Vzlínání vyvíjecí fáze je podpořeno nasycenými parami vyvíjecí fáze, které tak vytváří pomyslnou třetí fázi. K samotné separaci látek dochází na základě jejich rozdílné polarity, adsorpce, rozpouštění (rozdělování), výměně iontů, efektu molekulového síta či případně jejich kombinace. V této práci byla využita adsorpční TLC, u níž je stacionární fáze tvořena tuhým sorbentem naneseným v tenké vrstvě na vhodnou desku, a vyvíjecí fáze se skládá ze směsi rozpouštědel, obvykle s přídavky kyselin, bází nebo tlumivých roztoků. Podle polarity tuhého sorbentu rozlišujeme „normální fázi“, kdy sorbent (zde silikagel) je polárnější než vyvíjecí

fáze, a fázi „reverzní“, kdy sorbent (zde silikagel s navázaným oktadecylem) je méně polární než vyvíjecí fáze.

Většina vybraných červených organických barviv obsahuje deriváty anthrachinonu, které jsou převážně nepolární či slabě polární. K jejich separaci lze tedy využít normální mód, kdy stacionární fázi tvoří polárnější silikagel a méně polární vyvíjecí fázi směs organických rozpouštědel. Potřeba vysoké čistoty organických rozpouštědel a použití různých vyvíjecích soustav pro jednotlivá barviva analýzu ztěžuje jak časově (v případě destilačního čištění), tak především finančně. Z tohoto důvodů byl hledán nový „univerzální“ eluční systém pro separaci organických barviv s využitím silikagelových stacionárních fází.

2.5.2 Kapilární elektroforéza – CZE a MEKC

Kapilární elektromigrační metody se používají díky své vysoké účinnosti separace, velké rychlosti analýzy a malé spotřebě vzorku a činidel. Nevýhodou těchto technik je destrukce vzorku, menší reprodukovatelnost a potřeba složitější instrumentace, která se odráží v ceně analýzy. Pro analýzy anthrachinonových barviv se využívají kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie.

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vhodná pro separaci a stanovení kladně i záporně nabitých molekul v homogenním elektrickém poli současně během jednoho experimentu. Dělení nabitých látek je založeno na rozdílných elektroforetických pohyblivostech (mobilitách) analytů, tedy jejich rozdílného pohybu v základním elektrolytu. Tato pohyblivost je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Analyzované látky se pohybují v elektrolytu nejen vlastní pohyblivostí, ale jsou unášeny směrem k detektoru samotným elektrolytem, tzv. elektroosmotickým tokem.

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je obdobou kapilární zónové elektroforézy. Slouží především k separaci nenabitých (převážně hydrofobních) molekul na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a pseudo-stacionární fází, která je tvořena micelami. Micely vytvářejí povrchově aktivní látky (kationogenní, anionogenní, neionogenní tenzidy), které jsou přidávány do elektrolytu (vodná fáze) ve vyšší koncentraci

než je tzv. kritická micelární koncentrace, tedy koncentrace nutná k tvorbě micel. Nejpoužívanějším anionogenním tenzidem je dodecylsulfát sodný (SDS), který tvoří záporně nabité micely a má tudíž vlastní elektroforetickou pohyblivost. Separované látky se rozdělují mezi micely a nosný elektrolyt podle své polarity. Analyt, který je úplně rozpustný v micelách, vytváří tzv. horní mez elučního okna, tedy k detektoru doputuje nejpomaleji, naopak dolní mez je určena neinteragujícími látkami, které migrují s elektroosmotickým tokem.

Těchto vysoce účinných separačních technik lze využít k identifikaci barviv ve složitých organických matricích barevných vrstev uměleckých děl. Identifikace je založena na porovnání elektroforetických pohyblivostí neznámých analytů s elektroforetickými pohyblivostmi standardů známých přírodních či syntetických organických barviv za optimalizovaných experimentálních podmínek měření.

2.5.3 Infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie

Spektroskopické metody, především infračervená spektroskopie (IR) a Ramanova spektroskopie, jsou v popředí zájmu pro svou rychlost a nedestruktivnost. Nevyžadují žádný odběr vzorku či postačuje odběr jen malého množství, které se během analýzy nezničí. Nevýhodou těchto metod je strukturní složitost organického vzorku oproti vzorkům anorganickým. Ta ztěžuje identifikaci látky na základě porovnání naměřených spekter s knihovnou spekter, která obsahuje především spektra jednoduchých matric.

Tyto metody jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s molekulami či atomy analyzovaných látek, kdy dochází k energetické změně původního záření (dojde k absorpci či emisi záření) nebo k odrazu či rozptylu záření. Molekuly látek při absorpci záření přijmou energii a dojde ke zvýšení energetického stavu molekuly spojeného se změnou rotačního a vibračního stavu molekul či s přeskokem elektronů z nižších energetických hladin do hladin vyšších vedoucí až k ionizaci molekul (podle množství přijaté energie). Při emisi naopak dochází k vyzáření energie molekul a k jejich navrácení do nižšího energetického stavu. Množství absorbované či emitované energie je pro daný elektronový systém, potažmo pro jednotlivé molekuly, specifický. Toho se využívá k identifikaci látek, především barviv, která absorbují záření ve

viditelném spektru a k jejichž excitaci stačí nižší energie záření, tedy v oblasti infračerveného či viditelného spektra.

Identifikace historických přírodních organických barviv v reálných vzorcích barevných vrstev či barvených textilií spektrálními technikami je založena na nalezení a určení specifických vibračních pásů jednotlivých barviv, které jsou pro ně jedinečné a lze jimi tato barviva rozlišit i ve směsi na různých typech podložek. Hlavní barvicí složky studovaných barviv obsahují převážně chinoidní struktury, lišící se prostorovým uspořádáním a počtem aromatických kruhů, hydroxylových a alkylových skupin. Průběh infračervených spekter barviv převážně ovlivňují jejich hlavní barvicí složky, jejichž vibrační pásy jsou využívány k identifikaci samotného barviva.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

3.1.1 Barviva

Barviva akaroid, kamala a kraplak byla zakoupena od firmy Kremer Pigmente GmbH & Co KG, Německo. Barviva dračí krev, košenila (sušené zadečky oplodněné samičky červce nopálového) a santal byla získána od firmy Sandragon s.r.o., ČR. Další barviva brazil, kampeška a laka byla použita ze zdrojů Ústavu chemické technologie restaurování památek, VŠCHT Praha.

Nedeklarované čistoty barviv byly zjištěny pomocí prvkové röntgenové fluorescenční analýzy.

3.1.2 Standardy

Standardy hlavních barvicích látek karmín, karmínová kyselina, lakaová kyselina (Natural red 25), hematein a rottlerin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Německo. Purpurin (1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon, > 95,0 %) byl poskytnut firmou Fluka Chemie, Švýcarsko, obdobně jako quinizarin (1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon, > 95,0 %). Alizarin (1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon), 2-hydroxy-9,10-anthrachinon, 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthrachinon a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-anthrachinon byly dodány Mikrobiologickým ústavem AV ČR o čistotě > 98,0 % [35,79]. 1-hydroxy-9,10-anthrachinon (čistota 95,0 %) byl získán od firmy Tokyo Chemical Industry, Japonsko.

3.1.3 Reálné vzorky

Extrakt *Rubia tinctorum* (ve formě aglykonu) byl zakoupen u firmy Timus Avid Co. v Íránu (batch No. 11 702 – 11 704) a drcené kořeny *Rubia cordifolia* byly zakoupeny od Chakrapani Ayurveda Clinic & Research Center (Indie). Dále mycelium houby *Geosmithia lavendula* (rostoucí na agaru po 10 dní) bylo dodáno Mikrobiologickým ústavem AV ČR [79]. Čtyři reálné vzorky různě červeně zbarvených vlněných vláken z barokní kasule ze sbírky Vlastivědného muzea Dr.

Hostaše v Klatovech byly zapůjčeny z Národního muzea v Praze Ing. Jindřiškou Drozenovou.

3.1.4 Další chemikálie

Pro přípravu vyvíjecí fáze v TLC a elektrolytů v CZE a MEKC byl použit methanol (MeOH), dodecylsulfát sodný (SDS) a acetonitril (ACN), všechny od firmy Sigma-Aldrich (Německo), dále triethylamin (TEA, Fluka Chemie, Švýcarsko), tetraboritan sodný dekahydrát, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný a octan sodný trihydrát (všechny od firmy Lachema, ČR), kyselina chlorovodíková od firmy Penta (ČR), dichlormethan (nečištěný) a hydroxid sodný, oba od firmy Lach-Ner (ČR). Thiomočovina ($CS(NH_2)_2$, Fluka Chemie, Švýcarsko) a Sudan III (1-[4-(fenylazo)fenylazo]-2-naftol, Sigma-Aldrich, Německo) byly použity k určení elektroosmotického toku, respektive k určení mobility micel.

Pro čištění ocelové podložky při měření infračervených a Ramanových spekter byl použit chloroform (Sigma-Aldrich, Německo) a dále pro přípravu modelových vzorků barvené textilie síran draselnohlinitý dodekahydrát (Lachema, ČR), uhličitan sodný bezvodý (Lachema, ČR) a octová kyselina (Penta, ČR). Pro přípravu modelových vzorků olejové malby na skleněné podložce byl použit polymerovaný lněný olej (Umton barvy, ČR) a zinková běloba (ZnO), titanová běloba (TiO_2), olovnatá běloba ($2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$) a křída ($CaCO_3$) ze zdrojů Ústavu chemické technologie restaurování památek, VŠCHT Praha.

K přípravě všech vodných roztoků a k promývání byla použita deionizovaná voda. Jednotlivé analyty byly pro měření na TLC, CZE a MEKC rozpuštěny v methanolu [41,80]. Během příprav modelových vzorků barvené textilie byla použita destilovaná voda.

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Mikroskopická spektroskopická měření v infračervené oblasti v módu reflexní absorpce (rozsah vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1}) byla prováděna v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha na přístrojích Bruker IFS 66v s IR mikroskopem Hyperion s automatickým skenovacím stolkem a na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo-Nicolet, USA) ve spojení s mikroskopem

Continuum. Disperzní Ramanova spektroskopie byla prováděna v rozsahu vlnočtů 300 – 2500 cm^{-1} pro dva budicí lasery (červený o λ = 785 nm a zelený o λ = 532 nm) na přístroji Jobin-Yvon Labram HR Raman spectrometer s konfokálním mikroskopem Olympus a CCD detektorem opět v Centrálních laboratořích VŠCHT, Praha. K vyhodnocování získaných spekter byl použit software OMNIC 7.3.

Elektroforetická měření byla prováděna na Katedře analytické chemie PřF UK na přístrojích $HP^{3D}CE$ systém s diode-array detektorem (Agilent Technologies, Německo) a PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko) s UV-Vis spektrofotometrickým detektorem Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). Měření byla prováděna při teplotě 25 °C na nemodifikované křemenné kapiláře firmy CACO s.r.o. (Slovensko) o parametrech: vnitřní průměr d_i = 75 μm, vnější průměr d_o = 380 μm, délka kapiláry k detekčnímu okénku L_D = 55,8 cm a celková délka kapiláry L_C = 70 cm. Kapilára byla na začátku měření promývána deionizovanou vodou (5 min), 1 $mol \cdot dm^{-3}$ NaOH (10 min), opět vodou (5 min) a elektrolytem (10 min). Během analýz byla kapilára promývána 0,1 $mol \cdot dm^{-3}$ či 1,0 $mol \cdot dm^{-3}$ NaOH (2 min), deionizovanou vodou (3 min) a elektrolytem (3 min).

Při separaci metodou TLC byly použity dva typy destiček, aluminiové destičky se silikagelem a fluorescenčním indikátorem pro 254 nm (normální fáze, tloušťka 0,2 mm, Silica gel/TLC-cards, Fluka Chemie, Švýcarsko) a aluminiové destičky se silikagelem s navázaným oktadecylem (RP-18W) a fluorescenčním indikátorem pro 254 nm (reverzní fáze, tloušťka 0,15 mm, Nano-Silica gel RP-18W on alu-foil, Fluka Chemie, Švýcarsko). K detekci v UV oblasti (při 254 nm) byla použita UV lampa a scaner HP Scanjet 4670 (Hewlett-Packard Development Company, USA).

Navážky byly navažovány na analytických vahách Precisa 262 SMA-FR (Precisa Instrument AG – Dietikon, Švýcarsko), pH bylo měřeno pH metrem JenWay 4330 Conduktivity & pH Meter (JenWay Ltd., Velká Británie) a roztoky analytů a elektrolyty byly sonifikováni v ultrazvukové lázni ULTRASONIC LC 30 H (Elma®, Německo).

Modelové vzorky olejové malby na skleněné podložce a barvené textilie byly podrobeny urychlenému stárnutí ozařováním zářivkou Philips TL20W/09N

ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti (cca 300 – 450 nm) po dobu 300 hodin v osvitové komoře v Národním archivu v Praze dle [65,69]. Teplota povrchu vzorků během ozařování byla přibližně (25 ± 2) °C a relativní vlhkost vzduchu v osvitové jednotce byla (15 ± 5) %.

3.3 PŘÍPRAVA MODELOVÝCH VZORKŮ OLEJOVÉ MALBY

Na skleněné mikroskopické sklo byla nanesena tenká vrstva směsi polymerovaného lněného oleje s barvivem rozmíchané do formy husté pasty. Zastoupení barviva ve směsi se lišilo podle kryvosti daného barviva následovně: brazil 24 % (obj.), kampeška 17 %, kamala 24 %, santal 30 %, kraplak 13 %, laka 5 %, akaroid 13 %, karmín 24 % a dračí krev 21 %.

Dále byly připraveny vzorky směsi barviva kamala a běloby (zinečnatá, titanová, olovnatá a křída) s polymerovaným lněným olejem v poměrech 1:2:5 a 1:2:10 (objemové díly). Tyto směsi byly opět naneseny v tenké vrstvě na mikroskopická skla.

3.4 PŘÍPRAVA MODELOVÝCH VZORKŮ BARVENÉ TEXTILIE

Pro přípravu modelových vzorků barvené textilie byla použita vlna s viskózou, která byla mořena buď síranem draselnohlinitým (vlna bílé barvy), síranem železnatým (žlutě zbarvená vlna) a nebo síranem měďnatým (modře zbarvená vlna). Textilie byla rozstřihána na obdélníky cca 3,4 x 2,7 cm a posléze barvena v barvicích lázních podle původních návodů [81] všemi barvivy vyjma akaroidu a dračí krve, pro které nebyla barvicí receptura získána.

3.4.1 Barvení košenilou

Zadečky sušených oplodněných samiček červce nopálového byly rozdrceny v třecí misce a naváženy (0,3091 g) do bavlněného hadříku, který byl svázán do svazečku a ponořen do kádinky s 30 ml destilované vody přes noc. Poté byl extrakt s bavlněným svazečkem přiveden k varu a ponechán vroucí po dobu 15 minut. Poté byl svazeček vyndán a extrakt zchlazen na teplotu 40 °C a zředěn destilovanou vodou na objem 30 ml. Obdélníčky vlny omyté pod proudem vody byly vloženy do barvicí lázně, která byla udržována na teplotě 90 °C po dobu

jedné hodiny. Poté byla lázeň zchlazena, obarvená vlna vyndána, řádně omyta tekoucí vodou a usušena na vzduchu.

3.4.2 Barvení kraplakem

Kraplak byl navážen (1,0242 g) na bavlněném hadříku, který byl svázán do svazečku a ponořen do kádinky s 60 ml destilované vody přes noc. Poté byl extrakt s bavlněným svazečkem přiveden k varu a nechán vroucí 10 minut, pak byl zchlazen, svazeček vyndán a extrakt doplněn destilovanou vodou do celkového objemu 600 ml. Do barvicí lázně zahřáté na teplotu 40 °C byly vloženy vodou omyté obdélníčky vlny a směs byla při teplotě 75 °C ponechána po dobu 30 minut. Poté byla lázeň zchlazena, obarvená vlna omyta pod tekoucí vodou a ponechána k vyschnutí na vzduchu.

3.4.3 Barvení santalem

Navážené množství santalu (2,0101 g) bylo v kádince přelito 15 ml methanolu s přídavkem dvou kapek smáčedla (Jaru) a ponecháno stát přes noc. Druhý den byla promíchaná směs santalu s methanolem přefiltrována přes plátěný hadřík a zachycený santal byl znovu promyt přes plátno 10 ml methanolu. K filtrátu bylo přidáno 25 ml destilované vody a několik kapek smáčedla (Jaru). Směs byla zahřáta na teplotu 50 °C a bylo k ní přidáno 0,2 ml zředěné octové kyseliny (30%) ke snížení hodnoty pH na rozmezí 3 – 4. Odmaštěné a omyté obdélníčky vlny byly vloženy do barvicí lázně o teplotě 90 °C a ponechány při této teplotě po dobu jedné hodiny. Poté byla lázeň zchlazena, vlna vyndána, omyta vodou i Jarem a usušena volně na vzduchu.

3.4.4 Barvení brazilem

1,0025 g Brazilu bylo ponecháno v kádince s 50 ml destilované vody přes noc. Extrakt byl dále přiveden k varu a ponechán po dobu jedné hodiny vroucí. Směs byla zředěna 5 ml destilované vody a přefiltrována přes bavlněný hadřík. K filtrátu bylo přidáno 5 ml destilované vody a lázeň byla zahřáta na teplotu 85 °C, kdy byly do ní vloženy vlněné obdélníčky omyté ve vodě a ponechané po

tři minuty ve vodě o teplotě 50 °C. Barvicí lázeň s vlnou byla udržována při teplotě 80 °C po dobu 45 minut a průběžně k ní byla přidávána destilovaná voda. Poté se lázeň nechala vychladnout, vzorky barvené vlny byly omyty pod proudem vody a usušeny na vzduchu.

3.4.5 Barvení kampeškou

Do bavlněného hadříku bylo naváženo 1,2000 g kampešky a z hadříku byl vyroben svazeček, který byl ponořen do kádinky s 40 ml destilované vody přes noc. Druhý den byl extrakt se svazečkem přiveden k varu a nechán vroucí po dobu jedné hodiny. Velmi zahuštěný extrakt byl zchlazen, svazeček vyndán a objem extraktu doplněn destilovanou vodou na 40 ml, z nějž bylo odebráno 20 ml k samotnému barvení. Vlněné obdélníčky omyté proudem vody byly vloženy do barvicí lázně a ta pak byla zahřáta na teplotu 90 °C a ponechána při této teplotě po dobu 30 minut za stálého přidávání destilované vody (asi 10 ml). Lázeň byla poté zchlazena, vlna vyndána, řádně omyta proudem vody a usušena na vzduchu.

3.4.6 Barvení kamalou

Navážené množství kamaly (0,3354 g) společně s 1,2113 g uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 25 ml destilované vody. Směs byla zahřáta na teplotu 90 °C a byly do ní vloženy vlněné obdélníky řádně omyté vodou. Směs byla ponechána po dobu 15 minut při teplotě 90 °C, pak k ní bylo přidáno 0,3198 g síranu draselnohlinitého (dodekahydrát) a dále byla ponechána dalších 15 minut při teplotě 90 °C. Poté byla lázeň zchlazena, vlněné obdélníčky umyty pod proudem tekoucí vody a nechány schnout na vzduchu.

3.4.7 Barvení lakou

Laka (0,5457 g) byla rozpuštěna v 300 ml destilované vody a zahřáta na teplotu 40 °C. Vlněné obdélníčky byly řádně omyty teplou vodou se smáčedlem (Jar), vloženy do barvicí lázně a při teplotě 90 °C ponechány po dobu 75 minut. Poté se lázeň nechala vychladnout, obarvená vlna byla vyjmuta, omyta ve vodě s Jarem a ponechána na vzduchu schnout.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této práci budou diskutovány výsledky, jež jsou zahrnuty v publikacích:

I. Svobodová E., Bosáková Z., Lokajová J., Tesařová E., Coufal P.: Use of Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography for Separations of Anthraquinone Derivatives; LANL-2010-0677.R1, přijato k tisku 28.7.2010 časopisem *Analytical Letters* (volume 44, issue 10, 2011).

II. Svobodová E., Bosáková Z.: Micellar Electrokinetic Chromatography of Natural Organic Dyes; In: *Proceedings*, 6th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha 2010, str. 87-91, ISBN 978-80-7444-005-2

III. Svobodová E., Ohlídalová M., Novotná M., Bosáková Z.: Srovnání separačních a spektroskopických technik pro identifikaci organických barviv; In: *Sborník z Konference konzervátorů-restaurátorů Uherské Hradiště 2010*, Technické muzeum v Brně, Brno 2010, str. 98-103, ISBN 978-80-86413-72-3

IV. Svobodová E., Bosáková Z., Ohlídalová M., Němec I., Novotná M.: A Critical Evaluation of the Potentialities of Infrared and Raman Microspectroscopy for Identification of Some Red Organic Dyes in Model Colour Layers of Works of Art; DYPI-S-11-00539, zasláno 2011 do časopisu *Dyes and Pigments*

V. Svobodová E., Ohlídalová M., Novotná M.: Možnosti identifikace červených organických barviv; In: *Muzea, památky a konzervace 2009*, Technické muzeum v Brně, Brno 2009, str. 45-47, ISBN 978-80-86413-68-6

4.1 SEPARAČNÍ METODY

4.1.1 CZE a MEKC (publikace I-III)

Pro identifikaci organických barviv kapilární zónovou elektroforézou a micelární elektrokinetickou chromatografií byly nejprve optimalizovány podmínky separace pro analýzu směsi hydroxyderivátů anthrachinonu: 1-hydroxy-9,10-anthrachinon (1-HA), 2-hydroxy-9,10-anthrachinon (2-HA), 1,2-dihydroxy-9,10-anthrachinon (alizarin, 1,2-DHA), 1,4-dihydroxy-9,10-anthrachinon (quinizarin, 1,4-DHA), 1,2,4-trihydroxy-9,10-anthrachinon (purpurin, 1,2,4-THA), 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthrachinon (tetra-HA) a 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-anthrachinon (penta-HA). Separace nabitých analytů je popsána elektroforetickou mobilitou, která je však závislá stejně jako elektroosmotický tok na experimentálních podmínkách (teplota, viskozita, iontová síla, tedy složení elektrolytu, pH separačního pufru a vložené napětí), a proto bývá v praxi měřena tzv. efektivní elektroforetická pohyblivost (mobilita) μ_{eff} :

$$\mu_{eff,i} = \left(\frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \cdot \frac{L_D \cdot L_C}{U},$$

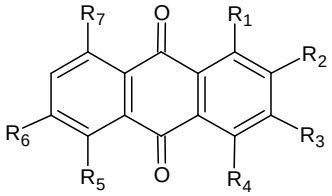
kde μ_{eff} je efektivní elektroforetická pohyblivost (rozměr $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$), t_{eof} a $t_{\mathrm{mig,i}}$ jsou migrační časy neutrálního značkovače elektroosmotického toku a i-té nabité látky (rozměr min), L_C je celková délka kapiláry, L_D je délka kapiláry od vstupního konce k detektoru (rozměr m) a U je napětí vložené mezi elektrody (rozměr V).

4.1.1.1 Deriváty anthrachinonu (publikace I)

Pro studované hydroxyderiváty anthrachinonu byly nejprve pomocí výpočetního programu Pallas vypočteny hodnoty pK_a a log P, jež jsou spolu s chemickými strukturami uvedeny v tabulce 1. Z ní je patrné, že analyty disociují v neutrálním či alkalickém prostředí. Z tohoto důvodu byl jako elektrolyt vybrán 0,01 $mol \cdot dm^{-3}$ fosfátový a 0,01 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborátový pufr o pH 6,5 – 10,8. 1-HA a quinizarin, které mají hydroxylové skupiny v blízkosti chinoidních kyslíků, což umožňuje tvorbu silné intramolekulární vodíkové vazby, migrují ve shodě

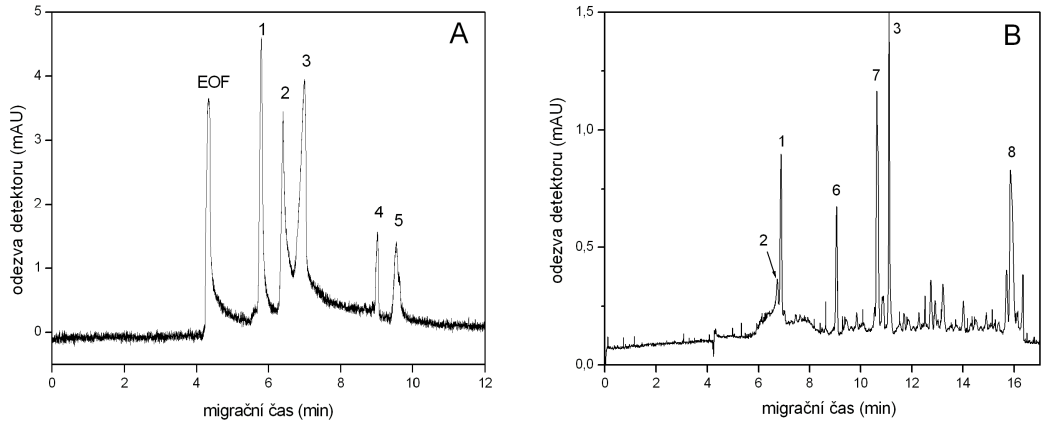
s vypočítanými disociačními konstantami s elektroosmotickým tokem při pH nižším než 8,5. V alkalickém prostředí získávají záporný náboj, a tak i vlastní elektroforetickou mobilitu. Ostatní deriváty jsou i v neutrálním pH částečně nabity a jejich elektroforetická mobilita vzrůstá s rostoucí alkalitou elektrolytu až do jejich celkové disociace.

Tabulka 1 Chemická struktura hydroxyderivátů anthrachinonu a jejich hodnoty pK_a a log *P* vypočtené softwarem Pallas 3.0.



analyt	R_1	p$K_{a,1}$	R_2	p$K_{a,2}$	R_3	p$K_{a,3}$	R_4	p$K_{a,4}$	R_5	p$K_{a,5}$	R_6	p$K_{a,6}$	R_7	p$K_{a,7}$	log *P*
1-HA	OH	9,5	-		-		-		-		-		-		2,6
2-HA	-		OH	7,3	-		-		-		-		-		2,8
alizarin	OH	11,9	OH	7,2	-		-		-		-		-		2,2
quinizarin	OH	9,1	-		-		OH	11,3	-		-		-		2,2
purpurin	OH	10,5	OH	7,0	-		OH	13,4	-		-		-		1,7
tetra-HA	OH	11,3	-		OH	5,4	$COCH_3$	-	-		OH	7,0	OH	9,2	1,1
penta-HA	OH	11,2	-		OH	5,3	$COCH_3$	-	OH	14,2	OH	6,9	OH	9,1	0,5

Na obr. 19 jsou uvedeny dva elektroferogramy směsi hydroxyderivátů anthrachinonu v neutrálním (pH 7,6) a alkalickém prostředí (pH 10,1). Hydroxyderiváty anthrachinonu obsahující hydroxylovou skupinu v pozici R_2 (2-HA, alizarin a purpurin) vykazují vzájemně si podobné elektroforetické chování, a proto tyto deriváty zejména v rozmezí hodnot pH 7 – 9 často komigrují (viz obr. 19A). Při hodnotě pH > 10 dochází k disociaci i hydroxylové skupiny purpurinu v pozici R_1, purpurin získává větší náboj a migruje rychleji než alizarin a 2-HA, které stále komigrují (viz obr. 19B). Jak je vidět z obr. 19B, byla většina analytů separována s dostatečným rozlišením, avšak s poměrně vysokou hodnotou šumu základní linie a s nízkou citlivostí detekce.



Obr. 19 CZE záznam měření směsi hydroxyderivátů anthrachinonu: (**1**) 2-HA, (**2**) alizarin, (**3**) purpurin, (**4**) tetra-HA, (**5**) penta-HA, (**6**) quinizarin, (**7**) 1-HA, (**8**) 1,8-DHA a (**EOF**) elektroosmotický tok. BGE: (**A)** 0,01 mol·dm^{-3} fosfátový pufr (pH 7,6) [82], napětí 15 kV; (**B**) 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný (pH 10,1), napětí 20 kV.

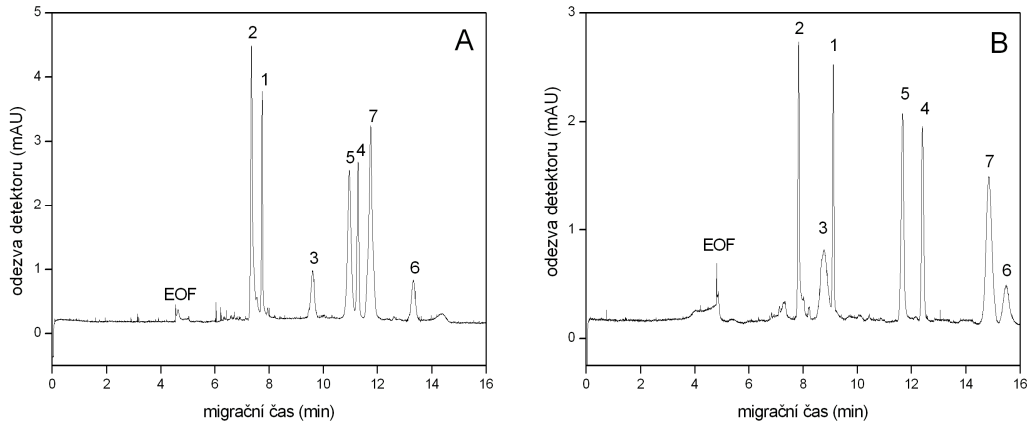
Pro zlepšení rozpustnosti analytů byl studován i micelární systém, tedy micelární elektrokinetická chromatografie. Vzhledem ke struktuře studovaných analytů byl vybrán dodecylsulfát sodný (SDS) jako vhodný anionogenní tenzid o koncentraci 0,01 – 0,02 mol·dm^{-3}, která ve vodném roztoku tetraboritanu sodného či fosforečnanu a hydrogenfosforečnanu sodného přesahuje kritickou micelární koncentraci 8 mmol·dm^{-3} [53,55]. Kromě vlivu koncentrace SDS na separační chování hydroxyderivátů anthrachinonu byl také studován vliv samotné disociace analytů v rozsahu hodnot pH 6,5 – 10,8 (obdobně jako u CZE). Rozdělování mezi vodnou a micelární fázi závisí na hydrofobicitě nedisociovaných a disociovaných analytů (viz tabulka 1). Získané výsledky jsou sumarizovány v tabulce 2, která uvádí souhrn průměrných efektivních elektroforetických pohyblivostí hydroxylovaných derivátů anthrachinonu v separačních systémech o různé hodnotě pH a koncentraci SDS. S rostoucí alkalitou elektrolytu je disociace protonů snazší, čímž jejich hydrofobicita klesá, a separace studovaných analytů se více podobá separaci v CZE. Vliv micelárního systému se tak nejvíce projevuje při nižších hodnotách pH, zvláště pak u 1-HA a quinizarinu, které vykazují vysokou elektroforetickou pohyblivost, ačkoliv nejsou disociovány.

Acetylované hydroxyderiváty anthrachinonu - tetra-HA a penta-HA (produkty houby *Geosmithia lavendula*) a purpurin vykazují zvýšení efektivní elektroforetické pohyblivosti s rostoucí koncentrací SDS při pH 6,5 a nejvyšší pohyblivosti dosahují při pH 8,5. Oproti tomu pohyblivost 2-HA s rostoucí hodnotou pH klesá pro všechny koncentrace SDS.

Tabulka 2 Průměrné efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{eff} hydroxyderivátů anthrachinonu v MEKC při různých pH a koncentracích SDS. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraborátový pufr (pH 8,5 – 10,8) a 0,01 mol·dm^{-3} fosfátový pufr (pH 6,5 – 7,5).

pufr	pH	μ_{eff} (10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1})						
		1-HA	2-HA	alizarin	quinizarin	purpurin	tetra-HA	penta-HA
10 mM SDS	6,5	-39,59	-35,03	-34,81	-40,79	-30,53	-31,01	-31,43
	7,5	-38,63	-33,35	-30,71	-41,33	-27,80	-33,81	-35,26
	8,5	-40,18	-28,99	-23,13	-42,57	-28,90	-37,00	-38,23
	9,5	-36,35	-25,58	-23,24	-34,91	-30,17	-33,54	-34,22
	10,8	-28,85	-24,28	-24,15	-28,15	-33,94	-34,57	-34,62
15 mM SDS	6,5	-42,14	-40,60	-41,23	-43,86	-35,07	-37,28	-34,35
	7,5	-42,13	-39,15	-35,79	-44,16	-31,63	-30,50	-34,86
	8,5	-40,63	-29,11	-22,77	-42,94	-26,97	-38,41	-37,92
	9,5	-37,48	-25,47	-23,32	-35,32	-30,10	-34,95	-34,05
	10,8	-29,22	-24,17	-25,28	-28,33	-35,31	-35,08	-34,48
20 mM SDS	6,5	-43,34	-42,15	-42,25	-45,30	-37,89	-39,43	-38,60
	7,5	-43,33	-41,60	-39,73	-44,88	-29,77	-34,49	-35,43
	8,5	-43,21	-29,31	-23,17	-44,21	-29,10	-39,57	-38,91
	9,5	-39,06	-25,89	-23,39	-37,79	-32,21	-33,30	-33,95
	10,8	-29,70	-25,07	-25,10	-28,53	-35,43	-34,95	-34,84

Pro separaci směsi tvořené všemi sedmi hydroxyderiváty anthrachinonu byla vybrána koncentrace SDS 0,015 mol·dm^{-3} v 0,01 mol·dm^{-3} tetraborátovém pufru o hodnotách pH 8,5 a 9,5. Při vyšší hodnotě pH 9,5 (viz obr. 20A) došlo k separaci všech analytů do 14-ti minut, ale k částečné komigraci dvojice alizarinu a 2-HA a dvojice tetra-HA a penta-HA, které nejsou rozděleny až na základní linii. Při hodnotě pH 8,5 (viz obr. 20B) bylo docíleno lepšího rozlišení mezi tetra-HA a penta-HA a to až na základní linii, došlo také ke zlepšení rozlišení mezi alizarinem a 2-HA, ale naopak ke komigraci 2-HA a purpurinu a prodloužení analýzy k 16-té minutě. Jelikož se, oproti dvojici tetra-HA a penta-HA, 2-HA a alizarin, resp. purpurin, nevyskytují v barvivech společně, byl jako optimalizovaný separační systém zvolen 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný o pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS při dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV a detekci při 254 nm.



Obr. 20 MEKC záznam měření směsi hydroxyderivátů anthrachinonu: (**1**) 2-HA, (**2**) alizarin, (**3**) purpurin, (**4**) tetra-HA, (**5**) penta-HA, (**6**) quinizarin, (**7**) 1-HA a (**EOF**) elektroosmotický tok. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 9,5 (**A**) či pH 8,5 (**B**) s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 250 nm.

Validace metody MEKC byla provedena za optimalizovaných podmínek měření. Byl určen lineární dynamický rozsah, který byl pro quinizarin a purpurin $1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ mol·dm^{-3} a $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ mol·dm^{-3} pro ostatní deriváty. Koncentrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese jak pro závislost plochy, tak i výšky píků na koncentraci analytu. Dále byla určena opakovatelnost efektivních elektroforetických pohyblivostí všech analytů během šesti měření v rámci jednoho a šesti po sobě následujících dní a meze detekce a stanovitelnosti. Jak jednodenní, tak i šestidenní opakovatelnost vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou se pohybovala v rozmezí 1,1 – 4,5 %. Nejvyšší relativní směrodatnou odchylku pro měření v šesti po sobě následujících dnech měla pohyblivost 2-HA (4,5 %). Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ), vypočtené z regresních rovnic pro závislost výšky píku na koncentraci, jsou uvedeny v tabulce 3. Meze stanovení jednotlivých analytů (řádově 10^{-6} – 10^{-7} mol·dm^{-3}) jsou dostatečně nízké pro stanovení malých množství organických barviv v barvených vláknech po extrakci, která velmi často vykazuje nízkou výtěžnost.

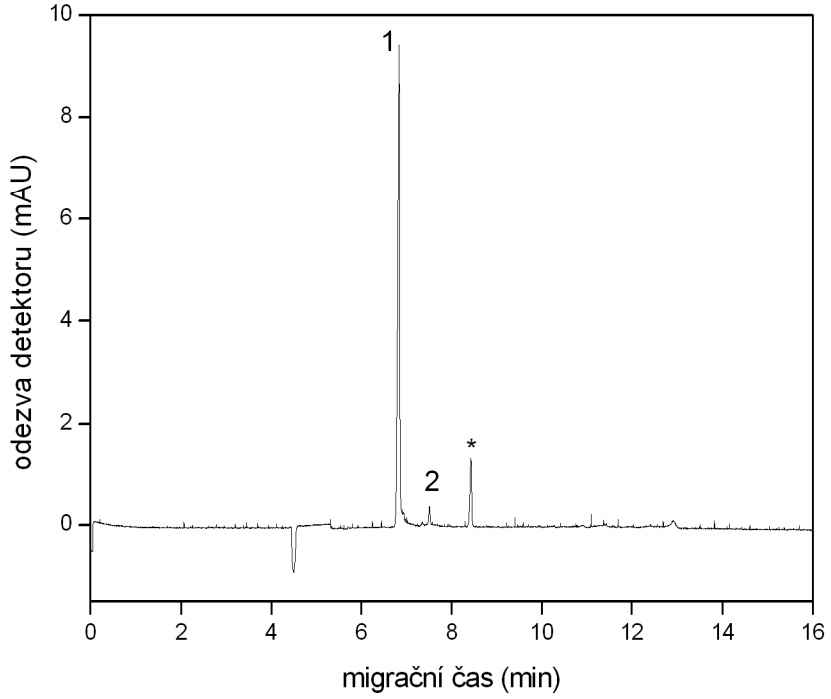
Tabulka 3 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) hydroxyderivátů anthrachinonu určené z regresních rovnic zpracovaných pro závislost výšky píku na koncentraci analytu. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraborátový pufr, pH 8,5 s přídavkem 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm.

analyt	LOD (mol·dm^{-3})	LOQ (mol·dm^{-3})
1-HA	$5{,}00 \cdot 10^{-7}$	$1{,}66 \cdot 10^{-6}$
2-HA	$2{,}20 \cdot 10^{-7}$	$7{,}41 \cdot 10^{-7}$
alizarin	$4{,}00 \cdot 10^{-7}$	$1{,}33 \cdot 10^{-6}$
quinizarin	$1{,}28 \cdot 10^{-6}$	$4{,}25 \cdot 10^{-6}$
purpurin	$1{,}16 \cdot 10^{-6}$	$3{,}86 \cdot 10^{-6}$
tetra-HA	$4{,}21 \cdot 10^{-7}$	$1{,}40 \cdot 10^{-6}$
penta-HA	$2{,}10 \cdot 10^{-7}$	$6{,}99 \cdot 10^{-7}$

4.1.1.2 Reálné vzorky (publikace I)

Optimalizovaná metoda MEKC byla aplikována na analýzu reálných vzorků. Za optimalizovaných podmínek měření (0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný o pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS při dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV a detekci při 254 nm) byly proměřeny methanolické extrakty *Rubia tinctorum* (zdroj alizarinu a purpurinu), *Rubia cordifolia* (zdroj 2-HA a quinizarinu) a mycelia houby *Geosmithia lavendula* (zdroj tetra-HA a penta-HA). Na obr. 21 je uveden záznam analýzy extraktu mořeny barvířské (*Rubia tinctorum*), jehož majoritní složkou je alizarin, vykazující v elektroferogramu nejintenzivnější pík, a dále purpurin, který je zde minoritní složkou. Záznam obsahuje ještě jeden pík, který by mohl příslušet xanthopurpurinu, běžně se vyskytujícímu společně s alizarinem a purpurinem v bylinách rodu *Rubicae* [35]. Z důvodu nedostupnosti standardu však nemohla být jeho přítomnost v reálném vzorku potvrzena.

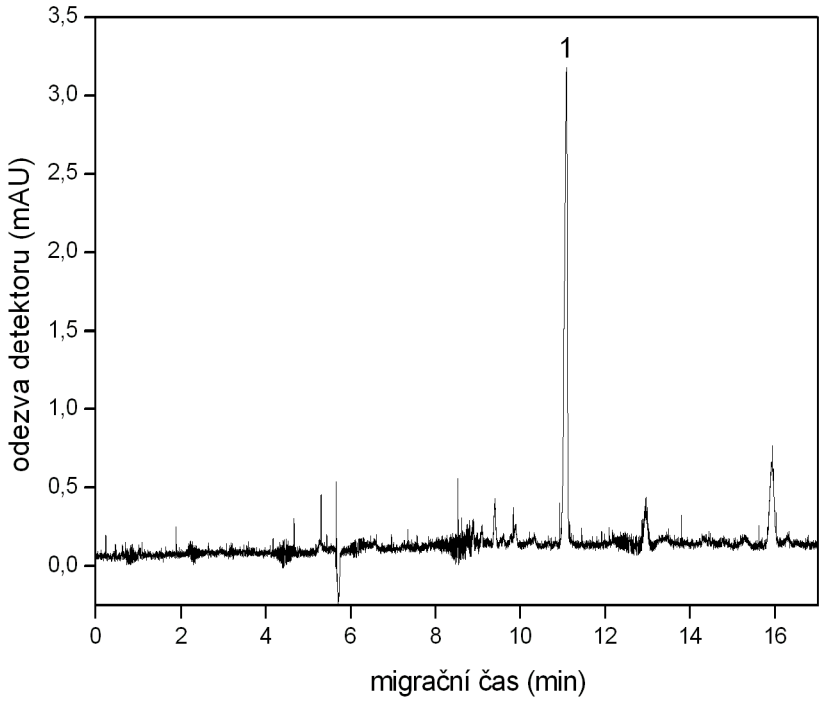
Kvantifikace alizarinu a purpurinu vycházela z lineární závislosti plochy píku na koncentraci analytu. Obsah alizarinu a purpurinu byl stanoven čtyřmi nezávislými analýzami methanolického extraktu *Rubia tinctorum*. Průměrná koncentrace alizarinu v extraktu byla 399 µmol·dm^{-3} (RSD = 4,0 %), purpurin byl zastoupen o nižší koncetraci 3,8 µmol·dm^{-3} (RSD = 1,5 %).



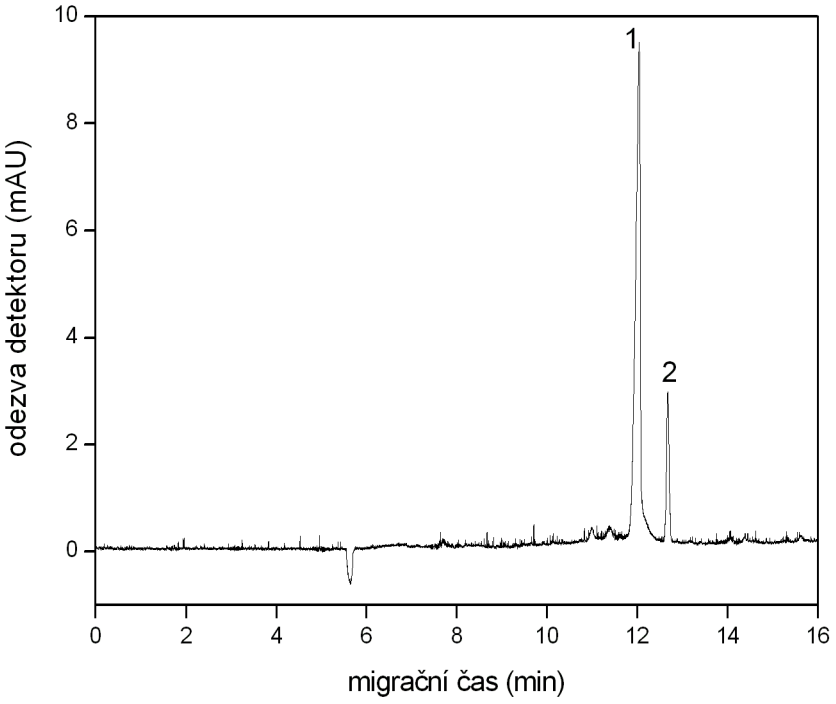
Obr. 21 MEKC elektroferogram methanolického extraktu *Rubia tinctorum* – (**1**) alizarin, (**2**) purpurin, (*****) pravděpodobně xanthopurpurin. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm.

Elektroferogram methanolického extraktu *Rubia cordifolia* (viz obr. 22) obsahuje několik píků, z nichž identifikován byl pouze majoritní pík náležící 2-HA. Další barvicí složka, tedy quinizarin, nebyla v extraktu nalezena. V methanolickém extraktu mycelia houby *Geosmithia lavendula* (viz obr. 23) byly identifikovány obě barvicí látky tetra-HA a penta-HA s rozlišením na základní linii do třinácti minut. Extrakt mycelia obsahoval 31,5 µmol·dm^{-3} analytu penta-HA (RSD = 4,2 %) a 5,0 µmol·dm^{-3} analytu tetra-HA (RSD = 4,0 %).

Výtěžnosti extrakce analytů (vypočteny z plochy píků) získaných z reálných vzorků byly stanoveny pro dvě koncetrační hladiny, a to 1,0·10^{-5} mol·dm^{-3} pro tetra-HA a purpurin, a 1,0·10^{-4} mol·dm^{-3} pro majoritní analyty alizarin a penta-HA. Získaná výtěžnost alizarinu byla 97,8 % (RSD = 2,4 %), 91,6 % (RSD = 6,0 %) pro purpurin, 86,4 % (RSD = 4,4 %) pro penta-HA a pro tetra-HA byla výtěžnost 85,7 % (RSD = 5,3 %). Nižší výtěžnost extrakce penta-HA a tetra-HA z mycelia houby *Geosmithia lavendula* mohla být způsobena vyšší soudržností organické matrice.



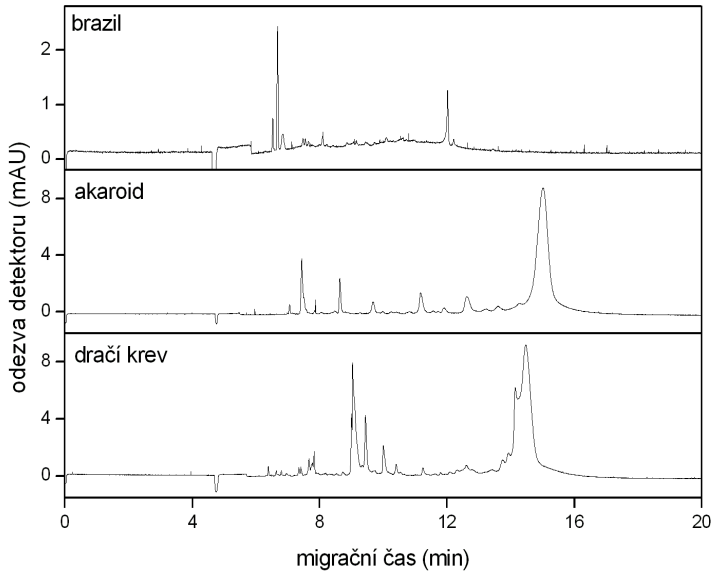
Obr. 22 MEKC analýza methanolického extraktu z *Rubia Cordifolia* – (**1**) 2-HA. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 3 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm.



Obr. 23 MEKC analýza methanolického extraktu z mycelia *Geosmithia lavendula* – (**1**) penta-HA, (**2**) tetra-HA. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm.

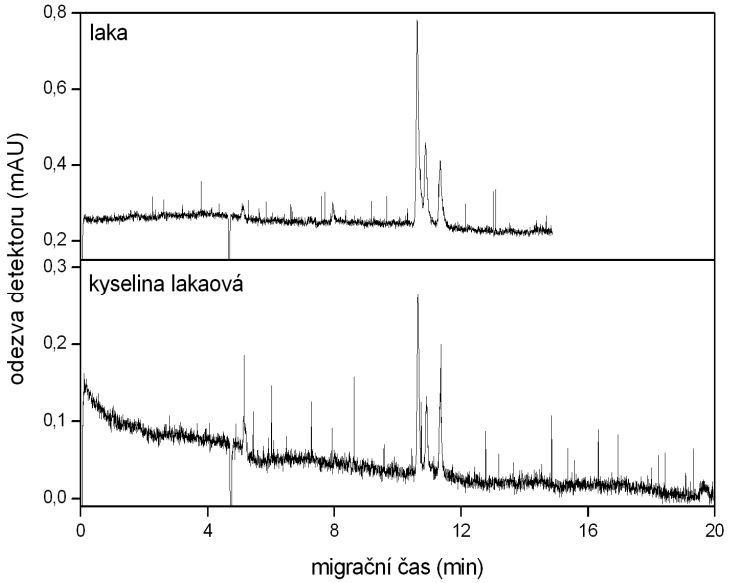
4.1.1.3 Barviva (publikace II-III)

Za optimalizovaných podmínek, tedy 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný o pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS při dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV a detekci při 254 nm, bylo proměřeno elektroforetické chování samotných barviv a jejich hlavních barvicích složek. Hlavní barvicí složky jsou majoritními složkami barviv, měly by se tedy v elektroferogramech barviv zobrazit majoritním píkem, což potvrzuje identifikace majoritních píků jednotlivých barviv. V případě dračí krve, akaroidu a brazilu nebyly jejich hlavní barvicí složky komerčně dostupné, proto je nebylo možno v elektroferogramech identifikovat (viz obr. 24).



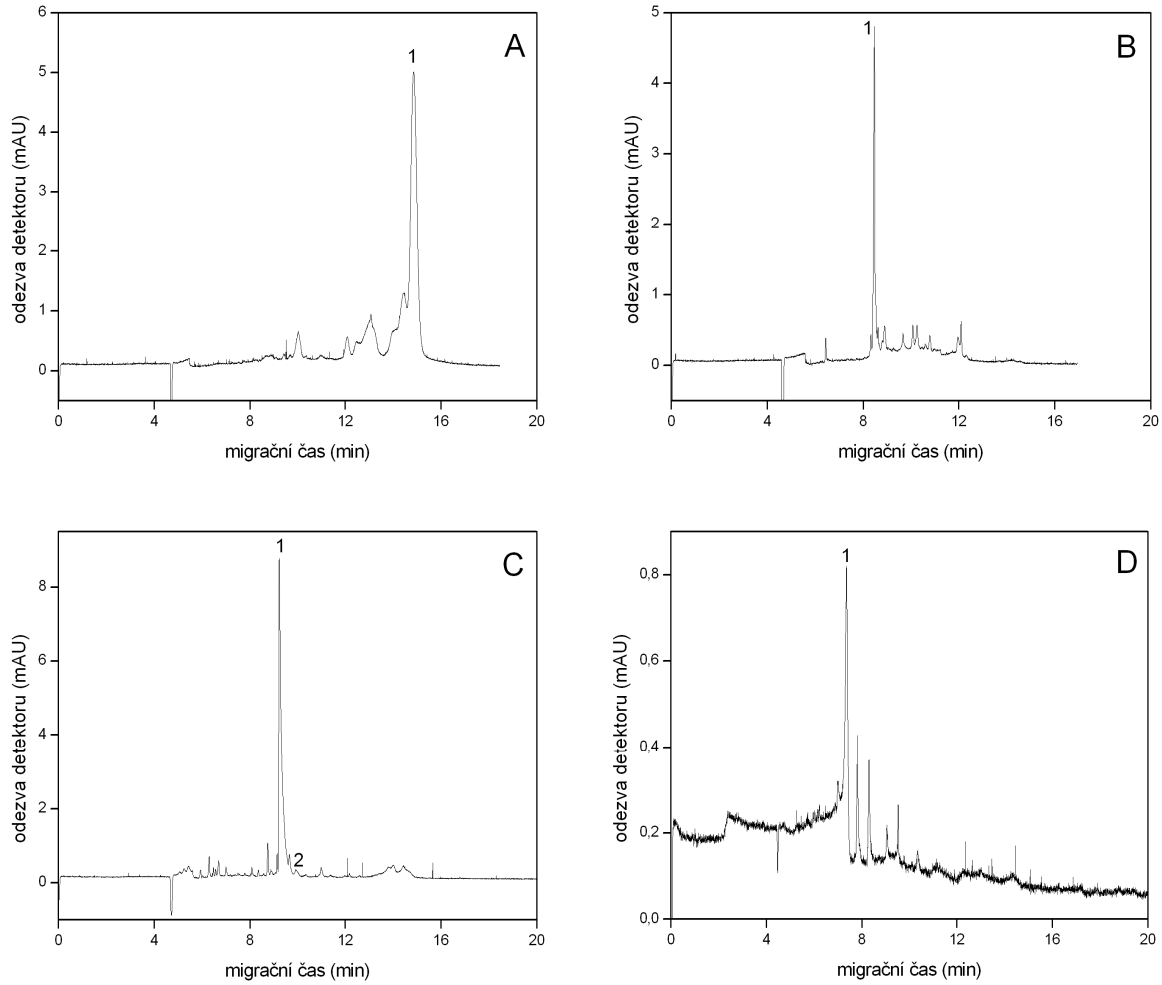
Obr. 24 MEKC záznamy měření barviv brazil, akaroid a dračí krev. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar (v případě dračí krve 30 mbar) po 5 s, napětí 20 kV a detekce při 254 nm.

Elektroferogram barviva laka (viz obr. 25) obsahuje tři píky, které odpovídají záznamu měření samotné komerčně získané lakaové kyseliny. Barvivo laka tedy v našem případě tvoří směs tří forem lakaové kyseliny, přičemž majoritním prvním píkem bude zřejmě forma A, která je nejčastější. Potvrzení přítomných forem lakaové kyseliny by vyžádalo kombinaci hmotnostní detekce a záznamu měření nukleární magnetické rezonance, která nebyla provedena.



Obr. 25 MEKC záznamy měření barviva laka a její hlavní barvicí složky lakaové kyseliny, kterou tvoří směs až pěti forem A-E (zde patrny tři formy). BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV a detekce při 254 nm.

Na obr. 26 jsou zobrazeny jednotlivé elektroferogramy methanolických roztoků barviv, kterými jsou kamala, kampeška, košenila (drcené zadečky oplodněných samiček červce nopálového) a kraplak. Ve všech uvedených barvivech se podařilo identifikovat jejich hlavní barvicí složky. Rottlerin (hlavní barvicí složka kamaly) má nepolární charakter, který mu umožňuje snazší inkorporaci do micel, a proto migruje až při 15-té minutě (viz obr. 26A). Oproti němu hematein (hlavní barvicí složka kampešky), karmínová kyselina či karmín (hlavní barvicí složky košenily) a alizarin (hlavní barvicí složka kraplaku) se pohybují rychleji díky vlastní disociaci hydroxylových skupin. Ze záznamů měření je patrná složitost matrice barviv, ve kterých jsou přesto jejich majoritní složky identifikovány jako jejich hlavní barvicí látky. Metoda MEKC je tak vhodnou technikou pro identifikaci i složitých směsí s barvivy po extrakci ve vhodném rozpouštědle.



Obr. 26 MEKC záznamy měření barviv a identifikace jejich hlavních barvicích složek: (**A**) barvivo kamala – pík 1 rottlerin, (**B**) barvivo kampeška – pík 1 hematein, (**C**) barvivo košenila – pík 1 karmínová kyselina, pík 2 karmín a (**D**) barvivo kraplak – pík 1 alizarin. BGE: 0,01 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm^{-3} SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV a detekce při 254 nm.

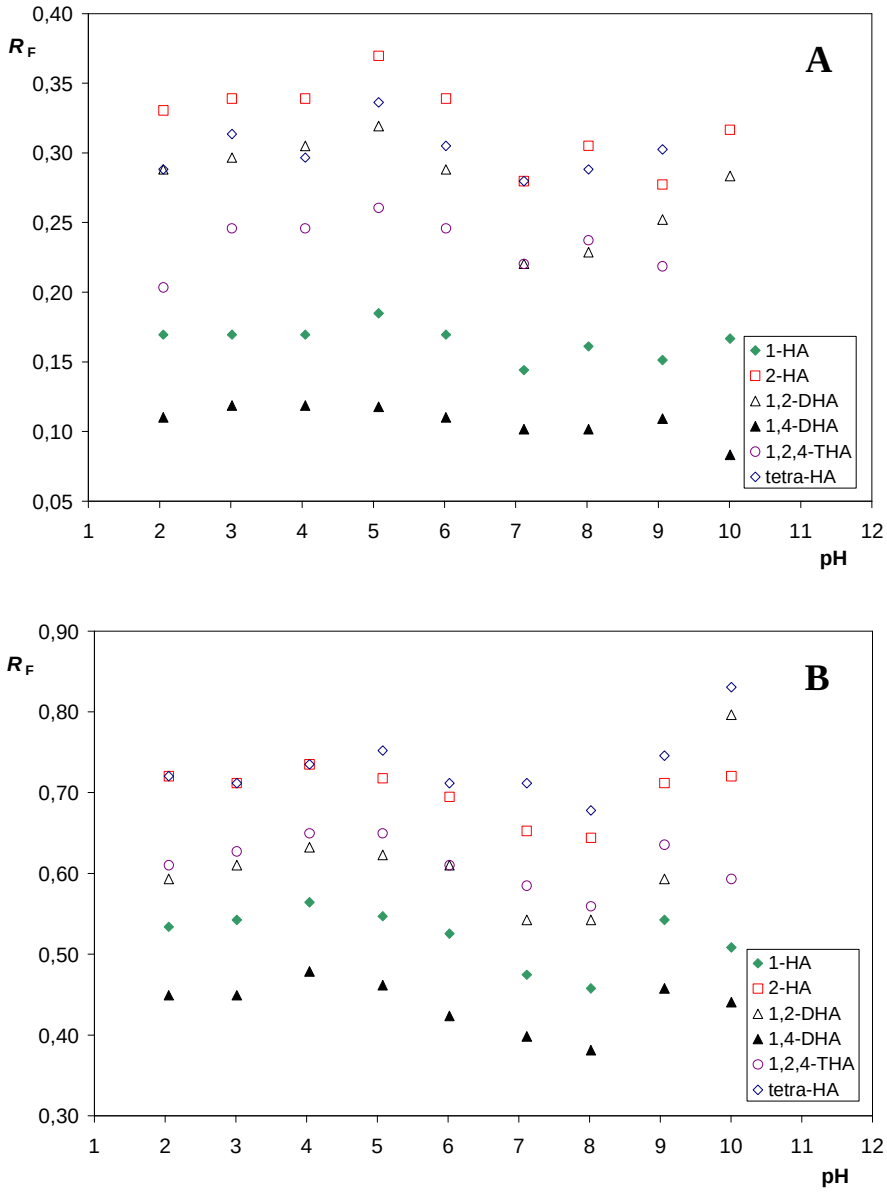
4.1.2 TLC (publikace III)

Pro separaci studovaných organických barviv byl hledán vhodný „univerzální“ eluční systém s využitím silikagelových stacionárních fází. Obdobně jako u kapilární elektoforézy byla technika optimalizována pro tytéž hydroxylované deriváty anthrachinonu (viz tabulka 1).

4.1.2.1 Deriváty anthrachinonu

K separaci nepolárních či slabě polárních hydroxyderivátů anthrachinonu byl nejprve využit normální mód. Stacionární fázi tvořil silikagel a jako vyvíjecí fáze byla zvolena různá kombinace hexanu, octanu ethylnatého, ethanolu, dichlormethanu a trichlormethanu. Zvolené vyvíjecí soustavy však nebyly vhodné

pro studované analyty, které se v řadě případů nepodařilo detekovat, či docházelo k rozmývání skvrn. Normální mód byl tedy nahrazen reverzním módem, kdy stacionární fázi tvořil silikagel s navázaným oktadecylem a vyvíjecí fází byla směs methanolu (MeOH) a vodného roztoku pufru o různé hodnotě pH s obsahem triethylaminu (TEA), který blokuje volné silanolové skupiny, a tím omezuje nechtěné silanofilní interakce vedoucí k rozmývání jednotlivých skvrn analytů. V návaznosti na práci [83] byla jako vyvíjecí fáze zvolena směs 60/40 či 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 mol·dm^{-3} octanovém pufru, pH 2 – 6 a dále 60/40 či 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm^{-3} tetraborátovém pufru o pH 7 – 10. S rozdílnou hodnotou pH se měnila disociace jednotlivých molekul, a tím i jejich polarita a eluční chování. Na obr. 27 jsou vyneseny retardační faktory (R_F) hydroxyderivátů anthrachinonu v závislosti na zvoleném pH vyvíjecí fáze. Zóna příslušející penta-HA se díky vysoké polaritě a snadné disociaci analytu silně rozmývala již v kyselém prostředí, a proto nebylo možné určit retardační faktor. Methanolický roztok 1-HA je na světle nestabilní a během stání degraduje za vzniku dvou dalších derivátů. Tuto nestabilitu potvrzují tři skvrny příslušející dávkovanému roztoku 1-HA. Do závislosti R_F na hodnotě pH vyvíjecí fáze byly zaznamenány retardační faktory nejintenzivnější skvrny příslušející nedegradovanému 1-HA.



Obr. 27 Závislost retardačních faktorů R_F na pH vodné složky vyvíjecí směsi (**A**) 60/40 (v/v) MeOH/pufr a (**B**) 80/20 (v/v) MeOH/pufr. Pufračními roztoky byly 0,1 mol·dm^{-3} octan sodný s 1% TEA pro hodnoty pH 2 - 6 a 0,025 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný s 1% TEA pro hodnoty pH 7 – 10; detekce při 254 nm.

V kyselém prostředí pro hodnoty pH 2 – 4 docházelo ke koeluci tetra-HA s alizarinem, resp. s 2-HA. Ke koeluci dvojice alizarin – purpurin a dvojice tetra-HA – 2-HA docházelo i v neutrálním prostředí, zvláště pak při nižším obsahu methanolu ve vyvíjecí fázi. Alkalické pH 10 usnadňuje disociaci molekul studovaných derivátů, což vede nejen ke zvýšení R_F, ale také k silnějšímu rozmývání zón analytů, které znemožňuje určení R_F u tetra-HA a purpurinu ve vyvíjecí fázi obsahující 60 obj. % MeOH. Nižší obsah MeOH ve vyvíjecí fázi TLC separaci zpomaloval a vedl k nižším hodnotám retardačních faktorů, které

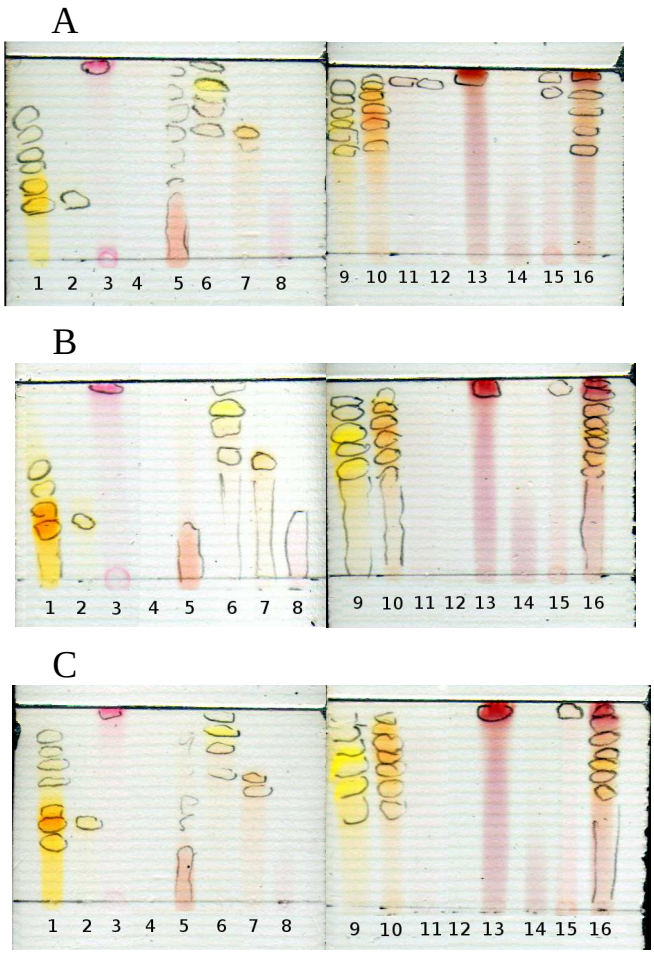
nepřekročily hodnotu 0,40. Oproti tomu ve vyvíjecí fázi tvořené z 80 obj. % MeOH mají analyty retardační faktory v rozmezí 0,40 – 0,90.

Z výše uvedených výsledků byl pro TLC separaci méně polárních anthrachinonových barviv vybrán eluční systém s reverzní fází tvořenou aluminiovou deskou s oktadecylem navázaným na silikagel a vyvíjecí fází 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 mol·dm^{-3} octanovém pufru, pH 5 a 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm^{-3} tetraborátovém pufru o pH 7 a 9.

4.1.2.2 Barviva

Pro separaci akaroidu, brazilu, dračí krve, kamaly, kampešky, košenily, kraplaku, laky a santalu a jejich hlavních barvicích složek byla tedy zvolena vyvíjecí fáze 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 mol·dm^{-3} octanovém pufru, pH 5 a dále 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm^{-3} tetraborátovém pufru, pH 7 a 9. Vyšší obsah methanolu umožnil separaci kamaly a rottlerinu, kdy naopak v nižším poměru methanolu (60 obj. %) zůstaly oba analyty na startu. Na obr. 28 jsou uvedeny naskenované záznamy tenkovrstvé chromatografie studovaných červených organických barviv separovaných na reverzní fázi s vyvíjecí fází obsahující 80 obj. % MeOH a o hodnotách pH 5, 7 a 9. Jednotlivé barevné skvrny jsou zvýrazněny v místech největší intenzity fluorescence po ozáření UV lampou při 254 nm. Přírodní organická barviva jsou směsi více látek, jak potvrzuje množství barevných skvrn (viz obr. 28). Záznamy eluce akaroidu (9) a dračí krve (10) jsou si vzájemně, až na intenzitu skvrn, velice podobné. Ve struktuře kamaly (1) lze snadno rozeznat skvrnu patřící rottlerinu (2) a stejně tak i v barvivu laka (11) lze nalézt sůl lakaové kyseliny (12), pouze však pro pH 5. Přestože lakaová kyselina se vyskytuje současně v pěti formách, na záznamu je pouze jediná skvrna majoritní formy A, viz obr. 28A (MEKC elektroferogram téhož roztoku laky a lakaové kyseliny obsahuje tři píky, viz obr. 25).

V tomto systému se však polárnější analyty stále rozmývaly a ani při vyšší hodnotě pH 7 a 9 se jejich eluce nezlepšila. Využití silikagelových stacionárních fází tedy nepřineslo oproti dříve používané mikrokrystalické celulóze [4] ani zjednodušení, ani výrazné zlepšení separace vybraných organických barviv.



Obr. 28 TLC separace barviv a jejich hlavních barvicích složek: kamala (**1**), rottlerin (**2**), karmín (**3**), karmínová kyselina (**4**), santal (**5**), kraplak (**6**), alizarin (**7**), purpurin (**8**), akaroid (**9**), dračí krev (**10**), laka (**11**), laková kyselina (**12**), kampeška (**13**), hematein (**14**), brazil (**15**) a směs (**16**): kampeška, laka, dračí krev, akaroid. Vyvíjecí fáze 80/20 (v/v) MeOH/0,1 mol·dm^{-3} acetátový pufr s 1% TEA, pH 5 (**A**), 80/20 (v/v) MeOH/0,025 mol·dm^{-3} tetraboritan sodný s 1% TEA, pH 7 (**B**) a pH 9 (**C**).

4.1.3 Dílčí závěr

Separační metody jsou univerzálními, vysoce účinnými metodami, kterými můžeme separovat jednotlivá barviva ve směsi a identifikovat je. Podle stanovených nečistot a příměsí lze rozlišit přírodní a synteticky vyrobená barviva. Tyto metody jsou však destruktivní, převážně nepřenosné a finančně nákladnější. TLC je vhodná k orientační identifikaci vybraných barviv a určení jejich čistoty. V elučním systému sestávajícího se z reverzního módu na destičkách RP-18W s vyvíjecí fází 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 mol·dm^{-3} octanovém pufru o pH 5 se však skvrny barviv santal, kampeška, akaroid, dračí krev a brazil rozmývají. Hlavní barvicí složky karmínová kyselina, hematein a purpurin, se za stejných elučních podmínek nepodařilo detekovat.

Metoda MEKC je vhodná k přesné identifikaci všech studovaných barviv již o koncentracích řádově 0,1 $mg \cdot mL^{-1}$. Díky své vysoké separační účinnosti lze za optimalizovaných podmínek (0,01 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborátový pufr o pH 8,5 s 0,015 $mol \cdot dm^{-3}$ SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm) nejen identifikovat vybraná barviva, ale i vzájemně rozlišit barviva akaroid a dračí krev. Optimalizovaná metodika byla ověřena při identifikaci alizarinu, purpurinu, 2-HA, tetra-HA a penta-HA v reálných vzorcích bylin *Rubia tinctorum*, *Rubia cordifolia* a mycelia houby *Geosmithia lavendula*. Díky přesnému určení příměsí lze tuto metodu využít i k potvrzení datace, lokace a pravosti uměleckých děl.

4.2 SPEKTROMETRICKÉ METODY

Identifikace přírodních organických barviv v barevných vrstvách uměleckých děl či v barvených vláknech mikroskopickými technikami infračervené a Ramanovy spektroskopie je založena na určení specifických vibračních pásů, které příslušejí vibracím hlavní barvicí složky jednotlivého barviva.

4.2.1 IR spektroskopie barviv (publikace III-V)

Hlavní barvicí složky studovaných organických barviv jsou převážně anthrachinonové povahy obsahující aromatická jádra, hydroxylové a alkylové skupiny (viz kapitola 2.2 Barviva jako chemické látky). Tyto majoritní složky ovlivňují průběh infračervených spekter barviv, která jsou si podobná, a jejichž významných vibračních pásů lze využít k identifikaci samotného barviva.

Hlavní barvicí složkou barviva laky je směsná lakaová kyselina s majoritní formou A. V infračerveném spektru lakaové kyseliny (Natural Red 25) [77] se projevují nejvíce deformační vibrace CH_2 a CH_3 skupin v oblasti 1450 – 1230 cm^{-1}, vibrace skupin C=O ve skupině COO^- a v konjugaci s vazbami C=C aromatického jádra v oblasti 1720 – 1570 cm^{-1} a vibrace OH skupiny včetně vazby C-O ve skupině OH v oblasti kolem 3300 cm^{-1} a 1100 – 1050 cm^{-1}. Barvivo košenila obsahuje hlavní barvicí složku karmínovou kyselinu (případně karmín). Karmínová kyselina oproti karmínu obsahuje i glykosidickou skupinu, která

zvyšuje intenzitu vibračních pásů v oblasti 1100 – 1000 cm^{-1} příslušející vibracím OH skupin [77,84]. Další intenzivní pásy lze nalézt v oblastech 1620 – 1550 cm^{-1} a 1450 – 1250 cm^{-1}. Barvivo kraplak obsahuje dvě chemicky podobné hlavní barvicí složky alizarin a purpurin. Infračervené spektrum majoritního alizarinu obsahuje velmi ostré pásy odpovídající vibracím skupin C-H, C=O, C=C a C-O, přičemž nejvýraznější jsou pásy C-H a C=C (1463, 1350, 1331, 1303, 1200 a 712 cm^{-1}). Hlavní barvicí složkou barviva kampeška je hematein. Vibrační pásy hemateinu 1607, 1537, 1514, 1441, 1418, 1377, 1298, 1225, 1207, 1171 a 1066 cm^{-1} [77] jsou velmi intenzivní a příslušejí převážně vibracím C=C, C=O (ve skupině COO^-) a C-H vazeb. Barvivo kamala je tvořeno hlavní barvicí složkou rottlerinem. V infračerveném spektru rottlerinu lze očekávat řadu intenzivních pásů v oblasti kolem 3300 cm^{-1} a 1700 – 1000 cm^{-1} [77] spojených s vibracemi skupin OH, C=C, C-H a C=O [84]. Pro další barviva akaroid, brazil, dračí krev a santal nejsou jejich hlavní barvicí složky komerčně dostupné. Přesto lze díky známé struktuře hlavních barvicí složek brazilinu [66], dracorubinu, dracorhodinu a santalinu A a B předpokládat podobné vibrační chování jako u ostatních výše uvedených organických barviv.

Sourhnný přehled nalezených vibračních pásů všech studovaných barviv a jejich komerčně dostupných hlavních barvicích složek je uveden v tabulce 4, která uvádí nejen vlnočty jednotlivých vibračních pásů, ale i jejich intenzity. Tabulka 4 dále obsahuje orientační přiřazení získaných vibračních pásů vibracím jednotlivých strukturních skupin obsažených v chemické struktuře hlavních barvicích látek. Tučně vyznačené vlnočty daného barviva představují významné pásy, jejichž kombinaci lze využít k identifikaci studovaných organických barviv v reálných vzorcích.

Barvivo košenila bylo dostupné pouze ve formě sušených zadečků oplodněných samic *Coccus cacti*, proto její infračervené spektrum obsahuje velmi intenzivní pásy organické matrice skeletu hmyzu při vlnočtech 1627, 1566, 1462, 1414, 1078, 1051 a 1024 cm^{-1}, které překrývají vibrační pásy karmínové kyseliny. K identifikaci košenily tak lze využít pouze intenzivní nepřekryté vibrační pásy samotné karmínové kyseliny. Vibrační pásy barviv kraplaku a santalu jsou v oblasti 1150 - 1000 cm^{-1} překryty intenzivními pásy iontů SO_4^{2-} anorganického substrátu, na kterém jsou tato barviva vysrážena.

Tabulka 4 Orientační přiřazení vibrací [84] studovaných barviv a jejich hlavních barvicích složek (komerčně dostupných) v infračervené spekroskopii. Intenzity pásů: vw = velmi slabá, w = slabá, m = střední, s = silná, vs = velmi silná

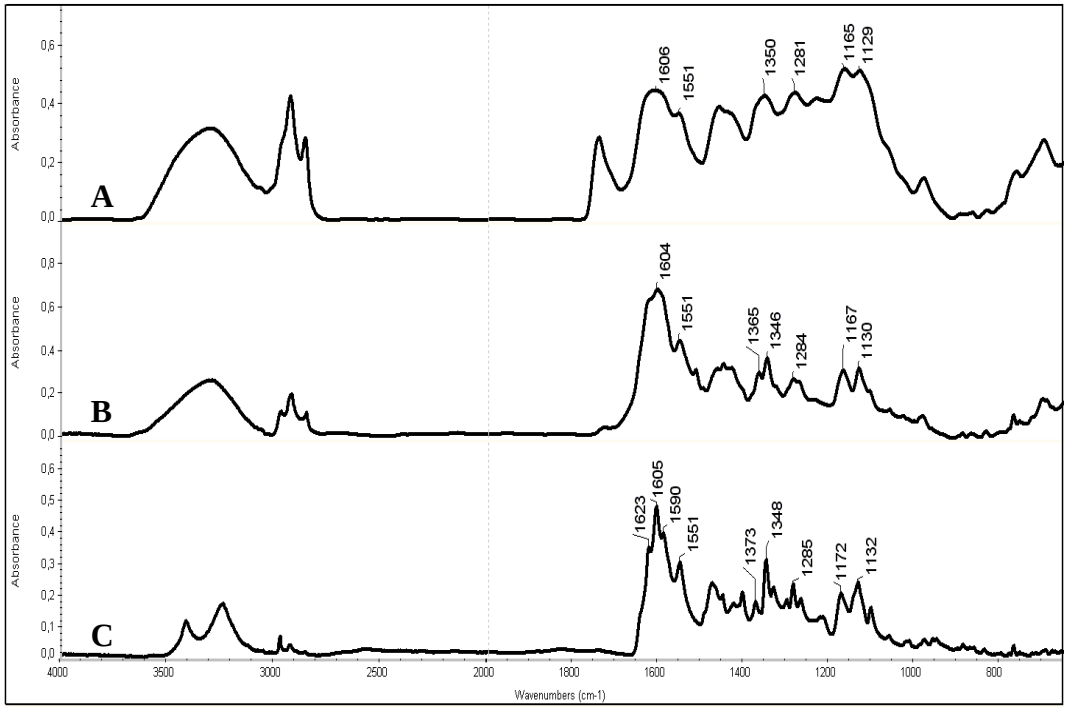
kamala cm^{-1}	rottlerin cm^{-1}	Orientační přiřazení	**brazil** cm^{-1}	**kampeška** cm^{-1}	hematein cm^{-1}	**dračí krev** cm^{-1}	**akaroid** cm^{-1}	**santal** cm^{-1}	**košenila** cm^{-1}	karmínová kyselina cm^{-1}	**kraplak** cm^{-1}	alizarin cm^{-1}	purpurin cm^{-1}	**laka** cm^{-1}	lakaová kyselina cm^{-1}
-	3416 w	ν(OH)/ν(C=O) v intramolekulární H-vazbě	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3295 w,br	3243 w,br	ν(OH)	3355 vs,br	3388 vs,br	3329 s,br	3349 s,br	3386 w,br	3401 m,br	3299 m,br	3442 w,br	3335 s,br	3380 vw,br	3386 vw,br	3404 m,br	3366 w,br
2965 vw	2974 vw	$\nu_a(CH_3)$	-	2970 w	-	3025 w	3000 vw	-	-	-	-	-	3071 vw	-	2952 vw
2922 w	2933 vw	$\nu_a(CH_2)$	2928 m	2937 w	-	2936 w	2938 w	2925 vw	2918 vs	2927 vw	2928 vw	-	2923 vw	2921 w	2926 w
2851 vw	2854 vw	$\nu_a(CH_3+CH_2)$	2848 sh	2848 sh	-	2831 vw	2839 vw	2848 sh	2850 s	-	-	-	-	2851 sh	2854 vw
1724 vw	-		-	-	-	-	-	**1737 vw**	1730 w	1720 w	-	-	-	**1715 w**	1718 m
-	-		-	-	1697 vw	-	-	-	1703 w	-	-	-	-	-	-
-	-		-	-	-	1649 w	-	-	-	1673 vw	**1669 w**	1665 w	1669 w	-	-
-	1623 s	ν(C=O) v konjugaci s C=C a v intramolekulární H-vazbě/ν(C=C) fenyl	-	-	-	-	-	-	1627 s amide I	-	1629 w	1634 w	-	1623 m	1622 s
1604 vs	1605 vs	C=C konjugované (aromatická jádra)	1611 s	1611 m	1607 s	1600 vs	1599 vs	-	-	1617 w	-	-	1618 m	-	-
-	1590 s	C=O ve skupině COO^-	-	-	-	-	-	1594 w	-	-	1588 w	1591 m	1581 vs	-	-
1551 m	1551 s	C=O ve skupině COO^-	-	-	1537 s	-	-	1549 vw	1566 m amide II	1576 m	-	-	-	1575 m	1571 s
1512 m	-	ν(C=C) fenyl, akceptor	**1497 s**	**1503 m**	1514 s	**1511 vs**	**1513 s**	**1506 m**	-	-	-	-	-	1507 w	1501 w
1463 w	1475 m	ν(C=C) fenyl, akceptor	-	**1476 s**	-	-	-	1461 m	1462 m	-	-	1463 vs	1456 m	-	-
1449 m	1451 m	$\delta_a(CH_3+CH_2)$	1449 s	1445 m	1441 vs	1453 m	1443 m	-	1437 m	1452 vs	-	-	1433 s	1453 vs	1443 vs
1424 sh	1425 w	$\delta(CH_2)$ rovinná	**1424 s**	-	-	-	-	**1424 m**	-	-	-	-	-	-	-
-	1404 m	$\delta(CH_2)$ rovinná	1412 sh	-	1418 vs	-	-	-	1414 s	-	**1411 m**	-	-	1409 s	1406 vs
-	1373 w	$\delta_s(CH_3+CH_2)$	1374 s	-	1377 s	-	-	1369 m	1380 s	1380 m	-	1401 vw	1382 w	**1378 s**	1375 vs
1365 w	-		**1363 m**	1362 m	-	1359 w	1365 m	-	-	-	1361 m	-	-	-	-
1346 m	1348 s	δ(C-H)	-	-	-	1341 w	1340 w	-	-	1350 s	-	1350 s	-	-	-
-	1331 m	δ_s(C-H), skelet	-	1323 sh	-	-	-	**1327 m**	-	-	-	1331 vs	1329 m	-	-
-	1300 w	δ_s(C-H), skelet	-	**1293 s**	1298 vs	-	-	-	-	-	1297 w	1303 vs	-	**1309 vs**	1294 vs
1284 w	1285 m	ν(C-O) + ν(C-C) +δ (CH_2)	1281 s	-	-	1283 m	-	-	-	-	-	-	1279 vs	-	-
-	1267 w	ν(C-H) rovinná + ν(C-O)	**1250 s**	1261 s	-	-	1263 m	**1266 m**	-	1271 vs	1263 w	1268 m	-	-	-
1231 w	-		-	-	1246 m	-	-	-	1240 m	-	-	-	1246 s	1243 s	1237 vs
-	-		-	-	1225 s	1225 s	-	1226 s	-	-	-	-	-	-	-
-	1215 w	C-H rovinná, p-substituovaný benzen	-	**1209 s**	1207 s	**1205 s**	**1204 m**	-	-	-	-	1200 m	1201 m	-	-

Tabulka 4 pokračování

kamala cm^{-1}	rottlerin cm^{-1}	Orientační přiřazení	**brazil** cm^{-1}	**kampeška** cm^{-1}	hematein cm^{-1}	**dračí krev** cm^{-1}	**akaroid** cm^{-1}	**santal** cm^{-1}	**košenila** cm^{-1}	karmínová kyselina cm^{-1}	**kraplak** cm^{-1}	alizarin cm^{-1}	purpurin cm^{-1}	**laka** cm^{-1}	lakaová kyselina cm^{-1}
-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1183 w	-	1190 m	1184 sh
1167 m	1172 m	ν(C-O) ve skupině OH	1163 m	1169 m	1171 s	**1171 s**	**1161 m**	**1155 s**	1153 m	1154 w	-	1162 w	1167 s	1163 m	1169 sh
-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	**1146 m**	-	-	1148 w	1142 sh
1130 m	1132 m	ν(C-O) ve skupině OH	-	-	1138 w	-	-	-	-	-	-	-	-	1127 w	1127 sh
1103 w	1103 w	ν(C-O) ve skupině OH	**1113 m**	-	1104 w	1116 m	1115 w	1115 s	-	-	1103 m	-	-	1099 m	1097 w
-	-		-	1086 m	1086 w	-	-	-	1078 s	1085 vs	1074 s	-	-	-	-
1056 vw	1061 vw	C-H rovinná, p-substituovaný benzen	**1047 m**	**1056 s**	1066 m	-	-	1053 vs	1051 s	1046 vs	-	1047 vw	1063 w	1052 s	1049 w
1027 vw	-		-	-	1034 w	1036 w	-	1032 vs	1024 s	-	**1022 vs**	1032 vw	1027 w	-	-
-	1014 vw	C-H rovinná, p-substituovaný benzen	-	-	-	-	992 vw	-	-	1006 m	996 vs	1013 w	-	1011 m	1008 vw
982 vw	979 vw	δ(C-H)	-	-	977 vw	-	-	-	-	979 m	-	-	-	-	-
-	958 vw	δ(C-H)	-	-	942 vw	**954 vw**	-	-	-	956 w	-	-	963 vw	962 m	962 vw
-	949 vw	δ(C-H)	-	-	-	-	-	-	-	-	928 w	-	-	943 m	-
-	887 vw		-	-	-	-	-	896 vw	-	891 w	-	895 vw	-	899 m	-
-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	873 m	880 vw
-	837 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	855 w	866 vw	854 w	**834 m**	**835 s**	834 vw	-	848 w	-	849 vw	-	**834 vs**	834 w
-	-	nespecifická mimorovinná vibrace	-	-	-	-	-	-	-	818 w	-	828 vw	813 vw	**812 vs**	815 vw
-	-	nespecifická mimorovinná vibrace	-	794 vw	794 w	-	-	-	-	-	-	-	780 vw	-	-
767 vw	767 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	-	777 vw	764 vw	-	-	-	-	770 w	-	764 vw	-	**774 s**	773 vw
-	754 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	748 w	746 vw	742 m	739 vw
-	724 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	-	-	722 vw	-	-	-	-	-	-	712 s	727 vw	-	-
699 w	694 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	-	702 vw	697 vw	-	-	-	-	-	-	-	700 vw	700 m	-
-	677 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	675 vw	-	-	-
-	658 vw	nespecifická mimorovinná vibrace	-	-	656 w	-	-	-	-	-	-	659 vw	-	656 w	-

4.2.1.1 Směs barviva s lněným olejem (publikace IV-V)

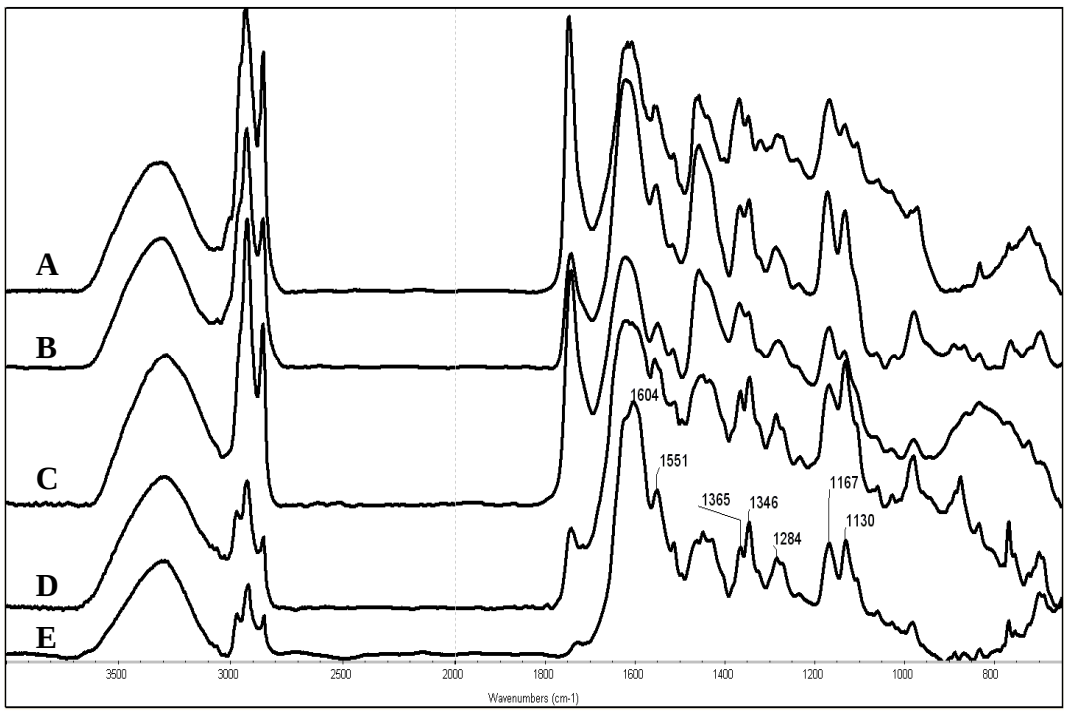
Navržená metodika byla aplikována na modelové vzorky olejových barev, tedy směsi barviva s lněným olejem ve formě husté pasty nanesené na skle. Infračervené spektrum polymerovaného lněného oleje, který byl historicky nejčastěji používán jako pojivo tvořící jemný průhledný film, je mnohem chudší a tvoří jej především intenzivnější vibrační pásy odpovídají vibracím C=O a C-H vazeb [64,84], a to jak valenčním, tak i deformačním (3004, 2935, 2855, 1749, 1627, 1464, 1377, 1233, 1167, 1101, 968, 723 cm^{-1}). Během urychleného stárnutí nedochází k spektrálně výrazné degradaci lněného oleje, přestože jím tvořený film viditelně popraská. Mikroskopická identifikace barviva v stárnutém vzorku je oproti očekávání snazší. Praskliny v stárnutém lněném oleji usnadňují nalezení zrn samotného barviva, fokusaci paprsku na barvivo a proměření jeho infračerveného spektra. Na obr. 29 je pro ukázku uvedeno spektrum kamaly s polymerovaným lněným olejem po urychleném stárnutí (obr. 29A) a spektrum samotného barviva kamala (obr. 29B) a její hlavní barvicí složky rottlerinu (obr. 29C) v rozsahu vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1}. Pro identifikaci kamaly lze využít vibrační pásy 1606, 1551, 1360, 1281, 1165 a 1129 cm^{-1}.



Obr. 29 Infračervená spektra (**A**) směsi kamaly s polymerovaným lněným olejem po urychleném stárnutí, (**B**) barviva kamala a (**C**) její hlavní barvicí složky rottlerinu; rozsah vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.

Jak v nestárnutém, tak v stárnutém modelovém vzorku směsi kampešky s polymerovaným lněným olejem lze v infračerveném spektru identifikovat barvivo kampeška pomocí vibračních pásů pro vlnočty 1612, 1504, 1321, 1285 a 1059 cm^{-1}. Ve spektru směsi kraplaku s olejem nalezneme pouze tři vibrační pásy, které příslušejí alizarinu při vlnočtech 1595, 1337 a 1268 cm^{-1}. Tytéž vibrační pásy nalezneme i ve spektru urychleně stárnutého modelového vzorku. Ve spektru stárnuté směsi laky s olejem identifikujeme laku pomocí pásů při vlnočtech 1625, 1573, 1509, 1409, 1309, 1057, 1014, 830, 810 a 777 cm^{-1}. K tvorbě modelového vzorku barevné vrstvy košenily byl díky absenci organické matrice použit karmín. Ve spektru stárnuté směsi karmínu s olejem nalezneme vibrační pásy karmínu pro vlnočty 1645, 1605, 1566, 1417 a 1292 cm^{-1}. Ve spektrech stárnutého modelového vzorku barevné vrstvy lze nalézt i pásy barviv, jejichž pásy nelze porovnat se spektry jejich hlavních barvicích složek: dračí krev (1650, 1600, 1511, 1278, 1205 a 835 cm^{-1}), akaroid (1605, 1513, 1339 a 835 cm^{-1}), brazil (1612, 1502, 1242 a 853 cm^{-1}) a santal (1595 a 1318 cm^{-1}).

Pomocí mikroskopické fokusace paprsku infračerveného záření lze barvivo kamala identifikovat také ve směsi lněného oleje s bělobou podrobené urychlenému stárnutí (obr. 30).



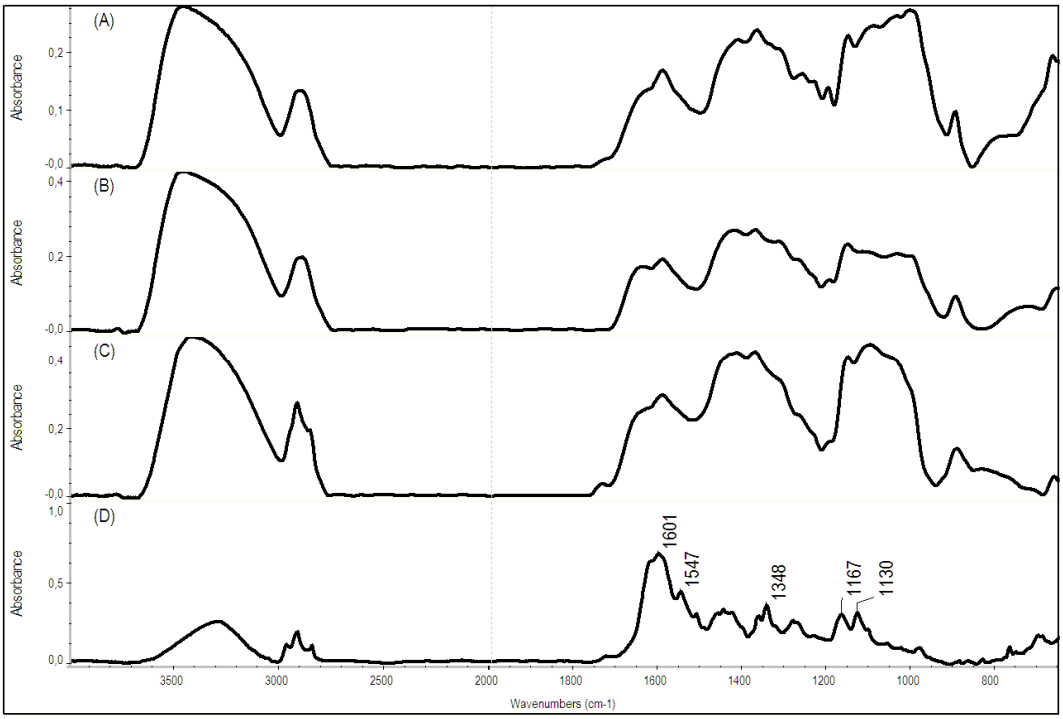
Obr. 30 Infračervené spektrum směsi kamaly s bělobou a polymerovaným lněným olejem po urychleném stárnutí; (**A**) ZnO, (**B**) TiO_2, (**C**) $2PbCO_3 \cdot Pb(OH)_2$, (**D**) $CaCO_3$; a (**E**) kamala; rozsah vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.

4.2.1.2 Barvená textilie (publikace V)

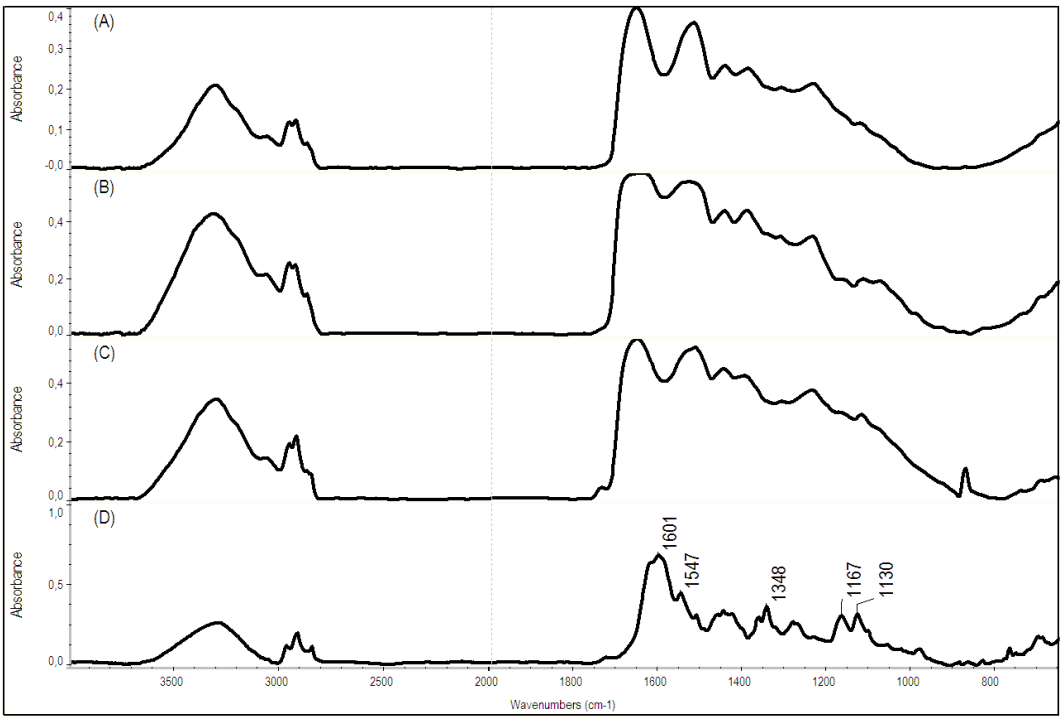
Metodika mikroskopické infračervené spektroskopie byla dále ověřena na identifikaci studovaných barviv v barvených textilních vláknech vlny s viskózou. Vlněná vlákna mořená ionty Al^{3+} (vlna zbarvená bíle), Fe^{2+} (vlna světle hnědá) a Cu^{2+} (vlna světle zelená) obsahují ve svém spektru intenzivní pásy v oblasti 2800 – 3600 cm^{-1} příslušející vibracím OH, N-H a C-H skupin [84]. Dva nejintenzivnější proteinové pásy (amid I a amid II) s vlnočty kolem 1650 a 1550 cm^{-1} příslušejí vibracím C=O vazby, resp. N-H a C-N vazby [84]. Viskózová vlákna jsou sacharidového skeletu, což se projevu ve spektru silnými pásy v oblastech vlnočtů 1200 - 1000 cm^{-1} a 1500 – 1300 cm^{-1}. Během urychleného stárnutí samotná vlněná mořená vlákna tmavnou, v infračervených spektrech se to však projeví pouze v posunu vibračních pásů OH skupin k nižším vlnočtům (z 3341 cm^{-1} na 3311 cm^{-1}) a v intenzitě vibrační pásů.

Ve spektrech barvených viskózových vláken nalezneme pouze vibrační pásy příslušející viskózovému vláknu. Žádné ze studovaných barviv se nepodařilo identifikovat ve vláknech viskózy, což je také způsobeno neochotou viskózových vláken inkorporovat do své struktury ionty mořidla, na které se organická barviva váží. Na obr. 31 jsou zobrazena infračervená spektra stárnutých viskózových vláken barvených kamalou pro všechny tři druhy použitých mořidel. Barvivo kamala nelze v žádném z uvedených spekter identifikovat, obdobně jako ostatní barviva. V infračerveném spektru vlněného vlákna (mořeného ionty Al^{3+}) barveného kamalou lze najít vibrační pásy, které se odlišují od spektra nebarvené vlny, a to pro vlnočty 1738, 1167 a 1130 cm^{-1}. Tyto pásy nalezneme i v infračerveném spektru kamaly, respektive rottlerinu (tabulka 4). Ostatní významné vibrační pásy kamaly (1551 cm^{-1} a 1346 cm^{-1}) jsou překryty intenzivnějšími pásy vlněného vlákna. Ve spektru stárnutého vlněného vlákna barveného kamalou (mořeného ionty Al^{3+}) lze přes snížení intenzity vibračních pásů využít pás odpovídající vlnočtu 1121 cm^{-1} k identifikaci kamaly. Infračervená spektra stárnutých vlněných vláken mořených všemi třemi použitými mořidly a barvených kamalou jsou znázorněny na obr. 32 společně se spektrem samotného barviva kamala (obr. 32D). I v případě ostatních barviv je jejich identifikace ve vlněných vláknech ztížena intenzivními pásy proteinového vlákna. Přesto lze barviva identifikovat pomocí vibračních pásů ležících v oblasti nižších

vlnočtů, které nejsou překryty vibračními pásy vlněných vláken, a využitím matematických úprav spekter.



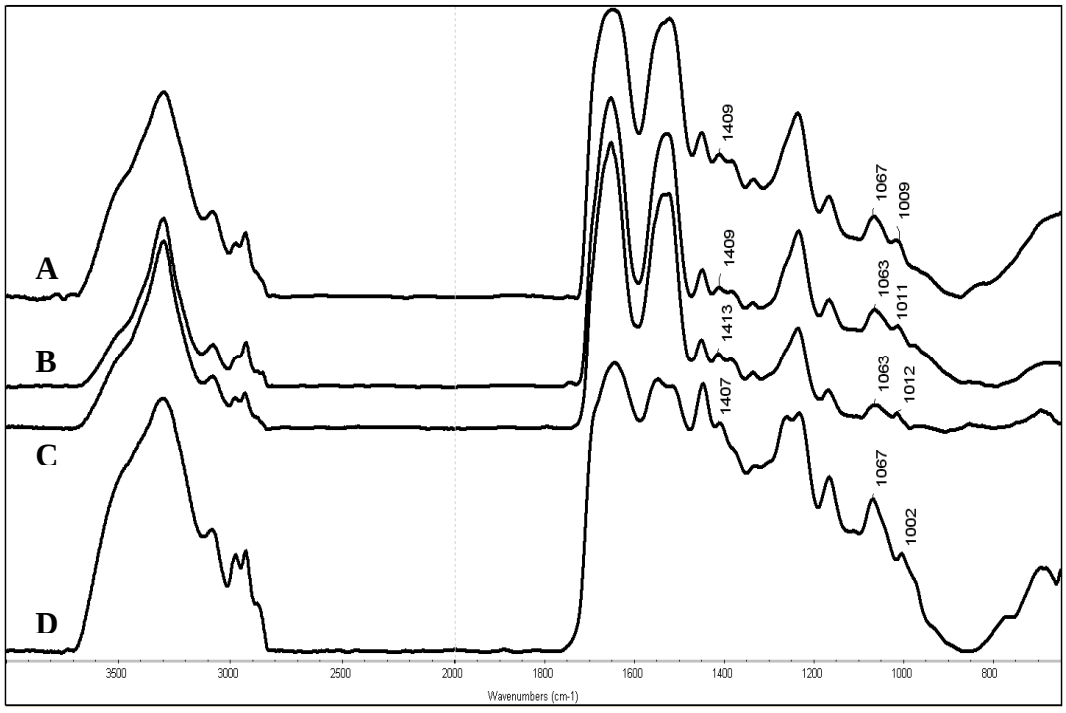
Obr. 31 Infračervená spektra viskózových vláken barvených kamalou po urychleném stárnutí, kde vlákno bylo mořeno ionty (**A**) Al^{3+}, (**B**) Cu^{2+}, (**C**) Fe^{2+} a (**D**) spektrum samotného barviva kamala; rozsah vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.



Obr. 32 Infračervená spektra vlněných vláken barvených kamalou po urychleném stárnutí, kde vlákno bylo mořeno ionty (**A**) Al^{3+}, (**B**) Cu^{2+}, (**C**) Fe^{2+} a (**D**) spektrum samotného barviva kamala; rozsah vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.

4.2.1.3 Reálné vzorky (publikace V)

Metodika identifikace organických barviv pomocí infračervené spektroskopie (reflexní absorpce) byla ověřena na čtyřech červených vláknech z barokní kasule. Ze získaných infračervených spekter, která jsou uvedena na obr. 33, lze s jistotou identifikovat pouze typ použitého vlákna - vlna. Proteinová vlněná vlákna obsahují dva intenzivní pásy při vlnočtech kolem 1650 cm^{-1} a 1550 cm^{-1}, které nalezneme ve spektru všech čtyř reálných vzorků. Tyto pásy však překrývají významné vibrační pásy studovaných organických barviv, k jejichž identifikaci tak lze využít pouze pásy pro vlnočty 1410, 1065 a 1012 cm^{-1}. Porovnáním získaných spekter s tabulkou 4 můžeme reálným vzorkům přiřadit barvivo košenila, kraplak či laka. Obliba alizarinu k barvení textilií i růžové zbarvení dvou vláken (na obr. 33 označeny A a B) napovídá využití kraplaku jako použitého barviva v reálných vzorcích. Zbylá dvě vlákna (na obr. 33 označeny C a D) byla červená, což by ukazovalo na barvivo košenila, ovšem výsledný barevný odstín závisí i na typu použitého mořidla. K přesné identifikaci použitého barviva k barvení uvedených reálných vláken je tedy potřeba matematických úprav spekter či extrakce barviva z vláken.



Obr. 33 Infračervená spektra čtyř reálných vzorků červených vláken barokní kasule z Vlastivědného muzea Dr. Hostaše v Klatovech; rozsah vlnočtů 650 – 4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.

4.2.2 Ramanova spektroskopie barviv (publikace III-V)

Hlavní barvicí složky organických barviv ve většině případů vykazují vysokou fluorescenci, která neúměrně zvyšuje pozadí a překrývá tak vibrační pásy samotné barvicí složky, potažmo samotného barviva. Změna intenzity energie paprsku tuto fluorescenci neovlivnila. Nižší energie není dostatečná k excitaci molekul (pouze při vlnové délce 785 nm a 352 nm), naopak vyšší energie vzorky spaluje.

V Ramanově spektru rottlerinu nalezneme řadu významných pásů odpovídající vlnočtům 1627, 1597, 1551, 1476, 1300, 1206, 1178, 1142, 1060, 998, 971, 860, 753, 580, 556, 478, 447, 400 a 368 cm^{-1}. Barvivo kamala vykazuje v Ramanově spektroskopii obdobná spektra jako rottlerin, kdy nejvýraznějšími pásy jsou tři vibrační pásy pro vlnočty 1626, 1600 a 1552 cm^{-1}, které jsou pro kamalu, respektrive rottlerin specifické. Ramanovo spektrum hemateinu tvoří vibrační pásy pro vlnočty 1607, 1566, 1415, 1396, 1252, 1172, 770, 701, 633, 544 a 478 cm^{-1}, a to pouze po excitaci 532 nm. Tyto pásy se shodují s Ramanovým spektrem kampešky. Spektrum alizarinu je oproti spektru purpurinu bohatší na počet vibračních pásů v oblasti 1100 – 1660 cm^{-1}. Nalezneme zde vibrační pásy 1658, 1632, 1587, 1568, 1457, 1401, 1294, 1216, 1191, 1162, 682, 660, 468, 418, 359 a 345 cm^{-1} pro alizarin (shoda s [71]), a 1466, 1330, 1252, 1068, 453 a 417 cm^{-1} pro purpurin. Vysoká fluorescence barviva kraplak v Ramanově spektroskopii pro excitaci oběma dostupnými lasery znemožňuje jeho identifikaci. V případě Ramanovy spektroskopie lakaové kyseliny po excitaci laserem o 532 nm je pozadí také převýšeno vysokou fluorescencí. Při excitaci laserem 785 nm získáme vibrační pásy při vlnočtech 1574, 1463, 1234, 1097, 454 a 408 cm^{-1}. Opět díky vysoké fluorescenci se samotné barvivo laka nepodařio změřit ani pro jeden laser. Obdobně jako v případě lakaové kyseliny, vykazují karmínová kyselina i karmín spektra pouze po excitaci při 785 nm. Karmínovou kyselinu lze identifikovat pomocí vibračních pásů při vlnočtech 1466, 1220, 452 a 430 cm^{-1}. Ramanovo spektrum karmínu je bohatší, obsahuje vibrační pásy při vlnočtech 1487, 1423, 1358, 1316, 1252, 1110, 567, 471 a 424 cm^{-1}. Samotná košenila však Ramanovo spektrum opět neposkytuje. Barviva dračí krev, akaroid, santal a brazil opět nejsou identifikovatelné pro oba excitační lasery. Souhrn vibračních pásů a jejich orientační přiřazení [84] je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5 Orientační přiřazení vibrací [84] studovaných barviv a hlavních barvicích složek, které vykazují Ramanovo spektrum. Intenzity pásů: vw = velmi slabá, w = slabá, m = střední, s = silná, vs = velmi silná

Vlnočty v rozmezí 1700 cm^{-1} – 1140 cm^{-1}

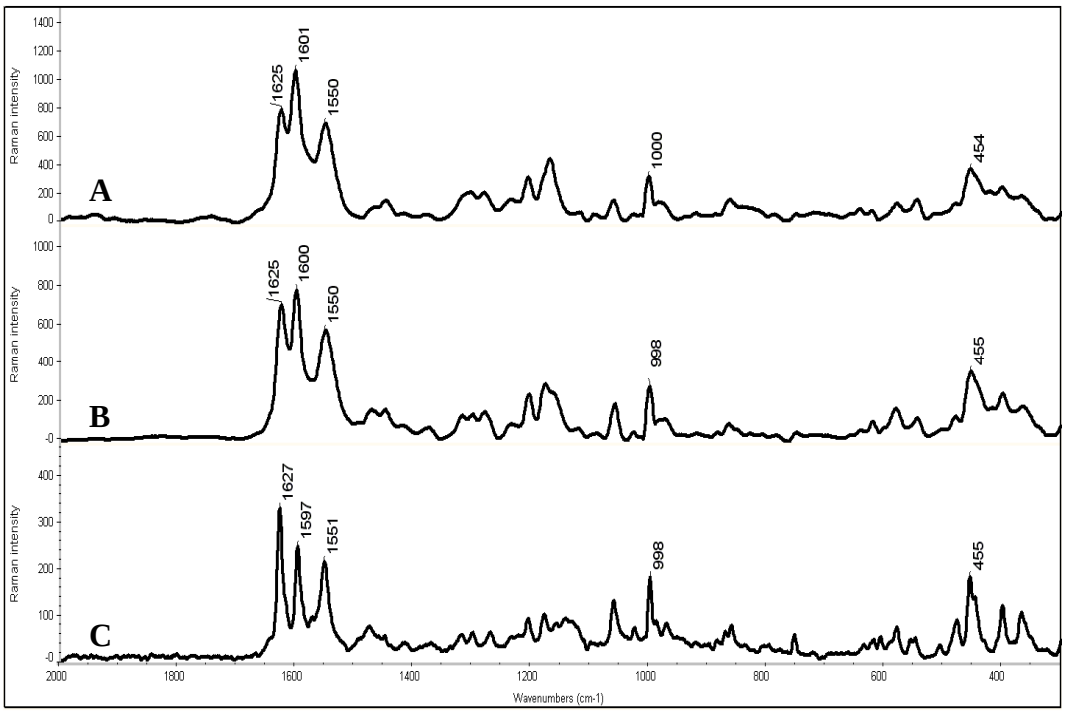
kamala cm^{-1}	rottlerin cm^{-1}	Orientační přiřazení	**kampeška** cm^{-1}	hematein cm^{-1}	karmínová kyselina cm^{-1}	karmín cm^{-1}	alizarin cm^{-1}	purpurin cm^{-1}	lakaová kyselina cm^{-1}
	-		-	-	-	-	1658 w	-	-
1628 vs	1630 vs	ν(C=O) v konjugaci s	-	-	-	-	1632 w	-	-
		C=C a v intramoleku-							
		lární H-vazbě/υ(C=C)							
		fenyl							
1602 vs	1600 m	C=C konjugované	1607 m	1607 m	-	-	1587 s	-	-
		(aromaty)							
1554 s	1555 m	C=O skupiny COO^-	1565 vs	1566 vs	-	1527 w	1568 m	-	1574 s
-	-		-	-	1497 m	-	-	-	-
1469 vw	1480 vw	ν(C=C) fenyl	-	-	1475 sh	1487 m	-	-	-
-	-		-	-	1466 vs	-	1457 m	1466 vs	1463 vs
-	-		-	-	1459 s	-	-	-	-
1451 vw	-		-	-	1451 s	-	-	-	-
-	-		-	-	1443 sh	1423 m	-	-	-
1422 vw	-		1413 sh	1415 m	-	-	-	-	-
-	-		1394 s	1396 s	-	-	1402 vw	-	-
1380 vw	-		-	-	-	-	-	-	1379 m
-	-		-	-	-	1358 m	-	1330 s	1326 m
1304 vw	1303 vw		-	-	-	1316 vs	1294 vw	-	-
-	-		-	1252 vw	-	1252 s	-	1252 vs	-
-	-		1248 vw	-	1227 m	-	-	-	1234 s
-	-		-	-	1220 m	-	-	-	-
1208 vw	1209 vw		-	-	1213 m	-	1216 w	-	-
1177 vw	1183 vw	ν(C-O) skupiny OH	-	-	-	-	1191 s	-	-
-	-		-	1172 vw	-	-	1162 w	-	-
-	1147 vw	ν(C-O) skupiny OH	-	-	-	-	-	-	-

Vlnočty v rozmezí 1140 cm^{-1} – 300 cm^{-1}

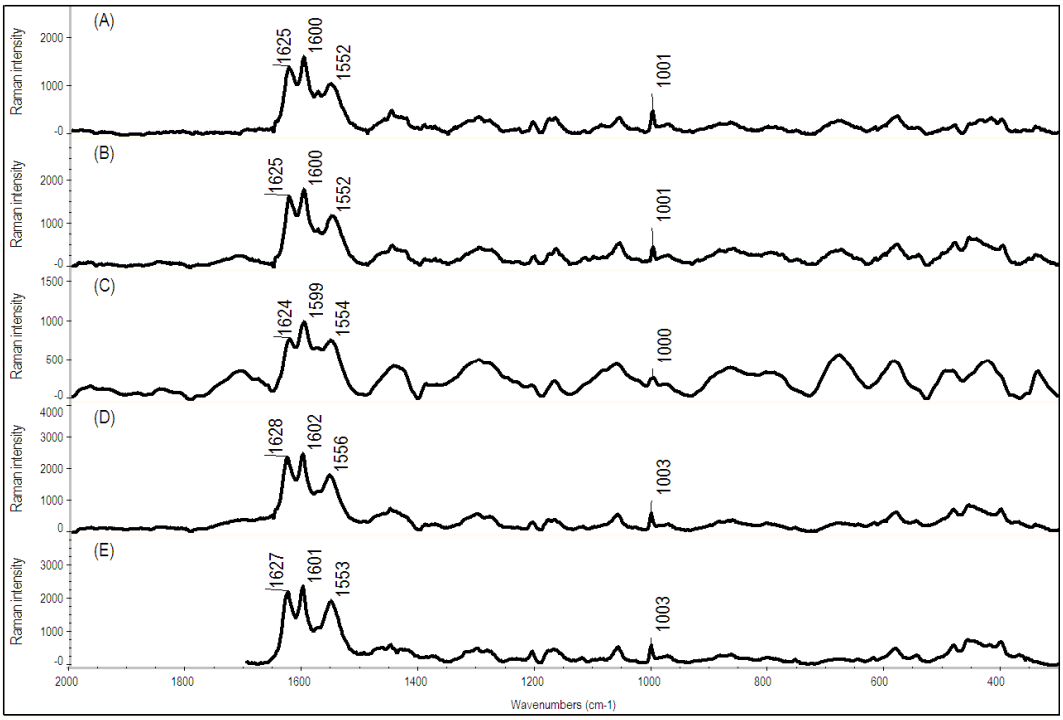
kamala cm^{-1}	rottlerin cm^{-1}	Orientační přiřazení	**kampeška** cm^{-1}	hematein cm^{-1}	karmínová kyselina cm^{-1}	karmín cm^{-1}	alizarin cm^{-1}	purpurin cm^{-1}	lakaová kyselina cm^{-1}
-	-		-	-	-	1110 vw	-	-	-
1062 vw	1064 w	ν(C-O) skupiny OH	-	1058 vw	-	-	-	1068 m	1097 w
1003 vw	1001 vw	ν(C-H) mimorovinné	-	-	-	-	-	-	-
972 vw	976 vw		-	-	-	-	-	968 w	-
-	-		-	-	-	-		903 vw	-
865 vw	863 vw		-	874 vw	-	-	-	831 vw	-
-	805 vw		-	-	-	-	-	-	-
-	757 vw		771 vw	770 vw	-	-	-	-	-
-	-		701 w	703 vw	-	-	682 vw	-	-
-	-		633 vw	633 vw	-	-	660 w	657 vw	-
585 vw	583 vw		-	-	-	-	-	-	-
-	554 vw		543 vw	544 w	-	567 w	568 vw	-	-
-	-		-	516 vw	-	-	-	-	513 vw
484 vw	483 w	mimorovinné a	477 vw	478 w	-	471 m	484 w	-	475 w
		rovinné vibrace							
		substituovaného							
		benzenu							
458 w	450 w	mimorovinné a	442 vw	452 vw	452 m	-	468 vs	453 m	454 m
		rovinné vibrace							
		substituovaného							
		benzenu							
-	-		-	-	430 m	424 w	-	-	-
403 vw	404 w	nespecifické mimo- a	-	-	-	-	418 w	417 m	408 m
		rovinné vibrace							
-	371 vw	nespecifické mimo- a	-	-	-	-	388 w	-	-
		rovinné vibrace							
-	-		-	-	-	-	345 w	-	-
-	-		307 vw	310 w	-	-	-	-	-

4.2.2.1 Směs barviva s lněným olejem (publikace IV-V)

Přítomnost stárnutého polymerovaného oleje s dlouhými řetězci C-C vazeb překvapivě snižuje fluorescenci barviva, což umožňuje detekci vibračních pásů příslušejících lakaové kyselině pro vlnočty 1585, 1459, 1236, 1095, 453 a 410 cm^{-1}. Ramanovo spektrum stárnutého modelového vzorku karmínu s olejem obsahuje vibrační pásy pro vlnočty 1525, 1485, 1442, 1309, 1255, 1224 a 462 cm^{-1}, které nalezneme i ve spektru samotného karmínu. Kampešku lze identifikovat také v stárnutém modelovém vzorku po excitaci 532 nm. Spektrum směsi je identické se spektrem kampešky, respektive hemateinu. Ve směsi kamaly s lněným olejem je identifikace barviva jednoznačná pro vibrační pásy 1625, 1601, 1550, 1000 a 454 cm^{-1} odpovídající spektru rottlerinu (obr. 34). Obdobně jako u IR i v Ramanově mikrospektroskopii lze díky fokusaci paprsku laseru a nízkým vlnočtům vibračních pásů bělob jednoznačně identifikovat vibrační pásy kamaly ve směsi s olejem a bělobou po urychleném stárnutí. Ve všech těchto spektrech (viz obr. 35) jsou pouze vibrační pásy příslušející kamale pro vlnočty 1625, 1600, 1550 a 998 cm^{-1}. Identifikace kraplaku, akaroidu, brazilu, dračí krve a santalu v modelovém vzorku směsi barviva s polymerovaným olejem technikou Ramanovy mikrospekroskopie po excitaci 785 nm a 532 nm nebyla úspěšná.



Obr. 34 Ramanova spektra (**A**) směsi kamaly a polymerovaného lněného oleje po urychleném stárnutí, (**B**) barviva kamala a (**C**) její hlavní barvicí složky rottlerinu po excitaci při 785 nm; rozsah vlnočtů 300 – 2000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.



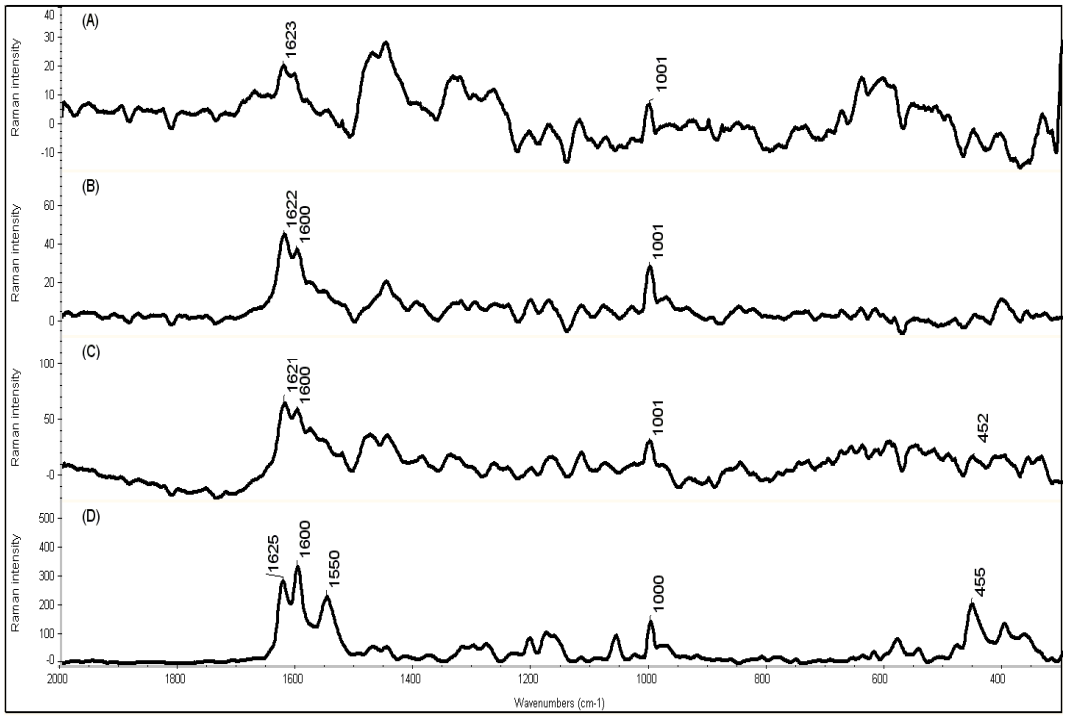
Obr. 35 Ramanova spektra směsí kamaly s bělobou a polymerovaným olejem v poměru 1:2:10 (v/v/v) po urychleném stárnutí, kde bělobou byl (**A**) ZnO, (**B**) TiO_2, (**C**) $Pb(OH)_2 \cdot 2\ PbCO_3$ a (**D**) $CaCO_3$, a (**E**) spektrum samotného barviva kamala po excitaci při 532 nm; rozsah vlnočtů 300 – 2000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.

4.2.2.2 Barvená textilie (publikace V)

Ionty mořidla obsažené v barvených vlněných vláknech stabilizují navázané barvivo, především byla-li vlna mořena ionty Cu^{2+} a Fe^{2+}, a tím snižují jeho fluorescenci v Ramanových spektrech. K identifikaci kamaly i kampešky ve vlněných vláknech došlo pouze po excitaci laserem o 785 nm, a to i pro barvená vlákna podrobená urychlenému stárnutí. Na obr. 36 jsou uvedena Ramanova spektra kamaly a vlněného vlákna mořeného všemi typy použitých mořidel, tedy $KAl(SO_4)_2$, $CuSO_4$ a $FeSO_4$, po urychleném stárnutí a dále spektrum samotného barviva kamala po excitaci 785 nm. Barvivo kamala lze tedy identifikovat nalezením specifických vibračních pásů pro vlnočty 1625, 1600 a 1000 cm^{-1}. Obdobně lze v stárnutých vlněných vláknech identifikovat barvivo kampeška po nalezení specifických vibračních pásů pro vlnočty 1607, 1565, 1413, 1394 a 701 cm^{-1}.

Ostatní barviva vykazují stále vysokou fluorescenci, která zvyšuje pozadí Ramanových spekter, a nebylo je tak možné identifikovat ani v barvených vlněných vláknech. Pro barviva košenila, laka a kraplak se nepodařilo touto

technikou získat žádné spektrum, a proto pro vlákna reálných barvených textilií nebyla Ramanova spektroskopie využita.



Obr. 36 Ramanova spektra vlněných vláken barvených kamalou po urychleném stárnutí, kde vlákno bylo mořeno ionty (**A**) Fe^{2+}, (**B**) Cu^{2+}, (**C**) Al^{3+} a (**D**) spektrum samotného barviva kamala po excitaci při 785 nm; rozsah vlnočtů 300 – 2000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}.

4.2.3 Dílčí závěr

Infračervenou mikrospektroskopií lze identifikovat barvivo laka, kamala a kampeška i ve spektru stárnutého modelového vzorku olejové malby. Významné vibrační pásy jednotlivých barviv jsou pro kamalu 1551, 1346, 1167 a 1130 cm^{-1}, kampešku 1503, 1476, 1293, 1209 a 1056 cm^{-1} a laku 1715, 1378, 1309, 834, 812 a 774 cm^{-1}. U barviva kraplak jsou vibrační pásy příslušející pásům jeho hlavních barvicích složek slity do širokých pásů. Nejintenzivnější pásy odpovídají anorganické matrici, na kterou byl kraplak vysrážen. Obdobně intenzivní vibrační pásy barviva košenila nejsou specifické, odpovídají vibracím proteinové a sacharidové složky skeletu hmyzu. Vibrační pásy barviv dračí krev, akaroid, brazil a santal nebylo možné přiradit vibracím jejich hlavních barvicích složek, protože nebyly komerčně dostupné. Metodika infračervené spektroskopie byla dále ověřena na modelových vzorcích barvených textilních vláken. Vibrační pásy

vlněných vláken překrývají pásy samotných barviv, které lze identifikovat pouze po matematické úpravě spekter.

Disperzní Ramanova mikrospektroskopie je vhodná pro jednoznačnou identifikaci jen těch barviv, která nemají příliš vysokou fluorescenci. Z testovaných barviv jsou to pouze barviva kamala (1626, 1600, 1573, 1552 a 1001 cm^{-1}) a kampeška (1607, 1565, 1413, 1394 a 701 cm^{-1}). Identifikace těchto barviv je jednoznačná nejen ve směsi s polymerovaným lněným olejem před i po urychleném stárnutí, ale také v barvených vláknech vlny. Výhodou Ramanovy mikrospektroskopie oproti infračervené mikroskopii je nevýznamný vliv matrice (polymerovaný olej, vlněná vlákna, běloby) na tvar spektra, a tím jednoznačná identifikace barviva.

5 ZÁVĚR

Cílem této disertační práce bylo porovnání možností identifikace organických barviv separačními a spektrometrickými metodami pro potřeby restaurátorů. Studovanými organickými přírodními barvivy byly akaroid, brazil, dračí krev, kamala, kampeška, košenila, kraplak, laka a santal. Pro jejich identifikaci byly vybrány tři separační techniky (tenkovrstvá chromatografie, kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie), a dvě spektrometrické techniky (infračervená a Ramanova mikrospektroskopie).

V tenkovrstvé chromatografii se silikagelovými stacionárními fázemi byly studovány eluční systémy pro identifikaci hydroxyderivátů anthrachinonu v normálním i reverzním módu v rozsahu pH 2 - 10. Zvolený eluční systém s reverzní fází tvořenou aluminiovou deskou s oktadecylem navázaným na silikagel a vyvíjecí fází 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 $mol \cdot dm^{-3}$ octanovém pufru, pH 5 a 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborátovém pufru o pH 7 a 9 byl použit pro identifikaci samotných barviv. V optimalizovaných elučních systémech se však skvrny barviv santal, kampeška, akaroid, dračí krev a brazil rozmývají. Hlavní barvicí složky karmínová kyselina, hematein a purpurin se za stejných elučních podmínek nepodařilo detekovat.

Metody kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie byly opět optimalizovány pro identifikaci hydroxylovaných derivátů anthrachinonu. Bylo zjištěno, že MEKC je vhodnější pro separaci a kvantifikaci antrachinonových derivátů. Jako elektrolyt byl vybrán 0,01 $mol \cdot dm^{-3}$ fosfátový a 0,01 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborátový pufr o pH 6,5 – 10,8 s přídavkem dodecylsulfátu sodného o koncentraci 0,00 – 0,02 $mol \cdot dm^{-3}$. Optimalizované podmínky, tj. 0,01 $mol \cdot dm^{-3}$ tetraborátový pufr o pH 8,5 s 0,015 $mol \cdot dm^{-3}$ SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm, byly použity pro validaci metody a pro identifikaci samotných přírodních barviv a reálných vzorků bylin *Rubia tinctorum*, *Rubia cordifolia* a mycelia houby *Geosmithia lavendula* obsahující studovaná barviva.

Infračervená a Ramanova mikrospektroskopie byla nejprve použita pro nalezení významných vibračních pásů hlavních barvicích složek (alizarin, purpurin, rottlerin, hematein, karmínová kyselina, karmín a lakaová kyselina). Spektra hlavních bavicích složek byly porovnány se spektry samotných barviv a

byly nalezeny společné vibrační pásy, které jsou vhodné k identifikaci barviva. Významné vibrační pásy kamaly jsou v infračervené mikroskopii 1551, 1346, 1167 a 1130 cm^{-1}, kampešky 1503, 1476, 1293, 1209 a 1056 cm^{-1} a laky 1715, 1378, 1309, 834, 812 a 774 cm^{-1}. Vibrační pásy barviv kraplak a košenila jsou překryty vibračními pásy matrice. Spektra barviv dračí krev, akaroid, brazil a santal nebylo možno porovnat se spektry jejich hlavních barvicích složek, které nebyly komerčně dostupné. V Ramanově mikrospektroskopii lze jednoznačně identifikovat pouze barvivo kampeška s vibračními pásy 1607, 1565, 1413, 1394 a 701 cm^{-1} po excitaci při 532 nm a barvivo kamala s vibračními pásy 1626, 1600, 1573, 1552 a 1001 cm^{-1} pro oba použité lasery 785 nm a 532 nm. Ostatní barviva vykazují příliš vysokou fluorescenci, která neúměrně zvyšuje pozadí a překrývá tak vlastní vibrační pásy barviv.

Obě techniky byly ověřeny pro identifikaci barviv v modelových vzorcích olejové barevné vrstvy (směs barviva s polymerovaným lněným olejem, v případě kamaly s přídavkem čtyř druhů bělob) a barvených vlněných a viskózových vláken mořených třemi typy mořidel (síranem železnatým, měďnatým a draselno-hlinitým). Modelové vzorky byly také podrobeny urychlenému stárnutí pod viditelným zářením a zářením blízkým UV. Barviva kamala, kampeška a laka lze identifikovat infračervenou mikrospektroskopií i ve stárnutých modelových vzorcích olejové malby. Obdobně i ostatní barviva lze identifikovat ve stárnuté směsi barviva s lněným olejem přiřazením vibračních pásů směsi významným vibračním pásům jednotlivého barviva. Infračervená spektra textilních vláken obsahují mnohem intenzivnější vibrační pásy vazeb proteinové (vlna) či polysacharidové (viskóza) struktury vláken oproti nízké intenzitě pásů barviv. Barviva tak lze identifikovat pouze po matematické úpravě spekter či po extrakci vhodnou separační technikou, například MEKC. Ramanova mikrospektroskopie se osvědčila také pro identifikaci kampešky a kamaly, jež lze jednoznačně identifikovat také v modelových vzorcích barvené textilie a olejové malby (i ve směsi kamaly s olejem a bělobami: titanovou, zinečnatou, olovnatou a křídou) před a po urychleném stárnutí. Urychleně stárnutý polymerovaný olej překvapivě snižuje fluorescenci samotných barviv. Metoda infračervené mikrospektroskopie byla také použita pro identifikaci červených barviv použitých pro barvení textilních vláken z barokní kasule. Použitým barvivem je pravděpodobně kraplak.

Pro potřeby restaurátorů jsou výhodné neinvazivní nedestruktivní mikroskopické metody infračervené a Ramanovy spektroskopie, pomocí nichž, nejlépe jejich kombinací, lze identifikovat organická barviva také v urychleně stárnutých modelových vzorcích olejové malby. V modelových vzorcích barvených textilních vláken není identifikace barviv tak jednoznačná. V infračervené spektroskopii je identifikace ztížena spektrálním chováním matrice. V Ramanově mikrospektroskopii je naopak vliv matrice (polymerovaný olej, vlněná vlákna, běloby) nevýznamný. Pokud však organická barviva nevykazují Ramanovo spektrum, je nutno barvivo z textilního vlákna extrahovat a identifikovat pomocí destruktivních separačních metod, například tenkovrstvé chromatografie, kapilární zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie. Tyto metody jsou univerzální, vysoce účinné a lze jimi identifikovat jednotlivá barviva i ve směsi. Metoda MEKC je vhodná k přesné identifikaci všech studovaných barviv již o koncentracích řádově 0,1 $mg \cdot mL^{-1}$. MEKC lze také dle stanovených nečistot a příměsí použít k rozlišení přírodních a synteticky vyrobených barviv, či využít k potvrzení datace, lokace a pravosti uměleckých děl.

Výše uvedené závěry disertační práce tedy potvrzují využitelnost studovaných metod pro analýzu organických barviv, což je velmi přínosné především pro restaurátorskou praxi.

6 LITERATURA

1. Šimůnková, E.; Bayerová, T.: *Pigmenty*. Praha, STOP 1999. ISBN 80-902668-1-9
2. Čopíková, J.; Uher, M.; Lapčík, O.; Moravcová, J.; Dražar, P.: *Chem. Listy* **99**, 802-816 (2005).
3. Hřebíčková, B. A.: *Recepty starých mistrů aneb Malířské postupy středověku.* Brno, Computer Press 2006. ISBN 80-251-1025-7
4. Kopecká, I.: *Přehled přírodních barviv*. Státní restaurátorské ateliéry Praha. 1990
5. Hofenk de Graaff, J. H.; Roelofs, W. G. Th.; Bommel, M. R. van: *The Colourful Past: Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs*. Abegg-Stiftung (ISBN 3-905014-25-4) and Archetype Publications (ISBN 1-873132-13-1), 2004.
6. Green, C. L.: *Natural colourants and dyestuffs: Non-Wood Forest Products 4*. FAO, Rome (Italy). 1995 ISBN:92-5-103747-7. Dostupné na URL: http://www.fao.org/docrep/v8879e/v8879e05.htm (cit. 6.1.2011)
7. Rao, S. V.; Seshadri, T. R.: *Mathematics and statistics 26* (1947), 178-181.
8. Kalsbeek, N.: Studies in Conservation 50 (3), 205-229 (2005).
9. Grygar, T.; Kučková, Š.; Hradil, D.; Hradilová, J.: *Journal of Solid State Electrochemistry* **7**, 706-713 (2003).
10. Bechtold, T.; Fitz-Binder, C.; Turcanu, A.: *Dyes and Pigments* **87**, 194-203 (2010).
11. Robinson, E. A.; Earley, J. E.: *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* **58**, 62-70 (1993).
12. Bettinger, C., Zimmermann, H. W.: *Histochemistry* **95** (3), 279-288 (1991).
13. Kühlwein, F.; Polborn, K.; Beck, W.: *Z. anorg. allg. Chem.* **623**, 1931-1944 (1997).
14. Čechák, T.; Gerndt, J.; Musílek, L.; Kopecká, I.: *Radiation Physics and Chemistry* **61**, 717-719 (2001).
15. Čechák, T.; Gerndt, J.; Kopecká, I.; Musílek,L.: *Nucl. Instr. And Meth. In Phys. Res. B* **213**, 735-740 (2004).

16. Cui, J.; Li, Z. L.; Hong, X. Y.: *Acta Chimica Sinica* **62** (12), 1095-1100 (2004).
17. Singh, R.; Geetanjali; Chauhan, S. M. S.: *Chemistry and biodiversity* **1** (2004), 1241-1264
18. Tutem, E.; Apak, R.; Sozgen, K.: *J. Inorg. Biochem* **61** (2), 79-96 (1996).
19. Valla, V.; Bakola-Christianopoulou, M.; Kojic, V.; Bogdanovic, G.: *Synth. React. Inorg. Met. Org. Nano. Met. Chem.* **37** (1), 41-51 (2007).
20. Shamsipur, M.; Hemmateenejad, B.; Akhond, M.; Sharghi, H.: *Talanta* **54**, 1113-1120 (2001).
21. Wang, D.; Yang, G.; Song, X.: *Electrophoresis* **22**, 464-469 (2001).
22. Cho, S. H.; Huh, H.; Kim, H. M.; Kim, N. J.; Kim, S. K.: *Journal of Chemical Physics* **122**, 034305 (2005).
23. Cho, D. W.; Kim, S. H.; Yoon, M.; Jeoung, S. C.: *Chemical Physics Letters* **391**, 314-320 (2004).
24. Hovaneissian, M.; Archier, P.; Vieillescazsn, C.: *Dyes and Pigments* **74** (3), 706-712 (2007).
25. Ramakrishna, G.; Singh, A. K.; Palit, D. K.; Ghosh, H. N.: *J. Physic. Chem. B* **108** (5), 1701-1707 (2004).
26. Churchill, M. R.; Keil, K. M.; Bright, F. V.; Pandey, S., Baker, G. A.; Keister, J. B.: *Inorg. Chem.* **39** (25), 5807-5816 (2000).
27. Jacquemin, D.; Preat, J.; Charlot, M.; Wathelet, V.; André, J. M.; Perpète, E. A.: *Journal of Chemical Physics* **121** (4), 1736-1743 (2004).
28. Shang, X.; Yuan, Z.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**, 617-622 (2003).
29. Navaei, M. N.; Mirza, M.; Dini, M.: *Flavour Fragr. J.* **21**, 519-520 (2006).
30. Casas-Catalán, M. J.; Doménech-Carbó, M. T.: *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 259-268 (2005).
31. Přikryl, P.; Havlíčková, L.; Pacáková, V.; Hradilová, J.; Štulík, K.; Hofta. P.: *J. Sep. Sci.* **29**, 2653-2663 (2006).
32. Wyplosz N.: *Laser desorption mass spectrometric studies of artists´ organic pigments.* Amsterdam, MolArt 2003. ISBN 90-77209-02-6
33. Kučková, Š., Němec, I., Hynek, R., Hradilová, J., Grygar, T.: *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2), 275-282 (2005).

34. Ackacha, M. A.; Połeć-Pawlak, K.; Jarosz, M.: *J. Sep. Sci.* **26**, 1028-1034 (2003).
35. Bosáková, Z.; Peršl, J.; Jegorov, A.: *J. High Resol. Chromatogr.* **23** (10), 600-602 (2000).
36. Weng, W. C.; Sheu, S. J.: *J. High Resol. Chromatogr.* **23** (2), 143-148 (2000).
37. Novotná, P.; Pacáková, V.; Bosáková, Z.; Štulík, K.: *J. Chromatogr. A* **863**, 235-241 (1999).
38. Karapanagiotis, I.; Lakka, A.; Valianou, L.; Chryssoulakis, Y.: *Microchim. Acta* **160** (4), 477-483 (2008).
39. Sanyova, J.: *Microchim. Acta* **162** (3-4), 361-370 (2008).
40. Clementi, C.; Nowik, W.; Romani, A.; Cibin, F.; Favaro, G.: *Anal. Chim. Acta* **596** (1), 46-54 (2007).
41. Biesaga, M.; Wach, A.; Donten, M.; Maik, J.; Pyrzynska, K.: *Chem. Anal.-Warsaw* **51**, 251-265 (2006).
42. Watanabe, T.; Terabe, S.: *J. Chromatogr. A* **880**, 311-322 (2000).
43. Zhang, H. X.; Liu, M. C.: *J. Chromatogr. B* **812**, 175-181 (2004).
44. Li, F.; Cao, Q. E.; Ding, Z.: *Chromatographia* **59**, 753-757 (2004).
45. Koyama, J.; Morita, I.; Fujiyoshi, H.; Kobayashi, N.: *Chem. Pharm. Bull.* **53** (5), 573-575 (2005).
46. Tian, K.; Zhang, H.; Chen, X.; Hu, Z.: J. Chromatogr. A 1123, 134-137 (2006).
47. Koyama, J.; Morita, I.; Tagahara, K.; Bakari, J.; Aqil, M.: *Chem. Pharm. Bull.* **50** (8), 1103-1105 (2002).
48. Shang, X.; Yuan, Z.: *Anal. Lett.* **36** (1), 203-214 (2003).
49. Chai, Y. F.; Ji, S. G.; Wu, Y. T.; Liang, D. S.; Xu, Z. M.: *Biomed. Chromatogr.* **12**, 193-195 (1998).
50. Jinag, T. F.; Lv, Z. H.; Wang, Y. H.: *J. Sep. Sci.* **28**, 2225-2229 (2005).
51. Shang, X.; Yuan, Z.: *Anal. Lett.* **35** (1), 195-202 (2002).
52. Téllez, A.; Fuguet, E.; Rosés, M.: *J. Chromatogr. A* **1139**, 143-151 (2007).
53. Téllez, A.; Weiss, V. U.; Kenndler, E.: *Electrophoresis* **29**, 3916-3923 (2008).
54. Lin, C. E.; Lin, W. C.; Chiou, W.C.: *J. Chromatogr. A* **722**, 333-343 (1996).

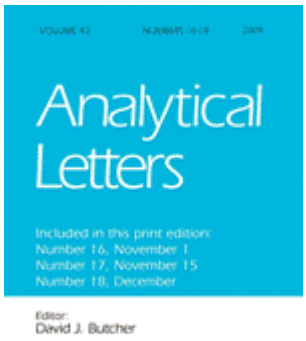
55. Téllez, A.; Kenndler, E.: *Electrophoresis* **30**, 357-364 (2009).
56. Sheu, S. J.; Chen, H. R.: *Analytica Chimica Acta* **309**, 361-367 (1995).
57. Puchalska, M.; Orlińska, M.; Ackacha, M. A.; Połeć-Pawlak, K.; Jarosz, M.: *J. Mass Spectrom.* **38**, 1252-1258 (2003).
58. Trojanowicz, M.; Wojcik, L.; Urbaniak-Walczak, K.: *Chemia Analityczna* **48** (3), 607-620 (2003).
59. Maguregui, M. I.; Alonso, R. M.; Barandiaran, M.; Jimenez, R. M.; García, N.: *J. Chromatogr. A* **1154**, 429-436 (2007).
60. Stefan, A. R.; Dockery, C. R.; Nieuwland, A. A.; Roberson, S. N.; Baguley, B. M.; Hendrix, J. E.; Morgan, S. L.: *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 2077-2085 (2009).
61. Algra, R. E.; Graswinckel, W. S.; Van Enckevort, W. J. P.; Vlieg, E.: *J. Crystal Growth* **285**, 168-177 (2005).
62. Ponomareva, N. I.; Poprygina, T. D.; Lesovoi, M. V. Karpov, S. I.: *Russ. J. Gen. Chem.* **78** (4), 521-526 (2008).
63. Moriguchi, T.; Yano, K.; Nakagawa, S.; Kaji, F.: *J. Colloid Interface Sci.* **260**, 19-25 (2003).
64. Marengo, E.; Liparota, M. C.; Robotti, E.; Bobba, M.: *Anal. Chim. Acta* **553**, 111-122 (2005).
65. Marengo, E.; Liparota, M. C.; Robotti, E.; Bobba, M.; Gennaro, M. C.: *Talanta* **66**, 1158-1167 (2005).
66. De Oliviera, L. F. C.; Edwards, H. G. M.; Velozo, E. S.; Nesbitt, M.: *Vibrational Spectroscopy* **28**, 243-249 (2002).
67. Holmgren, A.; Wu, L. M.; Forsling. W.: *Spectrochim. Acta A* **55**, 1721-1730 (1999).
68. Nevin, A.; Osticioli, I.; Anglos, D.; Burnstock, A.; Cather, S.; Castellucci, E.: *J. Raman Spectrosc.* **39**, 993-1000 (2008).
69. Doherty, B.; Miliani, C.; Berghe, I. V.; Sgamellotti, A.; Brunetti, B. G.: *J. Raman Spectrosc.* **39**, 638-645 (2008).
70. Cañamares, M. V.; Garcia-Ramos, J. V.; Gómez-Varga, J. D.; Domingo, C.; Sanchez-Cortes, S.: *Langmuir* **23** (9), 5210-5215 (2007).
71. Murcia-Mascarós, S.; Domingo, C.; Sanchez-Cortes, S.; Cañamares, M. V.; Garcia-Ramos, J. V.: *J. Raman Spectrosc.* **36**, 420-426 (2005).

72. Shadi, I. T.; Chowdhry, B. Z.; Snowden, M. J.; Withnall, R.: *J. Raman Spectrosc.* **35**, 800-807 (2004).
73. Chen, K.; Leona, M.; Vo-Dinh, K. C.; Yan, F.; Wabuyele, M. B.; Vo-Dinh, T.: *J. Raman Spectrosc.* **37**, 520-527 (2006).
74. Leona, M.; Stenger, J.; Ferloni, E.: *J. Raman Spectrosc.* **37**, 981-992 (2006).
75. Whitney, A. V.; Van Duyne, R. P.; Casadio, F.: *J. Raman Spectrosc.* **37**, 993-1002 (2006).
76. Whitney, A. V.; Casadio, F.; Van Duyne, R. P.: *Appl. Spectrosc.* **61** (9), 994-1000 (2007).
77. URL: http://www.irug.org
78. URL: http://www.ehu.es/udps/database/database.html
79. Stodůlková, E.; Kolařík, M; Křesinová, Z.; Kuzma, M.; Šulc, M.; Man, P.; Novák, P.; Maršík, P.; Landa, P.; Olšovská, J.; Chudíčková, M.; Pažoutová, S.; Černý, J.; Bella, J.; Flieger, M.: *Folia Microbiol.* **54** (3), 179-187 (2009)
80. De Santis, D.; Moresi, M.: *Industrial Crops and Products* **26**, 151-162 (2007).
81. Schweppe, H.: *Handbuch der Naturfarbstoffe – Vorkommmen – Verwendung – Nachweis.* Landsberg/Lach, Ecomed 1992. ISBN 3-609-65130-X
82. Kubešová, K.: *Separace anthrachinonů metodou kapilární elektroforézy*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra makromolekulární a fyzikální chemie. Praha 2007.
83. Petrášová, S.: *Tenkovrstvá chromatografie anthrachinonových barviv*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie. Praha 2009.
84. Sokrates, G.: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. London, Wiley 2001. ISBN 0-471-85298-8

PŘÍLOHA

PUBLIKACE I

Svobodová E., Bosáková Z., Lokajová J., Tesařová E., Coufal P.: Use of Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography for Separations of Anthraquinone Derivatives; LANL-2010-0677.R1, přijato k tisku 28.7.2010 časopisem *Analytical Letters* (volume 44, issue 10, 2011).



Use of Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography for Separations of Anthraquinone Derivatives

Journal:	*Analytical Letters*
Manuscript ID:	LANL-2010-0677.R1
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	20-Jul-2010
Complete List of Authors:	Svobodová, Eva; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Analytical Chemistry Bosáková, Zuzana; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Analytical Chemistry Lokajová, Jana; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Physical and Macromolecular Chemistry Tesařová, Eva; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Physical and Macromolecular Chemistry Coufal, Pavel; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Analytical Chemistry
Keywords:	CZE, MEKC, Hydroxy anthraquinones, Separation, Real sample analyses

SCHOLARONE™
Manuscripts

Use of Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Chromatography for Separations of Anthraquinone Derivatives

Eva Svobodová[1], Zuzana Bosáková[1,*], Jana Lokajová[2], Eva Tesařová[2], Pavel Coufal[1]

[1]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic;

E-mail: bosakova@natur.cuni.cz

[2]Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 2030, 128 43 Prague 2, Czech Republic

For Peer Review Only

Keywords

CZE, MEKC, Hydroxy anthraquinones, Separation, Quantitation, Real sample analyses

Abstract

The behavior of seven hydroxy anthraquinone derivatives was studied by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. The effects of buffer pH (6.5 – 10.8) and sodium dodecyl sulfate concentration (10 – 20 mmol L^{-1}) on the effective mobilities of the analytes and their separation were tested. A comparison of the two optimized separation systems showed that micellar electrokinetic chromatography was superior as it permits separation of all the seven analytes within 15 mins., using 15 mmol L^{-1} sodium dodecyl sulfate in 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer, pH 8.5, at a voltage of 20 kV. The calibration curves were linear in the concentration range from $5.0 \cdot 10^{-7}$ to $5.0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} for most of the analytes, at a detection wavelength of 254 nm. LOD and LOQ values of the analytes were in the ranges of $2.10 \cdot 10^{-7}$ - $1.28 \cdot 10^{-6}$ mol $L^{-1}$and $6.99 \cdot 10^{-7}$ - $4.25 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1}, respectively. The proposed separation conditions were applied to determination of 1,2-dihydroxy anthraquinone (alizarin) and 1,2,4-trihydroxy anthraquinone (purpurin) in *Rubia tinctorum* aglycone and of the recently described 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone and 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-anthraquinone in the mycelium of fungi *Geosmithia lavendula.*

For Peer Review Only

Introduction

Anthraquinone derivatives are produced by fungi, lichens, bacteria, plants or animals, especially by insects. Due to their wide applicability, e.g., in food and pharmaceutical industries, medicine, cosmetics, agriculture or dye industry, their separation is of special interest.

Reversed-phase high-performance liquid chromatography has been used for identification and quantitation of some hydroxy derivatives of anthraquinone (Weng and Sheu 2000; Hofenk de Graaff et al. 2004; Biesaga et al. 2006), laccaic acids (Novotná et al. 1999; Ackacha et al. 2003), and anthraquinone aglycones from *Rubia tinctorum* by Bosáková et al. (2000).

Electromigration methods, namely, capillary zone electrophoresis (CZE) (Weng and Sheu 2000; Tian et al. 2006) combined with UV/VIS and mass spectrometric (MS) detection (Weng and Sheu 2000; Puchalska et al. 2003; Watanabe and Terabe 2000; Trojanowicz et al. 2003) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) (Shang and Yuan 2002 and 2003), Ji et al. (1998), Jiang et al. (2005)) have been used for separation and identification of some hydroxy derivatives of anthraquinones. Some hydroxy anthraquinones and their glucosides have been separated using cyclodextrins as background electrolyte (BGE) additives (Koyama et al. (2005), Tian et al. (2006), Li et al. (2004)). To quantitate natural anthraquinones and natural pigments as foodstuff colorants, MEKC with MS detection has been used (Koyama et al. 2005; Watanabe and Terabe 2000; Maguregui et al. 2007). Recently, new polyhydroxy derivatives (tetra- and penta-) of anthraquinone have been found as secondary metabolites of fungi (Geosmithia) by Stodůlková et al. (2009). Capillary electrophoretic separations of these

For Peer Review Only

new derivatives, 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone and 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-anthraquinone, have not yet been published.

Some physico-chemical studies of anthraquinones (Shang and Yuan 2003, Shamsipur et al. 2001; Wang et al. 2001; Altria et al. 2006; Marsh and Altria 2006; Ryan et al. 2009, Jacquemin et al. (2004), Cho et al. (2005), Cho et al. (2004)) have also been carried out in attempts at predicting their electrophoretic behavior and simplifying optimization of the separation conditions.

This work is aimed at a comparison of separations of differently hydroxylated anthraquinones, namely, 1-hydroxy-9,10-anthraquinone, 2-hydroxy-9,10-anthraquinone, 1,2-dihydroxy-9,10-anthraquinone (alizarin), 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinone (quinizarin), 1,2,4-trihydroxy-9,10-anthraquinone (purpurin), 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone and 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-anthraquinone, by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. The influence of the background electrolyte pH and the surfactant concentration on the electrophoretic data has been examined. Under the optimized separation conditions, calibration has been performed and the limits of detection and quantitation have been determined. The method has been applied to real sample analyses.

Experimental

Chemicals

The analytes (see Table 1 for their chemical structures), 2-hydroxy-9,10-anthraquinone (**2-HA**), 1,2-dihydroxy-9,10-anthraquinone (**1,2-DHA**, alizarin), 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone (**tetra-HA**) and 1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxy-9,10-

For Peer Review Only

anthraquinone (**penta-HA**), were isolated at the Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, with a purity > 98.0% determined by HPLC (Bosáková et al. 2000; Stodůlková et al. 2009). A sample of 1-hydroxy-9,10-anthraquinone (**1-HA**) with a purity of 95.0% was obtained from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) and 1,4-dihydroxy-9,10-anthraquinone (**1,4-DHA**, quinizarin) and 1,2,4-trihydroxy-9,10-anthraquinone (**1,2,4-THA**, purpurin), with a purity > 95.0%, were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). A commercial sample of *Rubia tinctorum* aglycones, obtained from Timus Avid Co., Tehran, Iran (batch No. 11 703), and the mycelium of *Geosmithia lavendula* fungus, growing 10 days on malt agar slants, provided by the Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic (Stodůlková et al. (2009)), were used as the real samples.

For the preparation of the background electrolytes, disodium tetraborate decahydrate (p.a.), sodium dihydrogen phosphate (purity ≥ 99.0%) and disodium hydrogen phosphate (purity ≥ 99.0%) were supplied by Lachema (Brno, Czech Republic), sodium dodecyl sulfate (purity ≥ 95.0%) by Sigma-Aldrich, (Steinheim, Germany), sodium hydroxide (p.a.) by Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic) and hydrochloric acid (p.a.) by Penta (Prague, Czech Republic).

Thiourea (analytical grade purity) was purchased from Fluka and 1-[4-(phenylazo)phenylazo]-2-naphthol (Sudan III, purity ~ 90%) from Sigma-Aldrich. Methanol (MeOH, purity ≥ 99.9%) from Sigma-Aldrich was used to dissolve the analytes. The buffers were prepared using water purified by Rowapur and Ultrapur systems from Watrex (San Francisco, CA, USA).

For Peer Review Only

Instrumentation and measuring conditions

The CZE and MEKC measurements were carried out using the HP^{3D}CE system, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), with an inbuilt diode array detector, controlled by Chem-Station software (Agilent Technologies). The same software was used for data collection and processing. An uncoated fused-silica capillary CACO (Bratislava, Slovakia), total length 70.0 cm, 61.5 cm to the detector, 50 μm *i.d.*, was used for the CZE measurements. The separation voltage was set at 15 kV with the cathode located at the capillary outlet. The MEKC measurements were carried out with the same type of capillary, total length 70.0 cm, 61.5 cm length to the detector, 75 μm *i.d.* The separation voltage was 20 kV and the cathode was placed at the detector side. The samples were loaded hydrodynamically, 10 mbar for 15 s and 20 mbar for 5 or 3 s in the CZE and MEKC systems, respectively. The cassette temperature was set at 25 °C throughout the experiments. The detection signal was monitored at the wavelength of 254 nm.

The capillaries were conditioned daily by purging with deionized water (5 mins), then with 1 mol L^{-1} NaOH (10 mins), deionized water (5 mins) and finally with the running buffer (10 mins). The capillaries were flushed with 0.1 mol L^{-1} NaOH (2 mins), with deionized water (3 mins) and finally with the running buffer (3 mins) between consecutive analyses. Each analysis was repeated five times.

The electrolyte pH was measured using a PHM 220 instrument (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Methanolic solutions of the real samples were sonicated in Ultrasonic bath LC30H (P-Lab, Prague, CR) and filtered through a polypropylene syringe filter, pore size 0.2 μm (Whatman, NJ, USA). The UV spectra of the individual anthraquinones were measured using a Pye Unicam PU 8800 UV/VIS

For Peer Review Only

spectrophotometer (Philips, United Kingdom) in a wavelength range from 190 to 500 nm.

Since the pK_A and log *P* values of the studied derivatives are not available in the literature, they were calculated on the basis of their structures using the Pallas 3.0 software, CompuDrug International, Inc. (San Francisco, CA, USA) – see Table 1. Computer program PeakMaster (Jaroš et al. 2004; Štědrý et al. 2004) was used (i) to calculate the BGE composition and (ii) to simulate separations of the analytes based on their physico-chemical characteristics.

Standard solutions and buffers

Stock solutions of the individual anthraquinone derivatives were prepared in a concentration of 0.5 mmol L^{-1} in 90/10 BGE/MeOH (*v/v*). These solutions were stable for one month under refrigeration. The standard solutions were diluted with the BGE to an appropriate concentration before use. Thiourea (1.0 mg) in deionized water (1.0 mL) and Sudan III (0.35 mg) in MeOH (1.0 mL) were used as markers of the electroosmotic flow and the mobility of micelles, respectively. The BGEs for CZE were 10 mmol L^{-1} phosphate buffers of pH 7.6 and 6.6, and 10 mmol L^{-1} tetraborate buffers of various pH values ranging between 8.5 and 10.8. The required buffer compositions were calculated using the PeakMaster simulation program (Jaroš et al. 2004; Štědrý et al. 2004). The MEKC running electrolytes were prepared analogously, with additions of SDS to obtain 10, 15 and 20 mmol L^{-1} concentrations.

The stock solution of *Rubia tinctorum* aglycones was prepared by dissolution of 1.0 mg of the dried substance in 10.0 mL of MeOH. This solution was diluted four times in the BGE before MEKC analysis. Fungal biomass of *Geosmithia lavendula*, consisting

For Peer Review Only

mainly of spores, fungal debris and mycelium (130 mg), was diluted in 2 mL of MeOH, sonicated for 60 mins and then filtered through a 0.2 μm disc polypropylene filter prior to the MEKC analysis.

Results and discussion

Anthraquinone hydroxy derivatives can, in principle, be separated by both capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography. The effective mobilities in CZE depend on dissociation of the analyte hydroxyl groups (pK_A values). The dissociation can be affected by the buffer pH. In MEKC, the background electrolyte pH is less important, however, the effect of the analyte hydrophobicity (log *P* values) becomes significant.

Separation in CZE

The influence of the pH on the effective electrophoretic mobilities in CZE was monitored within the pH range from 6.6 to 10.8, using a phosphate buffer as the BGE for neutral region and a tetraborate buffer for alkaline region. The results are summarized in Table 2. **1-HA** and **1,4-DHA** derivatives are uncharged in neutral media (see Table 1) and this is reflected in their zero mobilities. The other derivatives are partially dissociated and their mobilities increase with increasing pH of the BGE until their hydroxyl groups are fully dissociated. The mobilities of **2-HA**, **1,2-DHA** and **1,2,4-THA** are similar in the tetraborate buffer due to the presence of the readily dissociating hydroxyl group on the second carbon atom (see Table 1). It is evident from Table 1 that the dissociation of the hydroxyl groups located close to the quinoid oxygen atoms requires a strongly alkaline medium because these groups are subject to

For Peer Review Only

intramolecular hydrogen bonding (Shamsipur et al. 2001; Cho et al. 2005; Cho et al. 2004). The lower effective mobilities of **1-HA** and **1,4-DHA** correlate with this fact. The estimated "limiting" mobility values for five analytes (**2-HA**, **1,2-DHA**, **1,2,4-THA**, **tetra-HA** and **penta-HA**) and the computed dissociation constants (Table 1) were employed in the PeakMaster simulation program (Jaroš et al. 2004; Štědrý et al. 2004) in order to predict the conditions for their separation (Fig. 1A). The experimental result obtained under the predicted conditions (Fig. 1B) demonstrates that the experimental migration times are in a good agreement with the simulation.

Separation in MEKC

In order to compare the behavior and the separation of anthraquinone hydroxy derivatives in non-micellar and micellar capillary electrophoretic systems, phosphate and tetraborate buffers were also used in MEKC as the BGEs. The micellar system was created by adding an anionic surfactant, SDS. The effects of the background electrolyte pH (6.5, 7.5, 8.5, 9.5 and 10.8) and the SDS concentration (10, 15 and 20 mmol L^{-1}) on the hydroxy anthraquinone pseudoeffective mobilities were examined and the results are given in Table 3. In BGEs with lower pH values, the analytes are uncharged or their charges are low and thus their incorporation into micelles is enhanced. With increasing pH, the analytes tend to be present in the aqueous phase where they move due to their mobilities (see Table 2). The comparison of the effective mobilities in the micellar and non-micellar systems (compare Tables 2 and 3) reflects the expected trend that analytes with lower hydrophobicities (**1,2,4-DHA**, **tetra-HA**, **penta-HA**) are less retained in micelles and thus their ionic mobilities represent a greater contribution to their overall mobilities and *vice versa*.

For Peer Review Only

On the basis of the results obtained it has been deduced that the MEKC system with 15 mmol L^{-1} SDS in 10 mM tetraborate buffer, pH 8.5 or 9.5, is preferable for complete separations of mixtures of hydroxy anthraquinones. The electropherograms obtained in these BGEs are given in Fig. 2. The separation of all the derivatives was better at pH 8.5 (Fig. 2A), when all the components were satisfactory resolved within 16 mins. The separation was accelerated (to 13 mins) at pH 9.5 (Fig. 2B), however, the resolution of peaks 4 to 6 deteriorated. It can also be seen that the migration order of peaks 2 and 3 changed on increasing the pH value.

Quantitation in MEKC

The separation efficiencies (expressed as the number of theoretical plates per meter of capillary, *N*/m) obtained for the individual derivatives in the optimized CZE and MEKC systems were in the range of 47000 - 112000 *N*/m and 89000 - 310000 *N*/m, respectively. These results confirmed that MEKC is superior for the separation and quantitation of the tested anthraquinones. Therefore, calibration curves for all the analytes were measured in MEKC under the optimized separation conditions. Linear calibration dependences were obtained within a concentration range of $1.0 \cdot 10^{-6}$ - $5.0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} for **1,4-DHA** and **1,2,4-THA** and $5.0 \cdot 10^{-7}$ - $5.0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} for the other derivatives. Measurements at each concentration level were repeated five times and the average values of the peak area were subjected to linear regression. The slopes, intercepts, their standard deviations and correlation coefficients are summarized in Table 4. The peak height vs. concentration dependences were treated by linear regression to determine the limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) for all the analytes, as the triple and ten-times noise levels, respectively (see Table 4). Repeatability of the migration times was investigated with individual analytes. The

For Peer Review Only

intra- and inter-day precision values, expressed as relative standard deviations (see Table 5) were in the range of 1.1 - 4.0 and 1.3 - 4.5%, respectively. The lowest values were obtained for **1-HA** , while **2-HA** yielded the highest ones.

Real sample analyses in MEKC

Applicability of the developed MEKC method to real sample analysis was examined on determination of hydroxy anthraquinones in a commercial sample of *Rubia tinctorum* and in the mycelium of *Geosmithia lavendula* growing on malt agar slants. The electropherogram obtained from *Rubia tinctorum* aglycones (Fig. 3) shows three peaks: peaks 1 and 2 correspond to **1,2-DHA** (alizarin), which is the main component of this plant, and **1,2,4-THA** (purpurin), respectively, the last peak was not identified. Identification of the analytes was carried out by spiking with pure standards. Quantitation of alizarin and purpurin was based on the linear calibration curves (see Table 4). The contents of alizarin and purpurin were determined in four independent analyses of *Rubia tinctorum.* The average values of alizarin and purpurin concentrations were 399 μmol L^{-1} (RSD = 4.0%) and 3.8 μmol L^{-1} (RSD = 1.5%), respectively. The analysis of a methanolic extract of the mycelium from *Geosmithia lavendula* is shown in Fig. 4. Peaks 1 and 2 correspond to **penta-HA** (1-acetyl-2,4,5,7,8-pentahydroxyanthraquinone) and **tetra-HA** (1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyanthraquinone), which represent the main metabolites produced by *Geosmithia lavendula*. Identification and quantitation of the analytes were performed in the same way as for *Rubia tinctorum.* The extract of the *Geosmithia lavendula* mycelium contained 31.5 μmol L^{-1} of **penta-HA** (RSD = 4.2%) and 5.0 μmol L^{-1} of **tetra-HA** (RSD = 4.0%). Recoveries (of the analytes found in the real samples) were

For Peer Review Only

determined at two concentration levels, $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol L^{-1} (1,2,4-THA and tetra-HA) and $1.0 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} (1,2-DHA and penta-HA), and calculated by comparing the peak areas of the analytes in the spiked methanolic extracts of the real samples and their standard solutions in methanol (four replicates). Comparable values of the recoveries of the individual analytes were obtained at both the concentration levels, i.e., 97.8% (RSD = 2.4%) for **1,2-DHA**, 91.6% (RSD = 6.0%) for **1,2,4-THA**, and 86.4% (RSD = 4.4%) for **penta-HA** and 85.7% (RSD = 5.3%) for **tetra-HA**. The lower recoveries of penta- and tetra-HA from the mycelium can be caused by a higher complexity of the matrix.

Conclusions

CZE and MEKC have been shown as methods suitable for separations of hydroxy anthraquinone derivatives. Under optimized conditions in CZE, only five from the seven studied hydroxy anthraquinones could be separated. On the other hand, optimization of the separation conditions is straightforward because the analytes are separated solely on the basis of their own mobilities and the separation can readily be predicted by the PeakMaster simulation program.

The effect of hydrophobicity of anthraquinones, which are uncharged at lower pH values, is decisive for their separation in MEKC. Another advantage of MEKC lies in a higher separation efficiency permitting easier quantitation.

Based on the results, an optimized method has been proposed for separation of hydroxy anthraquinone derivatives. Its applicability has been confirmed by the analyses of *Rubia tinctorum* and the mycelium of *Geosmithia lavendula* samples.

Acknowledgements

For Peer Review Only

The authors are grateful to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, projects MSM 0021620857 and RP 14/63, for financial and material support. ES thanks also the Grant Agency of the Charles University (Projects 69807 and SVV 261204) for financial support. ET and JL acknowledge CEEPUS project CII-HU-0010-01-1011.

For Peer Review Only

References

Ackacha, M. A., K. Połeć-Pawlak, and M. Jarosz. 2003. Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyestuffs by high performance liquid chromatography with ultraviolet and electrospray mass spectrometric detection. J. Sep. Sci. 26: 1028-1034.

Altria, K., A. Marsh, and C. Sänger-van de Griend. 2006. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. Electrophoresis 27: 2263-2282.

Biesaga, M., A. Wach, M. Donten, J. Maik, and K. Pyrzynska. 2006. Acidic hydrolysis and extraction of natural dyes present in plants and ancient textiles. Chem. Anal.-Warsaw 51: 251-265.

Bosáková, Z., J. Peršl, and A. Jegorov. 2000. Determination of lucidin in *Rubia tinctorum* aglycones by an HPLC method with isocratic elution. J. High Res. Chromatogr. 23: 600-602.

Hofenk de Graaff, J. H., W. G. Th. Roelofs, and M. R. van Bommel. 2004. The colourful past: origins, chemistry and identification of natural dyestuffs. Riggisberg, D: Abegg-Stiftung: 54 - 139

Cho, D. W., S. H. Kim, M. Yoon, and S. C. Jeoung. 2004. Transient Raman spectroscopic studies on the excited-state intramolecular reverse proton transfer in 1-hydroxyanthraquinone. Chem. Phys. Lett. 391: 314-320.

Cho, S. H., H. Huh, H. M. Kim, N. J. Kim, and S. K. Kim. 2005. Infrared-visible and visible-visible double resonance spectroscopy of 1-hydroxy-9,10-anthraquinone-$(H_2O)(n)$ (n=1,2) complexes. J. Chem. Phys. 122: 034305.

Jacquemin, D., J. Preat, M. Charlot, V. Wathelet, J. M. André, and E. A. Perpète. 2004. Theoretical investigation of substituted anthraquinone dyes. J. Chem. Phys. 121: 1736-1743.

Jaroš, M., V. Hruška, M. Štědrý, I. Zusková, and B. Gaš. 2004. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. Electrophoresis 25: 3080-3085.

Ji, S. G., Y. F. Chai, Y. T. Wu, X. P. Yin, Z. B. Xiang, D. S. Liang, Z. M. Xu, and X. Li. 1998. Separation and determination of anthraquinone derivatives in Rhubarb and its preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. Biomed. Chromatogr. 12: 335-337.

Jiang, T. F., Z. H. Lv, and Y. H. Wang. 2005. Separation and determination of anthraquinones in *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. J. Sep. Sci. 28: 2225-2229.

Koyama, J., I. Morita, H. Fujiyoshi, and N. Kobayashi. 2005. Simultaneous determination of anthraquinones, their 8-β-D-glucosides, and sennosides of Rhei rhizoma by Capillary Electrophoresis. Chem. Pharm. Bull. 53: 573-575.

For Peer Review Only

Li, F., Q. E. Cao, and Z. Ding. 2004. Separation and determination of five anthraquinones in Rheum and Rheum-containing preparations by capillary zone electrophoresis. Chromatographia. 59: 753-757.

Maguregui, M. I., R. M. Alonso, M. Barandiaran, R. M. Jimenez, and N. Garcia. 2007. Micellar electrokinetic chromatography method for the determination of several natural red dyestuff and lake pigments used in art work. J. Chromatogr. A 1154: 429-436.

Marsh, A. and K. Altria. 2006. Use of multiplexed CE for pharmaceutical analysis. Chromatographia 64: 327-333.

Novotná, P., V. Pacáková, Z. Bosáková, and K. Štulík. 1999. High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. J. Chromatogr. A 863: 235-241.

Puchalska, M., M. Orlińska, M. A. Ackacha, K. Połeć-Pawlak, and M. Jarosz. 2003. Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. J. Mass. Spectrom. 38: 1252-1258.

Ryan, R., S. Donegan, J. Power, E. McEvoy, and K. Altria. 2009. Recent advances in the methodology, optimisation and application of MEEKC. Electrophoresis 30: 65-82.

Shamsipur, M., B. Hemmateenejad, M. Akhond, and H. Sharghi. 2001. Quantitative structure–property relationship study of acidity constants of some 9,10-anthraquinone derivatives using multiple linear regression and partial least-squares procedures. Talanta 54: 1113-1120.

For Peer Review Only

Shang, X. and Z. Yuan. 2002. Separation of effective constituents form Rhubarb by micellar electrokinetic capillary chromatography. Anal. Letters 35: 195-202.

Shang, X. and Z. Yuan. 2003. Determination of active components in rhubarb and study of their hydrophobicity by micellar electrokinetic chromatography. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13: 617-622.

Stodůlková, E., M. Kolařík, Z. Křesinová, M. Kuzma, M. Šulc, P. Man, P. Novák, P. Maršík, P. Landa, J. Olšovská, M. Chudíčková, S. Pažoutová, J. Černý, J. Bella, and M. Flieger. 2009. Hydroxylated anthraquinones produced by Geosmithia species. Folia Microbiol. 54: 179-187.

Štědrý, M., M. Jaroš, V. Hruška, and B. Gaš. 2004. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: III Linear theory of electromigration. Electrophoresis 25: 3071-3079.

Tian, K., H. Zhang, X. Chen, and Z. Hu. 2006. Determination of five anthraquinones in medicinal plants by capillary zone electrophoresis with β-cyclodextrin addition. J. Chromatogr. A 1123: 134-137.

Trojanowicz, M., L. Wojcik, and K. Urbaniak-Walczak. 2003. Identification of natural dyes in historical Coptic textiles by capillary electrophoresis with diode array detection. Chem. Anal.-Warsaw 48: 607-620.

Wang, D., G. Yang, and X. Song. 2001. Determination of pKa values of anthraquinone compounds by capillary electrophoresis. Electrophoresis 22: 464-469.

Watanabe, T. and S. Terabe. 2000. Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A 880: 311-322.

For Peer Review Only

Weng, W. C. and S. J. Sheu. 2000. Separation of anthraquinones by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. J. High Res. Chromatogr. 23: 143-148.

For Peer Review Only

Captions for the Figures

Figure 1. Simulation (A) by the PeakMaster program (Jaroš et al. 2004; Štědrý et al. 2004) and experimental separation (B) of five hydroxyanthraquinones. Background electrolyte: 10 mmol L^{-1} phosphate buffer, pH 7.6. Total length of the fused silica separation capillary, 70.0 cm, length to the detector, 61.5 cm. Separation voltage, 15 kV.; wavelength 254 nm; **1**: 1,2-DHA; **2**: 1,2,4-THA; **3**: 2-HA; **4**: penta-HA and **5**: tetra-HA. For more details on the separation conditions see Experimental.

Figure 2. Electropherograms of the mixture of anthraquinones in a BGE composed of 15 mmol L^{-1} SDS in 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer, pH 8.5 (A) or pH 9.5 (B). **1**: 1,2-DHA, **2**: 1,2,4-THA, **3**: 2-HA, **4**: penta-HA, **5**: tetra-HA, **6**: 1-HA and **7**: 1,4-DHA. For more details on the separation conditions see Experimental.

Figure 3. An electropherogram of methanolic extract of *Rubia tinctorum* in 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer, pH 8.5 with 15 mmol L^{-1} SDS. **1**: 1,2-DHA, **2**: 1,2,4-THA;
* unknown peak. For more details on the separation conditions see Experimental.

Figure 4. An electropherogram of methanolic extract of mycelium from *Geosmithia lavendula* in 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer, pH 8.5, with 15 mmol L^{-1} SDS. **1**: penta-HA, **2**: tetra-HA. For more details on the separation conditions see Experimental.

For Peer Review Only

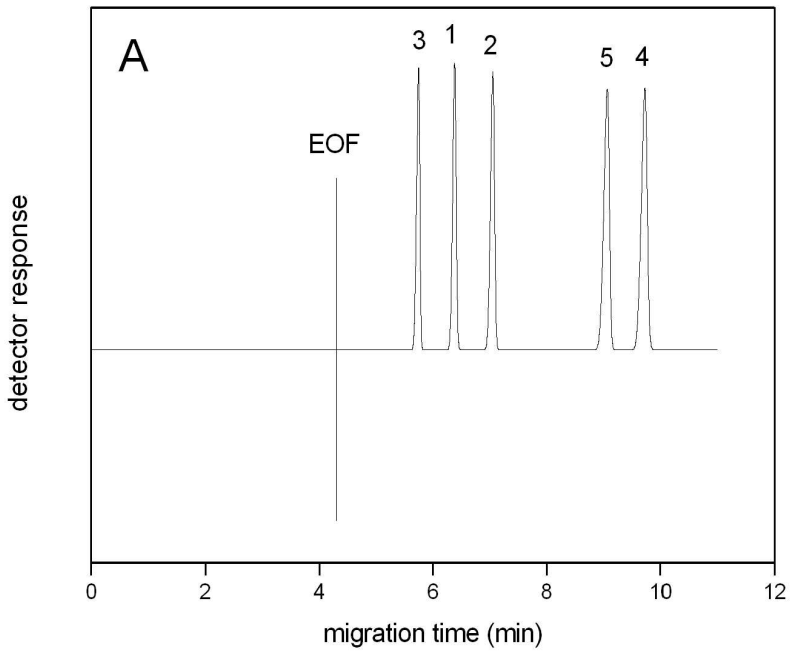


Fig.1A

279x215mm (150 x 150 DPI)

For Review Only

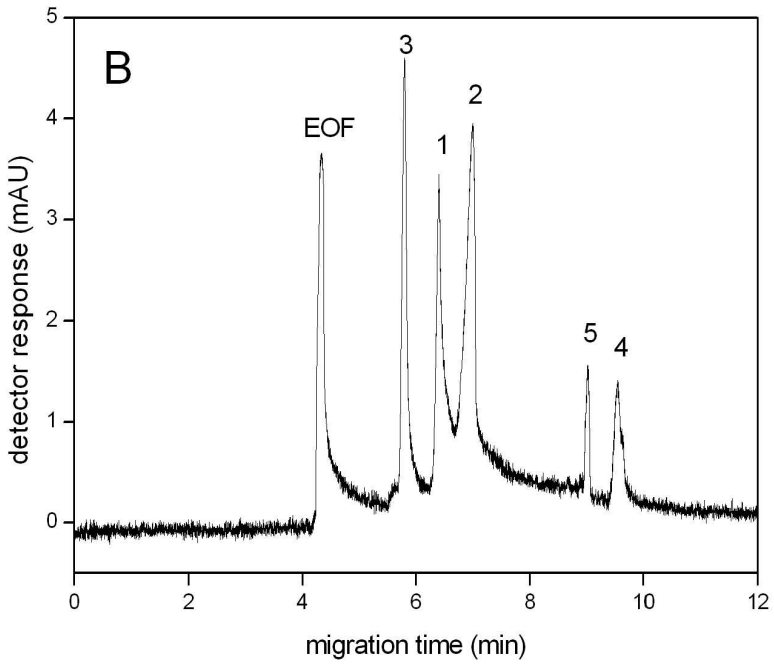


Fig.1B

279x215mm (150 x 150 DPI)

For Review Only

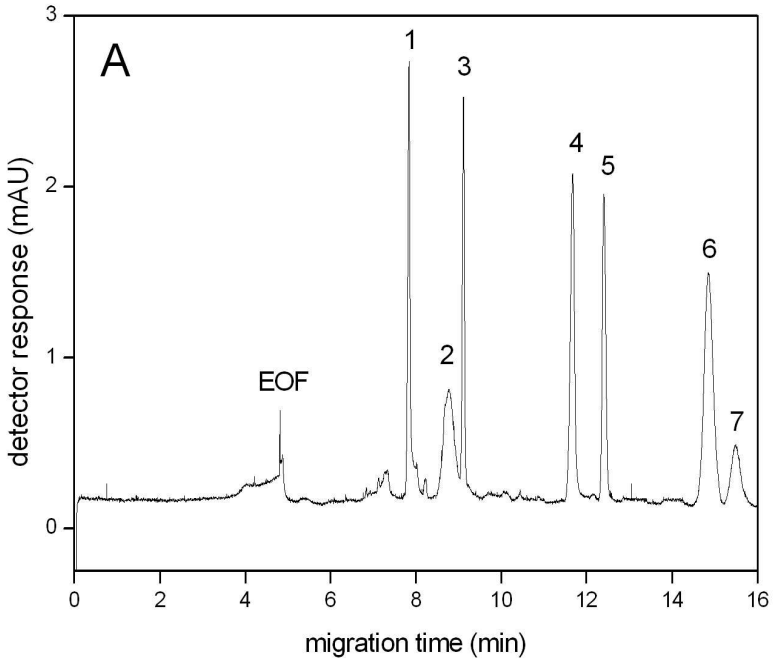


Fig.2A

279x215mm (150 x 150 DPI)

For Review Only

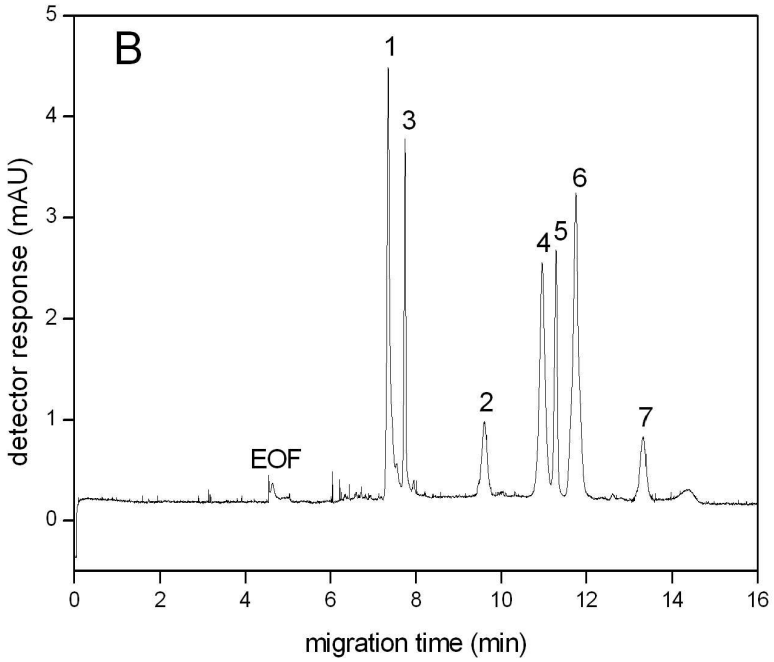


Fig.2B

279x215mm (150 x 150 DPI)

ew Only

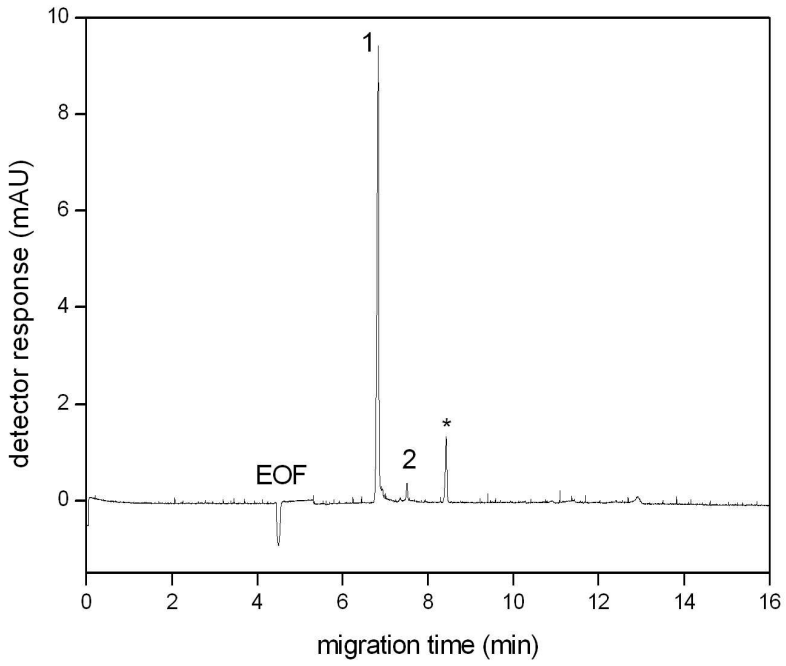


Fig.3

279x215mm (150 x 150 DPI)

For Review Only

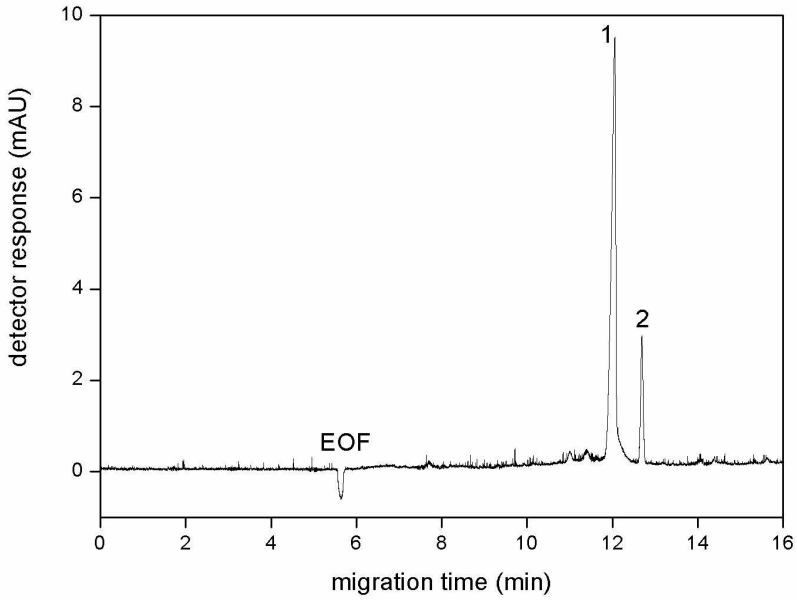
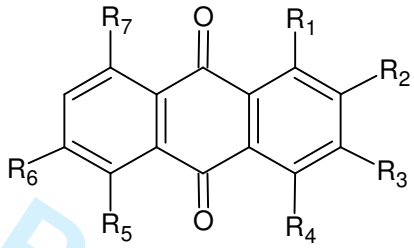


Fig.4

288x201mm (150 x 150 DPI)

View Only

Table 1. Molecular structures of the analytes and the calculated pK_A and log P values.



analyte	R_1	p$K_{A,1}$	R_2	p$K_{A,2}$	R_3	p$K_{A,3}$	R_4	p$K_{A,4}$	R_5	p$K_{A,5}$	R_6	p$K_{A,6}$	R_7	p$K_{A,7}$	log P
1-HA	OH	9.5	-		-		-		-		-		-		2.6
2-HA	-		OH	7.3	-		-		-		-		-		2.4
1,2-DHA	OH	11.9	OH	7.2	-		-		-		-		-		2.2
1,4-DHA	OH	9.1	-		-		OH	11.3	-		-		-		2.2
1,2,4-THA	OH	10.5	OH	7.0	-		OH	13.4	-		-		-		1.7
tetra-HA	OH	11.3	-		OH	5.4	$COCH_3$	-	-		OH	7.0	OH	9.2	1.1
penta-HA	OH	11.2	-		OH	5.3	$COCH_3$	-	OH	14.2	OH	6.9	OH	9.1	0.5

For Peer Review Only

Table 2. The effective electrophoretic mobilities of analytes at different pH values measured by CZE. BGE: 10 mmol L^{-1} phosphate buffer or 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer.

buffer	pH	μ_{eff} (10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1})						
		1-HA	2-HA	1,2-DHA	1,4-DHA	1,2,4-THA	tetra-HA	penta-HA
phosphate	6.6	0.00	-5.69	-13.59	0.00	-20.22	-23.94	-27.68
	7.6	0.00	-16.52	-21.43	0.00	-23.51	-33.27	-34.86
tetraborate	8.5	-2.96	-23.44	-22.00	-2.03	-23.70	-36.67	-34.91
	9.5	-10.56	-23.86	-21.89	-17.07	-23.73	-36.17	-34.69
	10.8	-19.89	-23.56	-22.29	-22.61	-24.10	-36.93	-34.35

For Peer Review Only

Table 3. The overall electrophoretic mobilities of analytes obtained in MEKC at different pH values and different concentrations of SDS. BGE: 10 mmol L^{-1} phosphate buffer (pH 6.5 - 7.5) or 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer (pH 8.5 – 10.8).

buffer	pH	μ_{eff} (10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1})						
		1-HA	2-HA	1,2-DHA	1,4-DHA	1,2,4-THA	tetra-HA	penta-HA
10 mM SDS	6.5	-39.59	-35.03	-34.81	-40.79	-30.53	-31.01	-31.43
	7.5	-38.63	-33.35	-30.71	-41.33	-27.80	-33.81	-35.26
	8.5	-40.18	-28.99	-23.13	-42.57	-28.90	-37.00	-38.23
	9.5	-36.35	-25.58	-23.24	-34.91	-30.17	-33.54	-34.22
	10.8	-28.85	-24.28	-24.15	-28.15	-33.94	-34.57	-34.62
15 mM SDS	6.5	-42.14	-40.60	-41.23	-43.86	-35.07	-37.28	-34.35
	7.5	-42.13	-39.15	-35.79	-44.16	-31.63	-30.50	-34.86
	8.5	-40.63	-29.11	-22.77	-42.94	-26.97	-38.41	-37.92
	9.5	-37.48	-25.47	-23.32	-35.32	-30.10	-34.95	-34.05
	10.8	-29.22	-24.17	-25.28	-28.33	-35.31	-35.08	-34.48
20 mM SDS	6.5	-43.34	-42.15	-42.25	-45.30	-37.89	-39.43	-38.60
	7.5	-43.33	-41.60	-39.73	-44.88	-29.77	-34.49	-35.43
	8.5	-43.21	-29.31	-23.17	-44.21	-29.10	-39.57	-38.91
	9.5	-39.06	-25.89	-23.39	-37.79	-32.21	-33.30	-33.95
	10.8	-29.70	-25.07	-25.10	-28.53	-35.43	-34.95	-34.84

For Peer Review Only

Table 4. Parameters of the calibration lines (peak area against molar concentration) with standard deviations (SD) in parentheses, correlation coefficients (R). Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the analytes calculated from the dependencies of peak height versus analyte concentration. BGE: 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer pH 8.5 with 15 mmol L^{-1} SDS, hydrodynamic injection 20 mbar for 5 s, separation voltage 20 kV, detection 254 nm.

analyte	Slope (SD) (AU s L mol^{-1})	Intercept (SD) (10^{-3} AU s)	R	LOD (mol L^{-1})	LOQ (mol L^{-1})
1-HA	674 (75)	11 (4.0)	0.9818	$5.0 \cdot 10^{-7}$	$1.7 \cdot 10^{-6}$
2-HA	1813 (55)	4 (0.9)	0.9986	$2.2 \cdot 10^{-7}$	$7.4 \cdot 10^{-7}$
1,2-DHA	381 (12)	5 (0.6)	0.9984	$4.0 \cdot 10^{-7}$	$1.3 \cdot 10^{-6}$
1,4-DHA	645 (57)	10 (3.4)	0.9923	$1.3 \cdot 10^{-6}$	$4.3 \cdot 10^{-6}$
1,2,4-THA	704 (25)	5 (1.3)	0.9981	$1.2 \cdot 10^{-6}$	$3.9 \cdot 10^{-6}$
tetra-HA	1898 (63)	14 (3.4)	0.9983	$4.2 \cdot 10^{-7}$	$1.4 \cdot 10^{-6}$
penta-HA	2144 (149)	8 (1.9)	0.9928	$2.1 \cdot 10^{-7}$	$7.0 \cdot 10^{-7}$

For Peer Review Only

Table 5. The intra- and inter-day precision values (expressed as relative standard deviations, RSD) of effective electrophoretic mobilities (n = 6) of all samples. BGE: 10 mmol L^{-1} tetraborate buffer, pH 8.5, with 15 mmol L^{-1} SDS, hydrodynamic injection 20 mbar for 5 s, separation voltage 20 kV, detection 254 nm.

analyte	1-HA	2-HA	1,2-DHA	1,4-DHA	1,2,4-THA	tetra-HA	penta-HA
intra-day RSD, %	1.1	4.0	1.2	1.2	1.4	1.2	1.7
inter-day RSD, %	1.3	4.5	1.5	1.4	1.7	2.2	2.4

n - number of measurements

For Peer Review Only

PUBLIKACE II

Svobodová E., Bosáková Z.: Micellar Electrokinetic Chromatography of Natural Organic Dyes; In: *Proceedings,* 6th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha 2010, str. 87-91, ISBN 978-80-7444-005-2

Micellar Electrokinetic Chromatography of Natural Organic Dyes

Eva Svobodová, Zuzana Bosáková

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic, ✉ *svobod15@natur.cuni.cz*

Abstract

World of colours goes with human population since ancient time. People use natural dyes for the paints and textile dyeing or making of organic pigments and lakes. Natural organic dyes are extracted from plants and animals. They contain various organic compounds which are typical for locality and climatic conditions of their origin. Their main colouring substances are structurally very similar and thus separation methods are used for their identification. Micellar electrokinetic chromatography has a power to resolve the dyestuffs from their complex matrix with high separation efficiency. The effects of buffer pH (6.5–10.8) and sodium dodecyl sulfate concentration (0.01–0.02 mol L^{-1}) on the effective mobilities of the analytes and their identification were tested. Micellar electrokinetic chromatography permits separation of all the analytes within 16 min, using 0.015 mol L^{-1} sodium dodecyl sulfate in 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffer, pH = 8.5, at a voltage of 20 kV. Although this technique belongs to destructive methods, it allows to identify organic dyes more accuraly than any of non-destructive methods.

Keywords
identification
MEKC
organic dyes

1. Introduction

Natural organic dyes are wide used to prepare organic pigments, lakes and textil dyeing. For textil dyeing the dyestuffs are extracted from plants or animal bodies (especially insects), flushed in baths and precipitated on inorganic medium. Plants and animals living at different climate and geographic ground contain particular organic and inorganic substances. Identification of these unique substances is important for restorers, as well as for verification of the authenticity of works of art. So, the development of the analytical methods is of great interest.

The natural organic dyestuffs contain so called main colouring components which are responsible for colour of each dye. The main colouring components mostly belong to derivatives of indole (blue tones), phenol (yellow tones) and quinone (red tones) [1–3]. Their chemical structures are very similar in the same group of derivatives (Fig.1). Therefore the high-efficiency methods are needed for their separation and identification.

The main scope of this paper is optimization of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) for identification of chosen natural organic dyes, namely acaroid, brazilwood, dragon's blood, kamala, logwood, cochineal, madder and lac-dye.

The most of chosen natural organic dyes belong to group of mordant dyes. The mordant dyes constitute a class of dyes according to technique of textile dyeing.

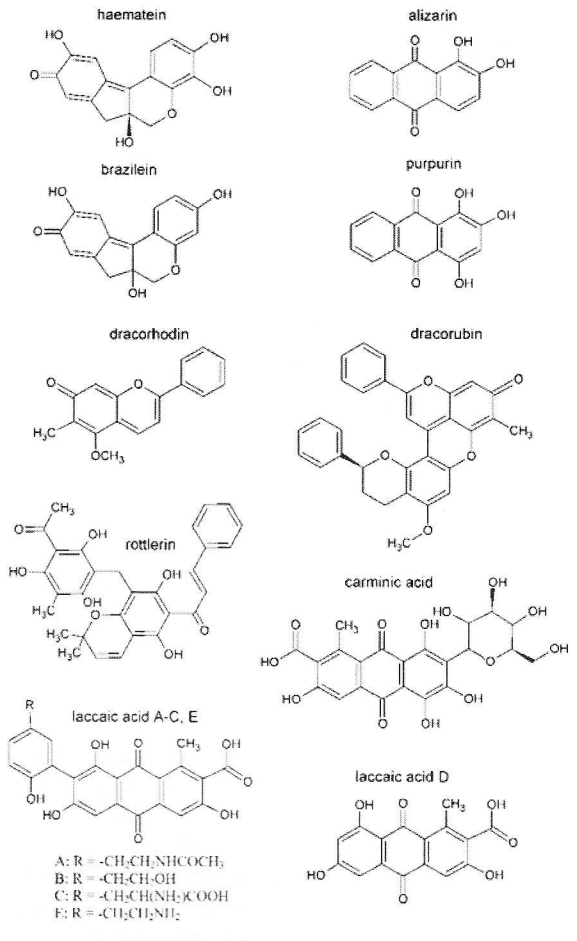


Fig. 1. Chemical structures of known main colouring matters of chosen organic dyes.

The textile fibres must be first mordanted by salt of multivalent ion of metal known as mordant. It is in effect an adsorption bond of metal ion into the fibre structure. After that the mordant dyes create the insoluble colourful complex with metal ion, known as lake. Acaroid and brazilwood belong to resin dyes. The main colouring component of brazilwood is brazilein. Brazilein's structural homologous is haematein which is a main colouring matter of dye logwood. The dye dragon's blood contains resins, tanstuffs and main colouring compounds which are derivatives of pyrrole dracorhodin and dracorubin. Rottlerin is a main colouring matter of dye kamala. Other quinone derivatives alizarin and purpurin are responsible for colourful tone of dye called madder or krapp. Alizarin and purpurin are homologues differing in number and position of hydroxyl groups (Fig.1). Carminic acid and laccaic acid are derivatives of anthraquinone, too and are prepared from dried bodies of insect. Carminic acid is main colouring compound of the dye cochineal. Laccaic acid contained in dye called lac-dye occurs in five forms marked as A to E (see Fig.1). The laccaic acid A is the majority form of laccaic acid. The chemical structures of main colouring compounds of chosen natural organic dyes are shown in Fig.1. [1, 4, 5].

2. Experimental

2.1. Chemicals

The analytes 1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxy-9,10-anthraquinone (tetra-HA), 1-acetyl-2,4,5,7,8-penta-hydroxy-9,10-anthraquinone (penta-HA) and 1,2-di-hydroxy-9,10-anthraquinone (alizarin), were isolated at the Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic with a purity > 98.0% determined by HPLC [6, 7]. 1,2,4-trihydroxy-9,10--anthraquinone (purpurin) with a purity > 95.0% were obtained from Fluka (Switzerland). The other standards of colouring main compounds of dyes, carmine, carminic acid, laccaic acid, haematein and rottlerin were obtained from Sigma-Aldrich, Germany. The dyes acaroid, kamala and madder were obtained from Kremer Pigmente (Germany). The dyes dragon's blood and cochineal (dried abdomens of *Coccus cacti*) were purchased from Sandragon (Czech Republic). Other dyes brazilwood, logwood and lac-dye were donated by Department of Chemical Technology of Monuments Conservation, ICT Prague.

For the preparation of the background electrolytes, disodium tetraborate decahydrate (p.a.), sodium dihydrogenphosphate (purity ≥ 99.0%) and disodium hydrogenphosphate (purity ≥ 99.0%) were supplied by Lachema (Czech Republic), sodium dodecyl sulfate (SDS, purity ≥ 95.0%) by Sigma-Aldrich (Germany), sodium hydroxide (p.a.) by Lach-Ner (Czech Republic) and hydrochloric acid (p.a.) by Penta (Czech Republic). Methanol (MeOH, purity ≥ 99.9%) from Sigma-Aldrich was used to dissolve the analytes. The buffers were prepared using water purified by Rowapur and Ultrapur systems from Watrex (San Francisco, CA, USA).

2.2. Instrumentation

The electrophoretic measurements were carried out on HP^{3D}CE with diode-array detector (Agilent Technologies, Germany) and PrinCE 250 auto-sampler (PrinCE Technologies B.V., Netherlands) with UV/Vis detector Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). The fused-silica capillary from CACO (Slovak Republic) was used for experiments. The parameters of capillary were: i.d. = = 75 μm or 50 μm, o.d. = 380 μm, length to the detector 55.8 cm and total length of capillary 70 cm. The capillary was every morning flushed by deionized water (5 min), 1 mol L^{-1} NaOH (10 min), deionized water again (5 min) and background electrolyte (BGE) for 10 min. During the analysis the capillary was flushed by 1 mol L^{-1} NaOH (2 min), deionized water (3 min) and BGE (3 min). The measurements were carried out at temperature about 25 °C with hydrodynamically injection of 20–30 mbar for 5 s, at separation voltage of +20 kV and detection at wave-length of 254 nm. Each analysis was repeated three times. The PHM 220 instrument (Radiometer, Denmark) was used for measuring of the electrolyte pH. Methanolic solutions were sonicated in Ultra-sonic bath LC30H (P-Lab, Czech Republic) and filtered through a polypropylene syringe filter with pore size of 0.2 μm (Whatman, USA).

2.3. Standard Solutions and Buffers

The alizarin, purpurin, tetra-HA and penta-HA were dissolved in MeOH to obtain concentration of 0.1×10^{-3} mol L^{-1}. Standard solutions of individual dyes acaroid, brazilwood, dragon's blood, logwood, kamala and lac-dye were prepared as saturated solutions in MeOH. Analogously haematein, rottlerin, carmine, carminic acid and laccaic acid were saturated in MeOH. The solutions of analytes were sonicated for 60 mins and then filtered through a 0.2 μm disc polypropylene filter prior to the analysis. The standard solutions were diluted with MeOH to an appropriate concentration before use. The BGEs were 0.01 mol L^{-1} phosphate buffers of pH = 7.6 and 6.6,

and 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffers of various pH values ranging from 8.5 to 10.8 with addition of SDS to obtain 0.010, 0.015 and 0.020 mol L^{-1} concentrations.

3. Results and Disscusion

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) serves first of all to separation of charged and uncharged molecules, as well. The separation of these hydrophobic molecules is based on different distribution coefficients between water and pseudo-stationary phase. This phase is created by micelles. According to the chemical structures of analytes, the BGE of alkaline pH values are needed. At this high pH value, the separated analytes are dissociated and carry a negative charge. However natural organic dyestuffs contain a lot of hydrophobic uncharged substances and are often insoluble in aqueous buffers. Due to this fact, the addition of sodium dodecyl sulphate (SDS) into BGEs could increase the solubility of analytes in BGE and improve the separation of uncharged molecules.

The four homologous derivatives of anthraquinone alizarin, purpurin, tetra-HA and penta-HA were chosen to obtain optimized conditions of MEKC separation. The effects of pH values of 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer and 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffer in a range of 6.5–10.8 and sodium dodecyl sulfate concentration (0.01–0.02 mol L^{-1}) on speed and efficiency of separation were tested. The obtained pseudoeffective mobilities are presented in the Table 1.

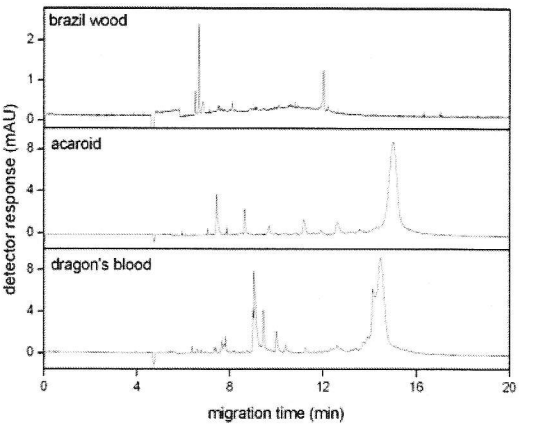


Fig. 2. The electrophoreograms of dyes brazilwood, acaroid and dragon's blood under optimized conditions: 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffer, pH = 8.5 and addition of 0.015 mol L^{-1} SDS, hydrodynamically injection 20 mbar (in case of dragon's blood 30 mbar) for 5 s, voltage 20 kV and detection at 254 nm.

According to speed of analysis, high separation efficiency and resolution of studied analytes, the 0.010 mol L^{-1} tetraborate buffer with pH = 8.5 and addition of 0.015 mol L^{-1} SDS was chosen as the optimized BGE. These optimized conditions with hydrodynamic injection 20 or 30 mbar for 5 s, voltage 20 kV and detection at 254 nm were applied on separation and the electrophoretic behaviour of chosen natural organic dyes. At the same conditions, the electrophoreograms of commercially available main colouring compounds were obtained to identify and verify the majority peaks in the electrophoreograms of each dye. In the Fig. 2, there

Table 1
The overall electrophoretic mobilities of analytes obtained in MEKC at different pH values and different concentrations of SDS. Background electrolyte: 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffer (pH = 8.5–10.8) or 0.01 mol L^{-1} phosphate buffer (pH = 6.5–7.5).

c(SDS) [mol L^{-1}]	pH	μ_{eff} (10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1})			
		alizarin	purpurin	tetra-HA	penta-HA
0.020	10.8	–25.10	–35.43	–34.95	–34.84
	9.5	–23.39	–32.21	–33.30	–33.95
	8.5	–23.17	–29.10	–39.57	–38.91
	7.5	–39.73	–29.77	–34.49	–35.43
	6.5	–42.25	–37.89	–39.43	–38.60
0.015	10.8	–25.28	–35.31	–35.08	–34.48
	9.5	–23.32	–30.10	–34.95	–34.05
	8.5	–22.77	–26.97	–38.41	–37.92
	7.5	–35.79	–31.63	–30.50	–34.86
	6.5	–41.23	–35.07	–37.28	–34.35
0.010	10.8	–24.15	–33.94	–34.57	–34.62
	9.5	–23.24	–30.17	–33.54	–34.22
	8.5	–23.13	–28.90	–37.00	–38.23
	7.5	–30.71	–27.80	–33.81	–35.26
	6.5	–34.81	–30.53	–31.01	–31.43

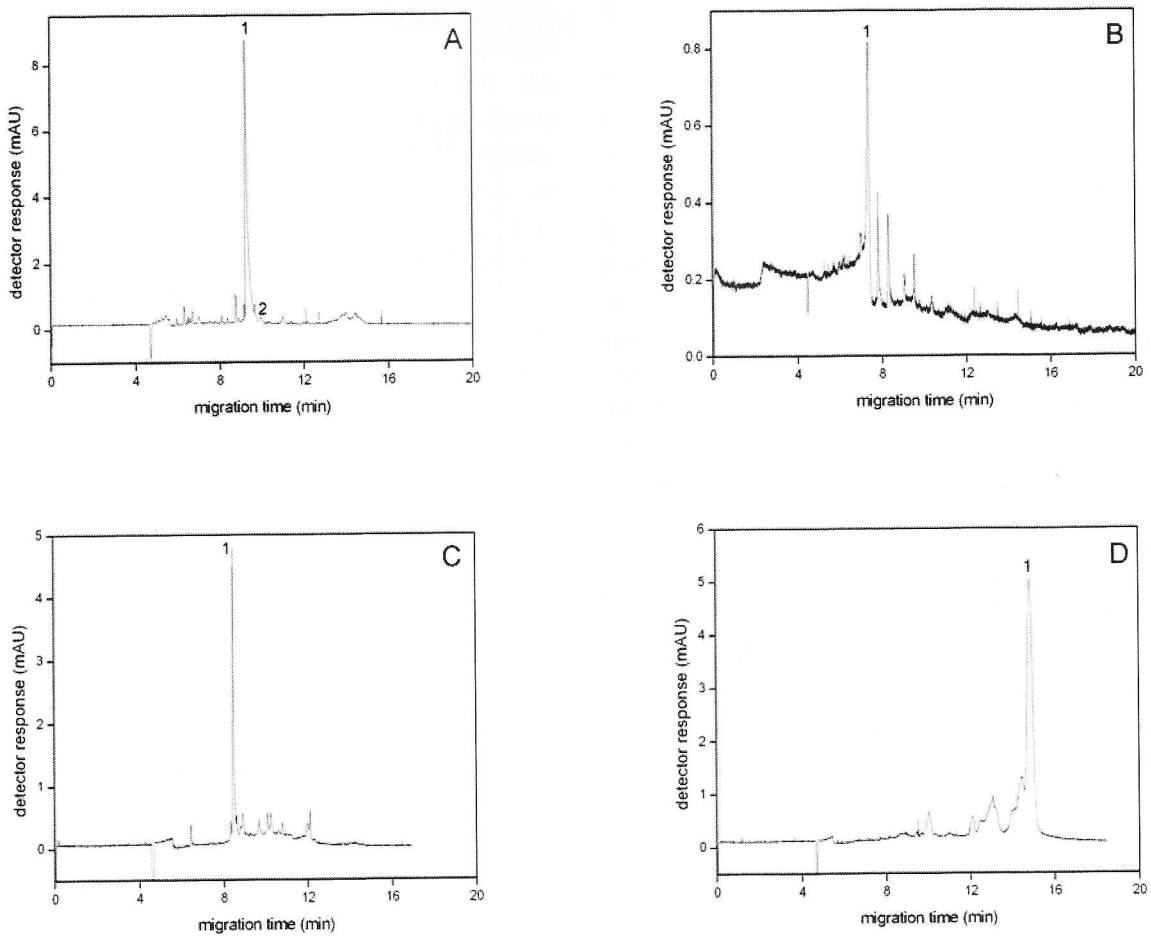


Fig. 3. The electrophoreograms of four dyes: (A) cochineal with main colouring compounds carminic acid (1) and carmine (2); (B) madder with main colouring compound alizarin (1); (C) logwood with main colouring compound haematein (1); and (D) kamala with rottlerin (1) as its main colouring compound. The separation conditions were 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffer, pH = 8.5 and addition of 0.015 mol L^{-1} SDS, hydrodynamically injection 20 mbar for 5 s, voltage 20 kV and detection at 254 nm.

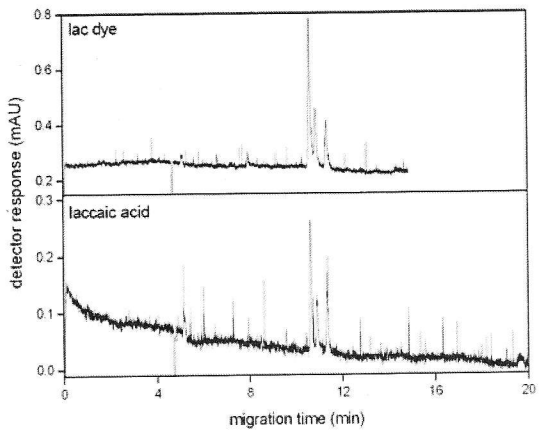


Fig. 4. The electrophoreogram of the dye lac-dye and its main colouring component laccaic acid which coexists in up to five forms A–E. The separation conditions were 0.01 mol L^{-1} tetraborate buffer, pH = 8.5 and addition of 0.015 mol L^{-1} SDS, hydrodynamically injection 20 mbar for 5 s, voltage 20 kV and detection at 254 nm.

are presented resins dyes acaroid and dragon's blood which are very similar and almost undistinguishable by infrared spectroscopy and TLC analysis. Their standards are not available, similarly to main colouring matter of brazilwood (Fig.2).

For other remaining dyes, i.e. kamala, logwood, lac-dye, madder and cochineal, the standards of main colouring components were available. Therefore, the majority peaks in electrophoreograms of each dye were verified by measurement of single main colouring component and its addition into solution of related dye, as well. In Fig. 3, MEKC analysis of dyes kamala, logwood, cochineal and madder are shown. The dye lac-dye contains three intensive peaks in its electrophoreo-gram which correspond to three peaks shown in MEKC analysis of commercially obtained standard laccaid acid (Fig. 4). To identify the three laccaic acids forms, a combination with the mass spectroscopy is necessary.

4. Conclusions

The MEKC method is useful for reliable identification of all studied natural organic dyes at concentrations higher than 0.1 mg mL^{-1}. The optimized conditions of separation of alizarin, purpurin, tetra-HA and penta-HA were found and applied to separate of natural organic dyes. The optimized separation conditions are 0.010 mol L^{-1} tetraborate buffer, pH = 8.5 with 0.015 mol L^{-1} SDS, hydrodynamical injection of 20 mbar for 5 s, separation voltage 20 kV and detection at wavelength 254 nm.There are some disadvantages of MEKC method, i.e. low solubility of studied dyes in MeOH and aqueous buffers, or destruction of sample. Therefore, non-destructive spectroscopic methods are often used. In contrary to them, MEKC makes possible to distinguish the resin dyes acaroid and dragon's blood due to the MEKC high separation efficiency. And moreover, there is a possibility of mass spectroscopy detection needed to determine a structure form of laccaic acid.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Grant Agency of Charles University (project SVV 261204) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (projects MSM 0021620857 and RP 14/63).

References

[1] Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Drašar P.: *Chem. Listy* **99** (2005), 802–816.

[2] Hofenk de Graaff J. H., Roelofs W. G. T., Van Bommel M. R.: *The Colourful Past. Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs.* Riggisberg, Abegg-Stiftung 2004.

[3] Wyplosz N.: *Laser Desorption Mass Spectrometric Studies of Artists' Organic Pigments.* Amsterdam, MolArt 2003.

[4] Šimůnková E., Bayerová T.: *Pigmenty.* Praha, STOP 1999.

[5] Hřebíčková B. A.: *Recepty starých mistrů aneb Malířské postupy středověku.* Brno, Computer Press 2006.

[6] Bosáková Z., Peršl J., Jegorov A.: *J. High Res. Chromatogr.* **23** (2000), 600–602.

[7] Stodůlková E., Kolařík M., Křesinová Z., Kuzma M., Šulc M., Man P., Novák P., Maršík P., Landa P., Olšovská J., Chudíčková M., Pažoutová S., Černý J., Bella J., Flieger M.: *Folia Microbiol.* **54** (2009), 179–187.

PUBLIKACE III

Svobodová E., Ohlídalová M., Novotná M., Bosáková Z.: Srovnání separačních a spektroskopických technik pro identifikaci organických barviv; In: *Sborník z Konference konzervátorů-restaurátorů Uherské Hradiště 2010*, Technické muzeum v Brně, Brno 2010, str. 98-103, ISBN 978-80-86413-72-3

Srovnání separačních a spektroskopických technik pro identifikaci organických barviv

Eva Svobodová[1], Martina Ohlídalová[2], Miroslava Novotná[2], Zuzana Bosáková[1]

[1] Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
[2] Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta chemické technologie, Praha – Centrální laboratoře

svobod15@natur.cuni.cz

Abstrakt

Organická přírodní barviva jsou využívána především k tvorbě organických pigmentů, laků a barvení textilu. Jsou extrahována z rostlin a živočichů a dle jejich lokality a klimatických podmínek barviva obsahují rozmanité organické sloučeniny, které jsou pro ně typické. Tyto látky jsou si strukturně velmi blízké a pro jejich identifikaci se využívají přednostně spektroskopické a separační analytické techniky. Metody infračervené spektroskopie a Ramanovy spektroskopie sice vynikají přenosností a nedestruktivitou, ale charakteristické pásy samotných barviv jsou často překrývány pásy podkladových materiálů a barviv z jiných vrstev, což ztěžuje vlastní vyhodnocení naměřených spekter. Separační techniky jako tenkovrstvá chromatografie, zónová kapilární elektroforéza či micelární elektrokinetická chromatografie jsou oproti tomu destruktivní metody, ale s vysokou separační účinností oddělí barvivo od podkladových materiálů a příměsí. Toho lze využít pro přesnou identifikaci barviv.

The Comparison of Separation and Spectroskopic Techniques for the Identification of Organic Dyes

Abstract

Natural organic dyes are used primarily for the production of organic pigments, paints and textile dyeing or as lakes (insoluble form). These dyes are extracted from plants and animals and contain various organic compounds which are typical for locality and climatic conditions of their origin. These substances are structurally very similar and thus for their identification, analytical separation and spectroscopic techniques are used. Methods such as Raman or IR spectroscopy are outstanding in their non-destructivity and accuracy, but vibration bands of individual dyes could be overlapped by vibration band matrixes. Separation techniques such as thin layer chromatography, capillary zone electrophoresis, and micellar electrokinetic chromatography are considered to be destructive methods, but they have a power to resolve the dyes from their matrix with high separation efficiency. This could be used for precise identification of dyes.

Úvod

Přírodní červená organická barviva jsou díky své barevnosti a nerozpustnosti ve vodě hojně využívána především ke tvorbě organických pigmentů a laků, převážně pak k barvení mořeného textilu. Pro barvení je potřeba přírodní barvivo extrahovat z rostlin či živočichů a následně vysrážet na vhodný anorganický substrát. Podle lokality a klimatických podmínek, ve kterých se hmyz a rostliny vyskytovaly, přírodní barviva obsahují rozmanité organické sloučeniny, které jsou pro ně typické. Toho se využívá při potvrzování pravosti, datace a místa vzniku uměleckých děl. Postupem času tyto látky degradují a následně vyžadují konzervátorský či restaurátorský zásah restaurátora, pro nějž je podstatná nejen identifikace pojivových látek, ale i použitých barev. Proto je vývoj analytických metod pro identifikaci barviv důležitý.

Organická přírodní barviva jsou převážně deriváty indolu (modré odstíny), fenolu (žluté odstíny) či chinonu (červené odstíny) [Čopíková et al., 2005]. Jednotlivá barviva mají velmi podobnou strukturu, a proto se k jejich identifikaci vyžadují účinné separační techniky. Tyto metody ale vyžadují odběr vzorku a jsou převážně destruktivní, neboť k jejich použití je většinou nezbytné převést vzorek do roztoku. Vzhledem k nedestruktivnosti jsou v popředí zájmu spektroskopické metody, které jsou dostatečně citlivé a umožňují identifikaci barviv přímo *in situ*.

Cílem této práce byla optimalizace a kritické porovnání separačních metod (tenkovrstvá chromatografie – TLC, kapilární zónová elektroforéza – CZE a micelární elektrokinetická chromatografie – MEKC) a metod spektroskopických (infračervená spektroskopie – IR a Ramanova spektroskopie). Metody byly optimalizovány pro identifikaci vybraných přírodních převážně červených organických barviv, jmenovitě akaroidu, brazilu, dračí krve, kamaly, kampešky, košenily, kraplaku, laky a santalu.

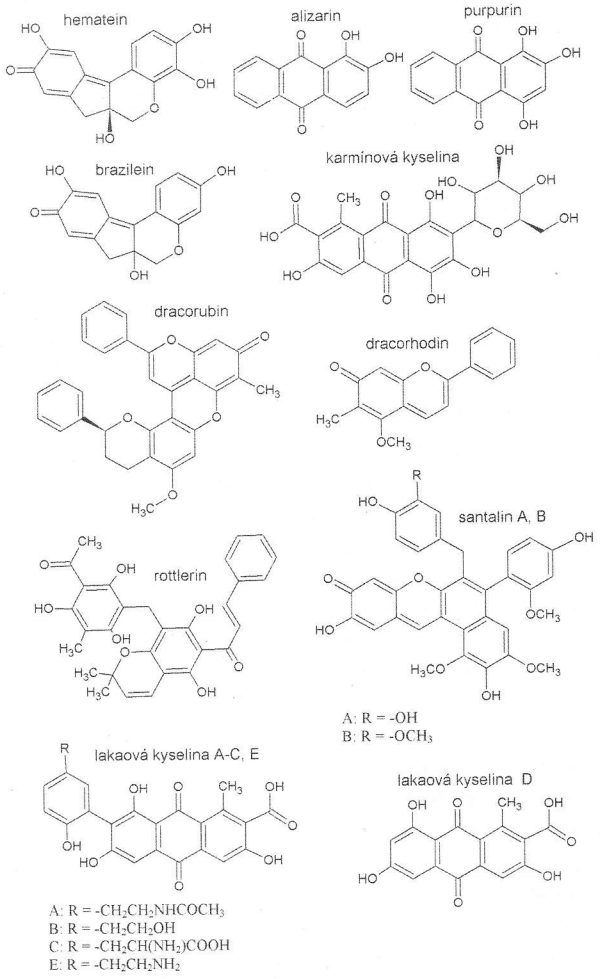
Barviva

Jako barviva jsou označovány látky barevné, tedy takové, které absorbují energii záření ve viditelné části spektra. Látka

tak získává barevný odstín doplňkové barvy, která naopak nebyla absorbována, ale odražena. Za absorpci záření jsou odpovědny tzv. hlavní barvicí látky. Ve své chemické struktuře obsahují části molekul a atomy absorbující viditelné záření, tedy chromofory a auxochromy. Jejich vzájemnou kombinací se mění intenzita zbarvení látek [Šimůnková et al., 1999; Hofenk de Graaff et al., 2004].

Barviva lze rozdělit dle řady kritérií, například podle chemického složení, rozpustnosti nebo podle techniky barvení (způsob vysrážení barviva na substrát, kterým je převážně textil či papír). Tzv. přímá barviva (označována i jako substantivní barviva) se používají pro barvení celulózových (bavlna, len, konopí) a proteinových vláken (vlna, hedvábí) bez jejich předchozích úprav. Mořidlová barviva vyžadují úpravu barvených vláken mořením, tedy adhezním navázáním soli vícemocného kovu na vlákno, s následným vytvořením nerozpustného komplexu barviva s kovem, tzv. laku. Poslední skupinou jsou barviva kypová, která se chovají jako pigment, tedy jsou nerozpustná v aplikačním prostředí. Tato barviva musí být redukcí převedena na rozpustnou formu (leukosloučeninu), která je většinou bezbarvá. Zpětnou oxidací na vzduchu získá barvivo svůj původní barevný odstín a nerozpustnost [Schweppe, 1992; Wyplosz, 2003].

Vybranými organickými barvivy jsou akaroid, brazil, dračí krev, kamala, kampeška, košenila, kraplak, laka a santal. Akaroid (dále označován jako acaroid, accroides gum, acaroid resin) a brazil (Bois de Brésil, brazil wood, Rotholz, Bakam, Patang, peach wood, soluble red wood, red sanders, Indian nut, cloves) patří mezi pryskyřicová barviva, přičemž hlavní barvicí složkou brazilu je brazilein. Strukturním homologem brazileinu je hematein, hlavní barvicí složka kampešky (Blauholz, logwood, Bois de Campêche, modré dřevo), která má oproti brazileinu navíc jednu hydroxylovou skupinu. Barvivo dračí krev (dragon's blood, Sanguis Draconis), které obsahuje kromě pryskyřic i třísloviny, tvoří pyryliové hlavní barvicí složky dracorhodin a dracorubin. Také deriváty pyryliových hlavních barvicích složek, santalinu A a B, jsou obsaženy v barvivu santal (sandalwood, Bois de Santal, Sandelholz, sanderswood, rubywood, Cambaholz, red dura, Caliatur, Carratur). Rottlerin je hlavní barvicí složkou rostlinného barviva kamala (Uncomocomo, Mallotoxin). Alizarin, purpurin, kyselina karmínová a kyselina lakaová jsou deriváty anthrachinonu. Alizarin a purpurin, hlavní barvicí složky kraplaku (mořena, madder, garance, Färberröte, rubia, meekrap, crap, foyoy, Rosa di Fiandra, Varantina, Alizari, Lizari), jsou homology vzájemně se lišící jednou hydroxylovou skupinou. Karmínová kyselina, hlavní barvicí složka košenily (cochineal, carmin, carmosyn, kokkinos, karmil, kockerilje cont senily, Macarat, Sylvester Venice lak, cochenille, grana chochenilla, cochenile Mesteque), a lakaová kyselina (obsahující formy A-E) s majoritní formou A obsaženou ve formě soli v barvivu laka (Lac-Lac, Lac-dye, Lacca, Gomme laque, Stock lack, gummilack, seed-lac, caked lac, grained lac, kadi Lakh, Raughatti, Lic-Lac), jsou ze studovaných barviv jediné živočišného původu. Karmínová kyselina obsahuje již ve své chemické struktuře sacharidovou složku, čímž se liší od všech hlavních barvicích látek. Chemické struktury hlavních barvicích složek vybraných barviv jsou uvedeny na Obr. 1 [Čopíková et al., 2005; Šimůnková et al., 1999; Hřebíčková, 2006; Kopecká, 1990].



Obr. 1: Známé chemické struktury hlavních barvicích složek vybraných organických barviv

Použité chemikálie

Barviva akaroid, kamala a kraplak byla zakoupena od firmy Kremer Pigmente GmbH & Co KG, Německo. Barviva dračí krev, košenila (sušené zadečky oplodněné samičky červce nopálového) a santal byla získána od firmy Sandragon s.r.o., ČR. Další barviva brazil, kampeška a laka byla použita ze zdrojů Ústavu chemické technologie restaurování památek, VŠCHT Praha. Nedeklarované čistoty barviv byly zjištěny pomocí prvkové röntgenové fluorescenční analýzy.

Standardy hlavních barvicích látek karmín, karmínová kyselina, lakaová kyselina (Natural red 25), hematein a rottlerin byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Německo. Purpurin byl poskytnut firmou Fluka Chemie, Švýcarsko a alizarin byl dodán Mikrobiologickým ústavem AV ČR.

Pro přípravu mobilní fáze v TLC a elektrolytů v CZE a MEKC byl použit methanol (MeOH), dodecylsíran sodný (SDS) a acetonitril (ACN), všechny od firmy Sigma-Aldrich (Německo), dále triethylamin (TEA, Fluka Chemie, Švýcarsko), tetraboritan sodný dekahydrát, dihydrogenfosforečnan sodný,

hydrogenfosforečnan sodný a octan sodný trihydrát (všechny od firmy Lachema, ČR), kyselina chlorovodíková od firmy Penta (ČR), dichlormethan (nečištěný) a hydroxid sodný, oba od firmy Lach-Ner (ČR).

K přípravě všech vodných roztoků a k promývání byla použita deionizovaná voda. Jednotlivé analyty byly pro měření na TLC, CZE a MEKC rozpuštěny v methanolu.

Použité přístroje

Spektroskopická měření v infračervené oblasti v reflexním módu (rozsah vlnočtů 650–4000 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1}) byla prováděna v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha na přístrojích Bruker IFS 66v s IR mikroskopem Hyperion s automatickým skenovacím stolkem a na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo-Nicolet, USA) ve spojení s mikroskopem Continuum. Disperzní Ramanova spektroskopie byla prováděna v rozsahu vlnočtů 300–2500 cm^{-1} pro dva budicí lasery (červený o $\lambda = 785{,}05$ nm a zelený o $\lambda = 532{,}20$ nm) na přístroji Jobin-Yvon Labram HR Raman spectrometer s konfokálním mikroskopem Olympus a CCD detektorem opět v Centrálních laboratořích VŠCHT, Praha. K vyhodnocování získaných spekter byl použit software OMNIC 7.3.

Elektroforetická měření byla prováděna na Katedře analytické chemie PřF UK na přístrojích $HP^{3D}CE$ systém s diode-array detektorem (Agilent Technologies, Německo) a PrinCE 250 autosampler (PrinCE Technologies B.V., Nizozemsko) s UV/Vis spektrofotometrickým detektorem Spectra 100 (Therma Separation Products, USA). Měření byla prováděna při teplotě 25 °C na nemodifikované křemenné kapiláře firmy CACO s.r.o. (Slovensko) o parametrech: vnitřní průměr $d_i = 75$ μm nebo 50 μm, vnější průměr $d_o = 380$ μm, délka kapiláry k detekčnímu okénku $L_D = 55{,}8$ cm a celková délka kapiláry $L_C = 70$ cm. Kapilára byla na začátku měření promývána deionizovanou vodou (5 min), 1 M NaOH (10 min), opět vodou (5 min) a elektrolytem (10 min). Během analýz byla kapilára promývána 0,1 M či 1 M NaOH (2 min), deionizovanou vodou (3 min) a elektrolytem (3 min).

Při separaci metodou TLC byly použity dva typy destiček, aluminiové destičky se silikagelem a fluorescenčním indikátorem pro 254 nm (normální fáze, tloušťka 0,2 mm, Silica gel/TLC-cards, Fluka Chemie, Švýcarsko) a aluminiové destičky se silikagelem s navázaným oktadecylem (RP-18W) a fluorescenčním indikátorem pro 254 nm (reverzní fáze, tloušťka 0,15 mm, Nano-Silica gel RP-18W on alu-foil, Fluka Chemie, Švýcarsko). K detekci v UV oblasti (při 254 nm) byla použita UV lampa a scaner HP Scanjet 4670 (Hewlett-Packard Development Company, USA).

Tenkovrstvá chromatografie – TLC

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) patří mezi základní analytické separační metody díky své instrumentální nenáročnosti, rychlosti a v neposlední řadě nízké ceně. Využívá se převážně k určování čistoty a k orientační identifikaci široké škály látek anorganického i organického původu. Je vhodná především pro barevné látky, kdy již není potřeba následného vybarvování, kterého se případně využívá k detekci bezbarvých látek.

Principem separace analytů metodou TLC je rozdílná migrace látek v systému dvou fází. Jednou je tzv. stacionární (zakotvená) fáze a druhou je fáze mobilní (pohyblivá), která s sebou unáší analyty ze startovací linie. Vzlínání mobilní fáze je podpořeno nasycenými parami mobilní fáze, které tak vytváří pomyslnou třetí fázi. K samotné separaci látek dochází na základě jejich rozdílné polarity, adsorpce, rozpouštění (rozdělování), výměně iontů, efektu molekulového síta či případně jejich kombinace. V této práci byla využita adsorpční TLC, u níž je stacionární fáze tvořena tuhým sorbentem naneseným v tenké vrstvě na vhodnou desku, a mobilní fáze se skládá ze směsi rozpouštědel, obvykle s přídavky kyselin, bází nebo tlumivých roztoků. Podle polarity tuhého sorbentu rozlišujeme „normální fázi", kdy sorbent (zde silikagel) je polárnější než mobilní fáze, a fázi „reverzní", kdy sorbent (zde silikagel s navázaným oktadecylem) je méně polární než mobilní fáze.

Většina vybraných červených organických barviv obsahuje deriváty anthrachinonu, které jsou převážně nepolární či slabě polární. K jejich separaci lze tedy využít normální mód, kdy stacionární fázi tvoří polárnější silikagel a méně polární mobilní fázi směs organických rozpouštědel. Organická barviva byla dříve úspěšně separována na mikrokrystalické celulóze (jako stacionární fáze) s vyvíjecími roztoky tvořenými: nejčastěji 35/6/45 (v/v/v) tetrahydrofuran/ethylacetát/voda, dále 95/5 (v/v) methanol/kyselina mravenčí či 2/1/10 (v/v/v) *terc*-butanol/kyselina mravenčí/voda [Kopecká, 1990]. Potřeba vysoké čistoty organických rozpouštědel a použití různých vyvíjecích soustav pro jednotlivá barviva analýzu ztěžuje jak časově (v případě destilačního čištění), tak především finančně. Z tohoto důvodů byl hledán nový „univerzální" eluční systém pro separaci organických barviv s využitím silikagelových stacionárních fází. Nejprve byla hledána optimální eluční směs pro separaci barviv laka, kamala a hlavní barvicí složky hematein, orcein, karmínovou kyselinu, lakovou kyselinu a rottlerin v TLC normálním módu (na silikagelu) [Petrášová, 2009]. Jako mobilní fáze byla zvolena různá kombinace vodných pufrů, methanolu, hexanu, octanu ethylnatého, ethanolu, trichlormethanu a triethylaminu. Zvolené mobilní fáze však nebyly vhodné pro separaci barviv, neboť se v řadě případů nepodařilo analyty vůbec detekovat, či docházelo k rozmývání skvrn. Proto byla pro separaci akaroidu, brazilu, dračí krve, kamaly, kampešky, košenily, kraplaku, laky a santalu a jejich hlavních barvicích složek zvolena jako mobilní fázi méně polární směs 5–20 % obj. methanolu v dichlormethanu. Vyšší obsah methanolu umožnil eluci kamaly a rottlerinu, ale ostatní barviva zůstala na startu či se silně rozmývala. Normální mód byl tedy nahrazen reverzním módem, kdy stacionární fázi tvoří silikagel s navázaným oktadecylem a mobilní fází je opět směs methanolu ve vodném pufru s obsahem triethylaminu o různé hodnotě pH. Opět v návaznosti na bakalářskou práci [Petrášová, 2009] byl jako mobilní fázi zvolen 3/2 či 4/1 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 M octanovém pufru, pH 5 a dále 3/2 či 4/1 (v/v) MeOH/1% TEA v 25 mM tetraborátovém pufru, pH 7 a 9

(upraveno pomocí 1M HCl). S rozdílnou hodnotou pH se mění disociace jednotlivých molekul a tím i jejich polarita. Vyšší obsah methanolu opět umožnil separaci kamaly a rottlerinu, kdy naopak v nižším poměru methanolu (3/2) zůstaly oba analyty na startu. Na Obr. 2 jsou uvedeny naskenované záznamy tenkovrstvé chromatografie zvolených červených organických barviv separovaných na reverzní fázi s mobilní fází 4/1 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,1 M octanovém pufru, pH 5. Jednotlivé barevné skvrny jsou zvýrazněny v místech největší intenzity fluorescence po ozáření UV lampou při 254 nm. Přírodní organická barviva jsou směsi více látek, jak potvrzuje množství barevných skvrn na Obr. 2. Záznamy eluce akaroidu (9) a dračí krve (10) jsou si vzájemně, až na intenzitu skvrn, velice podobné. Ve struktuře kamaly (1) lze snadno rozeznat skvrnu patřící rottlerinu (2) a stejně tak i v barvivu laka (11) nalezneme sůl kyseliny lakaové (12). Přestože lakaová kyselina se vyskytuje současně v pěti formách, na záznamu je pouze jediná skvrna majoritní formy A (Obr. 1). V tomto systému se však polárnější analyty stále rozmývaly a ani při vyšší hodnotě pH (pH 7 a 9) se jejich eluce nezlepšila. Využití silikagelových stacionárních fází tedy nepřineslo oproti dříve používané mikrokrystalické celulóze ani zjednodušení, ani výrazné zlepšení separace vybraných organických barviv.

Metodu TLC lze objektivně využít k orientační identifikaci neznámých vzorků barviv po srovnání elučního chování analytu se známými barvivy. Stejně tak je vhodná k určení čistoty analyzovaných barviv, a tak i k předběžnému rozlišení přírodních a syntetických barviv, která jsou většinou velmi čistá či jsou přímo chemickými individui.

Kapilární elektroforéza – CZE a MEKC

Kapilární elektromigrační metody se používají díky své vysoké účinnosti separace, velké rychlosti analýzy a malé spotřebě vzorku a činidel. Nevýhodou těchto technik je destrukce vzorku, menší reprodukovatelnost a potřeba složitější instrumentace, která se odráží v ceně analýzy. Pro analýzy anthrachinonových barviv se využívají kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická chromatografie.

Elektromigrační metody jsou založeny na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vhodná pro separaci a stanovení kladně i záporně nabitých molekul v homogenním elektrickém poli současně během jednoho experimentu. Dělení nabitých látek je založeno na rozdílných elektroforetických pohyblivostech (mobilitách) analytů, tedy jejich rozdílného pohybu v základním elektrolytu, který je závislý na velikosti náboje a velikosti molekuly. Analyzované látky se pohybují v elektrolytu nejen vlastní pohyblivostí, ale jsou unášeny směrem k detektoru samotným elektrolytem, tzv. elektroosmotickým tokem.

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je obdobou kapilární zónové elektroforézy. Slouží především k separaci nenabitých (převážně hydrofobních) molekul na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodnou a pseudo-stacionární fází, která je tvořena micelami. Micely vytvářejí povrchově aktivní látky (kationogenní, anionogenní, neionogenní tenzidy), které jsou přidávány do elektrolytu (vodná fáze) ve vyšší koncentraci než je tzv. kritická micelární koncentrace, tedy koncentrace nutná k tvorbě micel. Nejpoužívanějším anionogenním tenzidem je dodecylsíran sodný (SDS), který tvoří záporně nabité micely a má tudíž vlastní elektroforetickou pohyblivost. Separované látky se rozdělují mezi micely a nosný elektrolyt podle své polarity. Analyt, který je úplně rozpustný v micelách, vytváří tzv. horní mez elučního okna, tedy k detektoru doputuje nejpomaleji, naopak dolní mez je určena neinteragujícími látkami, které migrují s elektroosmotickým tokem.

Vzhledem k chemické struktuře analytů, především jejich hlavních barvicích složek (Obr. 1), je pro jejich elektroforetické měření v CZE vyžadován základní elektrolyt o alkalickém pH. Při tomto vyšším pH by měly být separované látky disociované a měly by tedy nést záporný náboj, který jim zajistí vlastní elektroforetickou pohyblivost. V návaznosti na identifikaci alizarinu a purpurinu (hlavních barvicích složek barviv získávaných z kořene mořeny barvířské) ve směsi s ostatními hydroxyderiváty anthrachinonu [Svobodová, 2006] byl jako nosný elektrolyt zvolen 10 mM tetraborátový pufr o pH 8,5–10,8. Přírodní organická barviva však obsahují řadu hydrofobních nenabitých látek, které touto metodou identifikovat nelze, protože nenesou žádný náboj, nemají tak vlastní elektroforetickou pohyblivost a jsou unášeny pouze elektroosmotickým tokem. Dále jsou tato barviva a jejich hlavní barvicí látky nerozpustné ve vodě (vyjma kyseliny karmínové), tudíž by mohlo dojít k vysrážení barviv a ucpání kapiláry. Přídavkem anionogenního tenzidu SDS do základního elektrolytu, a tedy využitím metody MEKC, zvýšíme nejen rozpustnost samotných barviv v elektrolytu (díky hydrofobní dutině v micelách), ale umožníme tak i vlastní identifikaci nenabitých hydrofobních látek. Pro elektroforetická měření v MEKC je naopak vhodnější elektrolyt o hodnotě pH v oblasti slabě alkalické či neutrální. Optimalizace separačních podmínek pro identifikaci barviv metodou MEKC byla provedena pro separaci alizarinu a purpurinu. Byl sledován vliv složení elektrolytu (10 mM tetraborátový pufr a 10 mM fosfátový pufr s přídavkem 10–20 mM SDS) a jeho pH (6,5–10,8) na rychlost a účinnost separace. Za optimalizovaných podmínek, tedy v 10 mM tetraborátovém pufru o pH 8,5 s 15 mM SDS, pro dávkování 20 mbar po 5 s, detekci při 254 nm a napětí 20 kV, bylo proměřeno elektroforetické chování jednotlivých barviv a jejich hlavních barvicích složek. Na obr. 3 jsou uvedeny ukázky elektroforeogramů barviv akaroidu a dračí krve (Obr. 3A) a kamaly a její hlavní barvicí složky rottlerinu (Obr. 3B). Oproti TLC je zde mnohem vyšší účinnost separace jednotlivých látek obsažených v přírodním barvivu (které se rozpustily v methanolu), což potvrzuje elektroforeogram barviva laka obsahující tři intenzivní píky (v TLC jedna skvrna viz Obr. 2), které se shodují s elektroforeogramem kyseliny lakaové (Obr. 3C). Účinnost separace je rovněž patrná z možnosti vzájemného rozlišení akaroidu a dračí krve díky jejich rozdílným elektroforeogramům (Obr. 3A) a potvrzení přítomnosti rottlerinu jako majoritní složky barviva kamala (Obr. 3B).

Infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie

Spektroskopické metody, především infračervená spektroskopie (IR) a Ramanova spektroskopie, jsou v popředí zájmu pro svou rychlost a nedestruktivnost. Nevyžadují žádný odběr vzorku či postačuje odběr jen malého množství, které se během analýzy nezničí. Nevýhodou těchto metod je strukturní složitost organického vzorku oproti vzorkům anorganickým. Ta ztěžuje identifikaci látky na základě porovnání naměřených spekter s knihovnou spekter, která obsahuje především spektra jednoduchých matric.

Tyto metody jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s molekulami či atomy analyzovaných látek, kdy dochází k energetické změně původního záření (dojde k absorpci či emisi záření) nebo k odrazu či rozptylu záření. Molekuly látek při absorpci záření přijmou energii a dojde ke zvýšení energetického stavu molekuly spojeného se změnou rotačního a vibračního stavu molekul či s přeskokem elektronů z nižších energetických hladin do hladin vyšších vedoucí až k ionizaci molekul (podle množství přijaté energie). Při emisi naopak dochází k vyzáření energie molekul a k jejich navrácení do nižšího energetického stavu. Množství absorbované či emitované energie je pro daný elektronový systém, potažmo pro jednotlivé molekuly, specifický. Toho se využívá k identifikaci látek, především barviv, která absorbují záření ve viditelném spektru a k jejichž excitaci stačí nižší energie záření, tedy v oblasti infračerveného či viditelného spektra.

Identifikace historických přírodních organických barviv v reálných vzorcích barevných vrstev či barvených textilií spektrálními technikami je založena na nalezení a určení specifických vibračních pásů jednotlivých barviv, které jsou pro ně jedinečné a lze jimi tato barviva rozlišit i ve směsi na různých typech podložek. Cílem bylo tedy nalezení těchto absorpčních pásů barviv akaroidu, brazilu, dračí krve, kamaly, kampešky, košenily, kraplaku, laky a santalu, za jejichž barevnost jsou odpovědny jejich příslušné barvicí složky.

Nejprve bylo proměřeno spektrální chování barvicích složek jednotlivých barviv (pokud byly komerčně dostupné) a tato spektra byla porovnána s naměřenými spektry samotných barviv. Jednotlivá infračervená spektra byla proměřena v reflexním, tedy odrazovém módu v rozsahu vlnočtů 650–4000 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1} a počtu akumulací spekter pohybujícím se v rozsahu 64–128. Pro zachování lineární odezvy detektoru bylo potřeba vzorky nanášet ve velmi tenké vrstvě, aby reflektance neklesla pod 10 %.

Hlavní barvicí složky studovaných barviv obsahují převážně chinoidní struktury lišící se prostorovým uspořádáním a počtem aromatických kruhů, hydroxylových a alkylových skupin (Obr. 1). Jednotlivá spektra těchto látek obsahují vibrační pásy vzájemně se lišící intenzitou či mírným posunem na ose vlnočtů (dáno vlivem okolních skupin). Průběh infračervených spekter barviv převážně ovlivňují jejich hlavní barvicí složky, jejichž vibrační pásy lze využít k identifikaci samotného barviva. Na Obr. 4 jsou pro ukázku zobrazena infračervená spektra barviva akaroidu (Obr. 4A) a dračí krve (Obr. 4B). V prvním přiblížení ze srovnání obou spekter je patrná shoda pozice vibračních pásů obou barviv, mírně se však liší v intenzitě pásů. Pro jednoznačnou identifikaci jednotlivého barviva jsou potřeba matematické operace úpravy spekter, kterými jsou např. separace pásů, derivační spektra a Fourierova dekonvoluce spektra.

Proměřením spekter studovaných barviv v infračervené oblasti byly nalezeny některé specifické vibrační pásy, které jsou uvedeny v Tab. 1. Ty lze využít k předběžné identifikaci použitého barviva, ale k přesné identifikaci barviv je zapotřebí matematických úprav spekter k nalezení překrývajících se pásů či odstranění pásů nepříslušejících samotné barvicí složce, jak již bylo uvedeno výše pro případ akaroidu a dračí krve. V Tab. 1 nejsou uvedeny významné vibrační pásy barviva košenily, která byla získána pouze ve formě nečištěného přírodního produktu, tedy byly to usušené zadečky oplodněné samičky červce nopálového. V infračerveném spektru košenily jsou vibrační pásy příslušející samotnému barvivu překryty jiným pásy, především vibracemi amidových skupin proteinů.

barvivo	významné pásy [cm^{-1}]
brazil	1497; 1424; 1363; 1250; 1113; 1047
santal	1737; 1506; 1424; 1327; 1266; 1155; 1032
akaroid	1513; 1263; 1204; 1161; 835
dračí krev	1511; 1283; 1205; 1171; 954; 834
kamala	1551; 1346; 1167; 1130
kampeška	1503; 1476; 1293; 1209; 1056
kraplak	1669; 1411; 1146; 1022; 996
laka	1715; 1378; 1309; 834; 812; 774

Tab. 1 Významné vibrační pásy jednotlivých barviv

Podobně jako u infračervené spektroskopie byla i v případě Ramanovy spektroskopie proměřena spektra jednotlivých barvicích složek. Tyto hlavní komponenty barviv mají ve většině případů velmi silnou fluorescenci pozadí, která překrývá vibrační pásy jednotlivých strukturních skupin těchto barvicích látek. Vyšší energie budicího laseru ale barvicí složky spaluje, nižší energie zase není dostačující k excitaci absorbujících skupin. Ramanova spektra jednotlivých komerčně dostupných barvicích složek organických červených barviv byla měřena v rozsahu vlnočtů 300–2500 cm^{-1} pro dva budicí lasery, a to laser červený o vlnové délce záření 785 nm a zelený laser o vlnové délce záření 532 nm. Pro každou hlavní barvicí komponentu byly zvlášť měněny podmínky měření od intenzity paprsku přes doby pulsu až k počtu akumulací spekter. Přesto se podařilo získat spektra pouze pro dvě barvicí složky, a to rottlerin (hlavní barvicí složka barviva kamala) a hematein (hlavní barvicí složka barviva kampeška). Barvivo kamala vykazuje Ramanovo spektrum po ozáření oběma budicími lasery, oproti kampešce, která vykazuje Ramanovo spektrum pouze po ozáření zeleným laserem. Pro ukázku jsou na Obr. 5 zobrazena jak infračervená, tak Ramanova spektra (po excitaci zeleným laserem) kampešky a její hlavní barvicí složky hemateinu. Infračervená spektra kampešky a hemateinu (Obr. 5A) se v oblasti 1000–1600 cm^{-1} mírně liší, především v absenci vibračního pásu při 1535 cm^{-1} ve spektru kampešky a intenzitou ostatních vibračních pásů.

Ramanova spektra kampešky a hemateinu naopak vykazují shodu jednotlivých vibračních pásů, které potvrzují majoritní podíl této barvicí komponenty (hemateinu) na celkové barevnosti barviva (kampešky).

Závěr

Pro potřeby identifikace devíti vybraných organických barviv byly optimalizovány spektroskopické a separační metody. Metody spektroskopické (IR a Ramanova spektroskopie) jsou výhodné z hlediska nedestruktivnosti odběru vzorku, možnosti práce v terénu a rychlosti stanovení. Nevýhodou je nízká citlivost těchto metod, a tedy potřeba vysokých koncentrací (zastoupení) barviva ve sledovaném vzorku, a především nedostatečné databáze v knihovnách spekter. IR spektroskopie je vhodná pro identifikaci vybraných především červených organických barviv brazil, kamala, kampeška, laka, kraplak a santal. Barviva akaroid a dračí krev v prvním přiblížení nelze touto metodou vzájemně rozlišit bez matematické úpravy spekter. Vibrační pásy barviva košenily jsou překryty vibračními pásy amidových skupin proteinů z těl červce nopálového. Identifikace barviv v různých matricích tak vyžaduje přesnou interpretaci naměřených spekter. Ramanova spektroskopie je výhodná především pro barviva kamala a kampeška a jejich hlavní barvicí složky při excitaci oběma budicími lasery. Ostatní barviva svou vysokou fluorescencí zvyšují pozadí, které tak překrývá vibrační pásy samotného barviva. Pro tato barviva je tedy výhodnější využít metody SERS (povrchem zesílený Ramanův rozptyl).

Separační metody jsou univerzálními, vysoce účinnými metodami, kterými můžeme separovat jednotlivá barviva ve směsi a identifikovat je. Podle stanovených nečistot a příměsí lze rozlišit přírodní a synteticky vyrobená barviva. Tyto metody jsou však destruktivní, převážně nepřenosné a finančně nákladnější. TLC je vhodná k orientační identifikaci vybraných barviv a určení jejich čistoty. V elučním systému sestávajícího se z reverzního módu na destičkách RP-18W s mobilní fází 4/1 (v/v) MeOH/1% TEAA o pH 5 se však skvrny barviv santal, kampeška, akaroid, dračí krev a brazil rozmývají. Hlavní barvicí složky karmínová kyselina, hematein a purpurin se za stejných elučních podmínek nepodařilo detekovat. Metoda MEKC je vhodná k přesné identifikaci všech studovaných barviv již o koncentracích řádově 0,1 mg/mL. Díky své vysoké separační účinnosti lze za optimalizovaných podmínek (10 mM tetraborátový pufr, pH 8,5 s 15 mM SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm) nejen identifikovat vybraná barviva, ale i vzájemně rozlišit barviva akaroid a dračí krev. Díky přesnému určení příměsí lze tuto metodu využít i k potvrzení datace, lokace a pravosti uměleckých děl.

V dnešní době existuje velká řada analytických metod, které lze využít k identifikaci či stanovení organických barviv. K výběru vhodné analytické metody je nutné specifikovat očekávané informace, množství vzorku potřebného k analýze, přesnost stanovení, účel (zda se jedná pouze o identifikaci či i o kvantifikaci) a finanční nákladnost metody.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt SVV 261204) a dále pak z prostředků MŠMT (výzkumný záměr MSM0021620857 a rozvojový program RP 14/63).

Literatura

ČOPÍKOVÁ, J. – UHER, M. – LAPČÍK, O. – MORAVCOVÁ, J. – DRAŠAR, P.: Přírodní barevné látky. *Chemické listy*, listopad 2005, vol. 99, no. 11, s. 802–816.

ŠIMŮNKOVÁ, E. – BAYEROVÁ, T.: *Pigmenty.* 1. vyd. 1999. ISBN 80-902668-1-9.

KOPECKÁ, I.: *Přehled přírodních barviv.* 1990. Státní restaurátorské ateliéry Praha.

HŘEBÍČKOVÁ, B. A.: *Recepty starých mistrů aneb Malířské postupy středověku.* 1. vyd. 2006. ISBN 80-251-1025-7.

SCHWEPPE, H.: *Handbuch der Naturfarbstoffe – Vorkommen – Verwendung - Nachweis.* 1. vyd. 1992. ISBN 3-609-65130-X. s. 659–675.

WYPLOSZ, N.: *Laser desorption mass spectrometric studies of artistis' organic pigments.* 1. vyd. 2003. ISBN 90-77209-02-6. s. 1–16.

HOFENK DE GRAAFF, J. H. – ROELOFS, W. G. TH. – VAN BOMMEL, M. R.: *The Colourful Past: Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs.* 1. vyd. 2004. ISBN 3-905014-25-4.

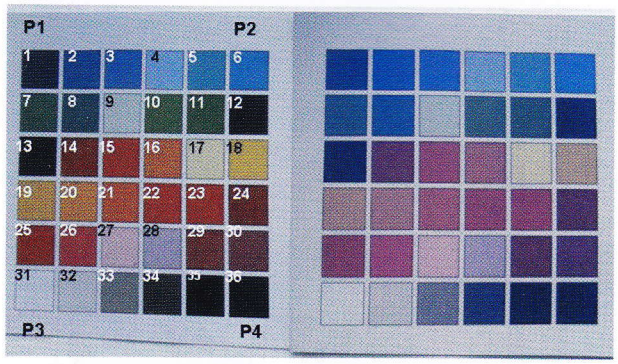
PETRÁŠOVÁ, S. *Tenkovrstvá chromatografie anthrachinonových barviv.* 2009. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy na katedře analytické chemie. Vedoucí bakalářské práce Věra Pacáková a Eva Svobodová.

SVOBODOVÁ, E.: *Kapilární elektroforéza anthrachinonových barviv používaných v uměleckých dílech.* 2006. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy na katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce Věra Pacáková a Zuzana Bosáková.

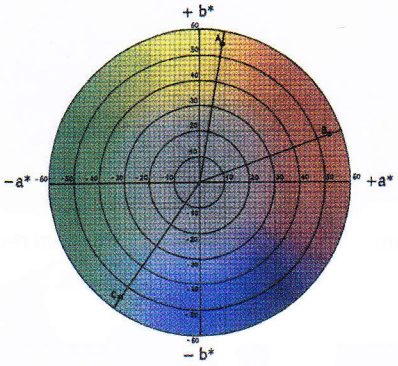
Viz obrazová příloha / XIV–XV

Starnutie farebnej fotografie

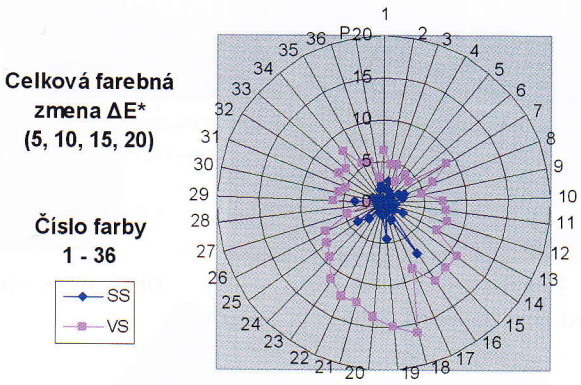
Obr. 1: Farebný diapozitív, ktorý vznikol pred 16 rokmi a bol uložený v obale na diapozitívy pri bežnej teplote a vlhkosti miestnosti. Diapozitív bol zdigitalizovaný a nebol farebne korigovaný. Výrazný je posun farieb do červeno-modra



Obr. 2: Kontrolná fotografia s označenými farbami a pozadiami (ľavá strana) a fotografia po vlhkom starnutí (pravá strana)

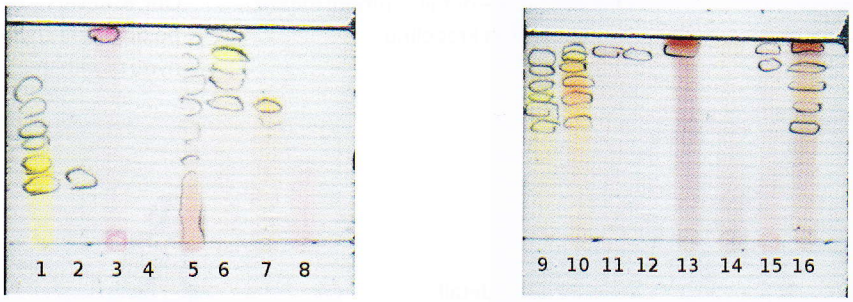


Obr. 3: 2D farebný priestor CIELAB 1976 (Sightgrip, 2010), ktorý sme používali pri lokalizácii polohy farby a pri hodnotení farebných zmien Δa* a Δb*

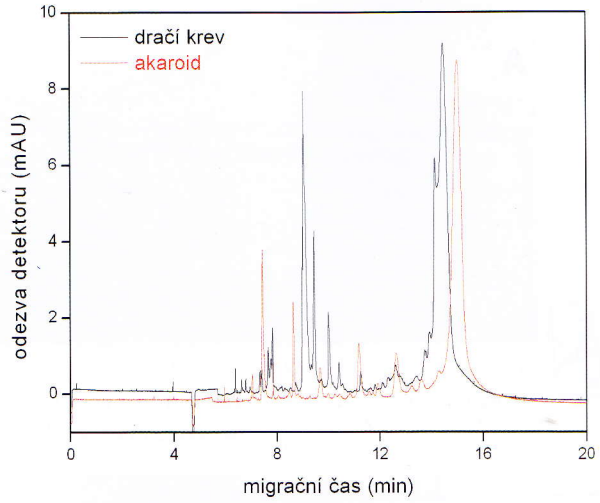


Obr. 4: Celková farebná zmena ΔE*, ktorá vznikla v jednotlivých farbách počas urýchleného starnutia (č. 1 – 36). P – priemerná zmena hodnoty pozadia fotografie po starnutí. SS – suché starnutie, VS – vlhké starnutie

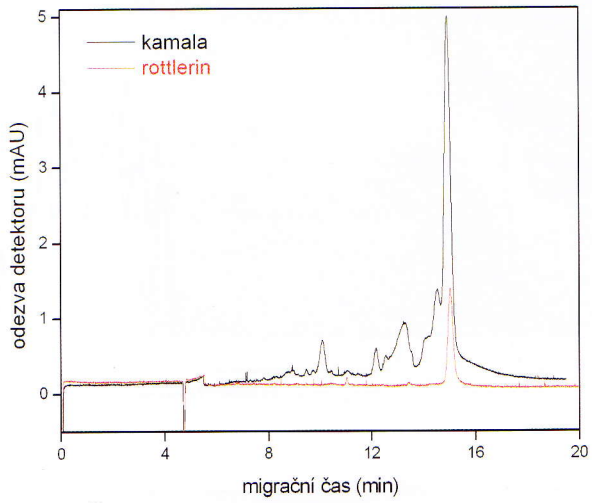
Srovnání separačních a spektroskopických technik pro identifikaci organických barviv



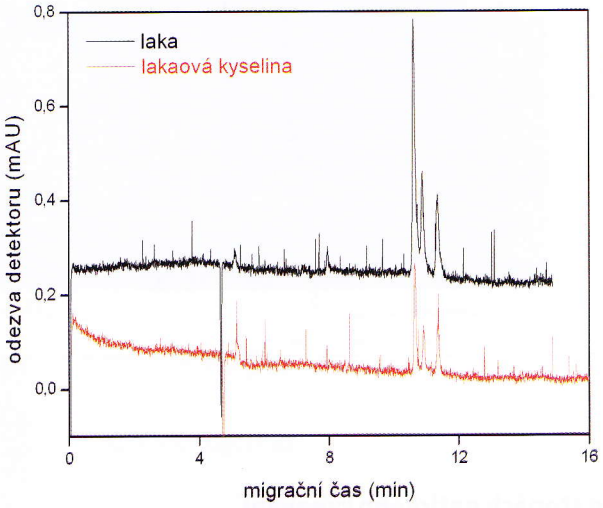
Obr. 2: Záznamy tenkovrstvé chromatografie barviv na reverzní fázi s mobilní fází 4/1 (v/v) MeOH/1% TEAA o hodnotě pH 5. Označení analytů: (1) kamala, (2) rottlerin, (3) karmín, (4) kyselina karmínová, (5) santal, (6) kraplak, (7) alizarin, (8) purpurin, (9) akaroid, (10) dračí krev, (11) laka, (12) kyselina lakaová, (13) kampeška, (14) hematein, (15) brazil a (16) směs tvořená kampeškou, lakou, dračí krví a akaroidem



A

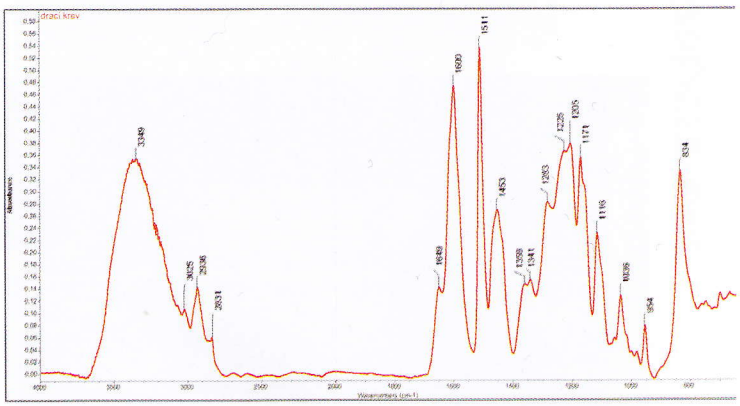


B

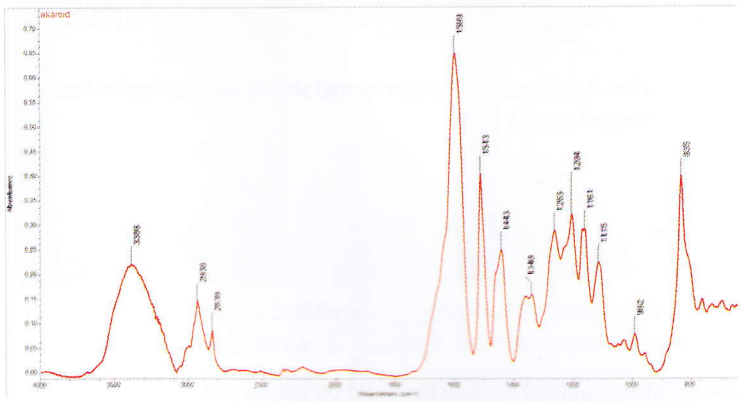


C

Obr. 3: Záznamy MEKC měření (A) dračí krve (černá linka) a akaroidu (červená linka); (B) kamaly (černá linka) a rottlerinu (červená linka); a (C) laky (černá linka) a lakaové kyseliny (červená linka). Podmínky měření: elektrolyt 10 mM tetraborátový pufr o pH 8,451 s 15 mM SDS, dávkování 20 mbar po 5 s (pro dračí krev dávkování 30 mbar po 5 s), napětí 20 kV, detekce 254 nm

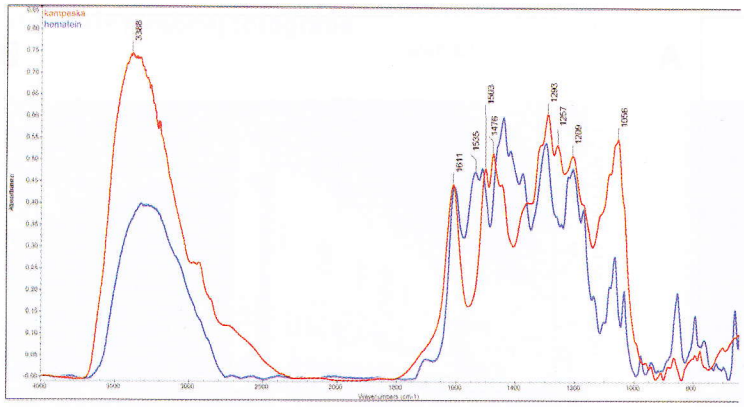


A

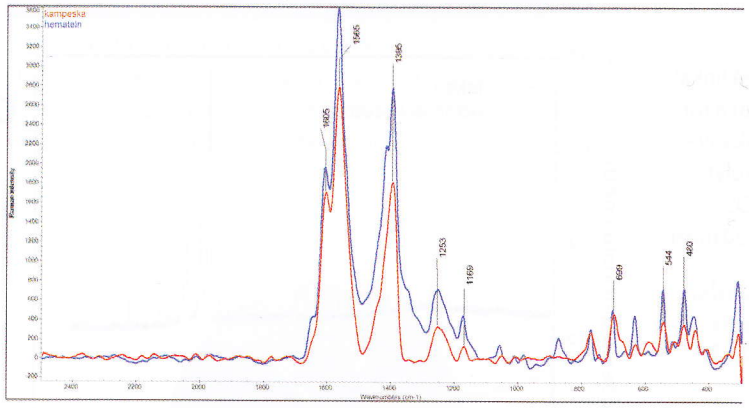


B

Obr. 4: Infračervená spektra barviv akaroidu (B) a dračí krve (A) v jednotkách absorbance v rozsahu vlnočtů 650–4000 cm^{-1} pro 64 akumulací spekter



A



B

Obr. 5: Infračervená (A) a Ramanova (B) spektra barviva kampeška (červená linka) a její hlavní barvicí látky hemateinu (modrá linka). Infračervená spektra jsou zobrazena v jednotkách absorbance v rozsahu vlnočtů 650–4000 cm^{-1} pro 64 akumulací spekter. Ramanova spektra byla měřena po excitaci zeleným laserem (λ = 532,20 nm) v rozsahu vlnočtů 300–2500 cm^{-1} při 1% filtru, 60 akumulací spekter a době pulsu 3 s (v případě kampešky) a 10% filtru, 30 akumulací spekter a době pulsu 1 s (v případě hemateinu)

Po stopách gotického rýhování

Obr. 1: Celkový pohled na gotickou skříň po konzervaci

Obr. 2: Pohled na předsazený sokl skříně, ukázka florální řezby s rozvilinami a květy

PUBLIKACE IV

Svobodová E., Bosáková Z., Ohlídalová M., Novotná M., Němec I.: A Critical Evaluation of the Potentialities of Infrared and Raman Microspectroscopy for Identification of Some Red Organic Dyes in Model Colour Layers of Works of Art; DYPI-S-11-00539, zasláno 2011 do časopisu *Dyes and Pigments*

Elsevier Editorial System(tm) for Dyes and Pigments
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: A Critical Evaluation of the Potentialities of Infrared and Raman Microspectroscopy for Identification of Some Red Organic Dyes in Model Colour Layers of Works of Art

Article Type: Original Paper

Keywords: red organic dyes; IR spectroscopy; Raman spectroscopy; identification.

Corresponding Author: Assoc. Prof. Zuzana Bosáková,

Corresponding Author's Institution: Charles University in Prague, Faculty of Science

First Author: Eva Svobodová, Master

Order of Authors: Eva Svobodová, Master; Zuzana Bosáková, Assoc. Prof.; Martina Ohlídalová, Master; Miroslava Novotná, Master; Ivan Němec, Assoc. Prof.

Abstract: The possibilities of using infrared and Raman microspectroscopic techniques for identification of selected red dyes contained in the colour layers of oil paintings were studied and critically discussed. The samples involved aged and non-aged model materials, containing kamala, logwood, cochineal, madder and lac dyes. The specific spectral bands found for the dyes were compared with the vibrational bands of their principal colouring components. The results indicate that IR microspectroscopy permits the identification of lac (the bands at 1715, 1378, 1309, 834, 812 and 774 cm-1), kamala (the bands at 1551, 1346, 1167 and 1130 cm-1), and logwood (the bands at 1503, 1476, 1293, 1209 and 1056 cm-1), even in the spectra of aged model samples. The characteristic vibrational bands of the principal colouring components of madder and cochineal are hidden under the matrices of these dyes. The Raman microspectroscopy only permits reliable identification of kamala (the bands at 1626, 1600, 1573, 1552 and 1001 cm-1) and logwood (the bands at 1607, 1565, 1413, 1394 and 701 cm-1). Both the microspectroscopic methods are suitable for identification of kamala in model samples of colour layers containing inorganic white dyes.

*Manuscript
Click here to view linked References

A Critical Evaluation of the Potentialities of Infrared and Raman Microspectroscopy for Identification of Some Red Organic Dyes in Model Colour Layers of Works of Art

Eva Svobodová[1], Zuzana Bosáková[1,]*, Martina Ohlídalová[2], Miroslava Novotná[2], Ivan Němec[3]

[1]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030, Prague 128 43, Czech Republic
[2]Laboratory of Molecular Spectroscopy, Central Laboratories at the Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Prague 166 28, Czech Republic
[3]Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030, Prague 128 43, Czech Republic

*corresponding author: e-mail: bosakova@natur.cuni.cz, phone: +420-221 951 231, fax: +420-224 913 538, address: Assoc. Prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc., Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030, Prague 128 43, Czech Republic

Abstract
The possibilities of using infrared and Raman microspectroscopic techniques for identification of selected red dyes contained in the colour layers of oil paintings were studied and critically discussed. The samples involved aged and non-aged model materials, containing kamala, logwood, cochineal, madder and lac dyes. The specific spectral bands found for the dyes were compared with the vibrational bands of their principal colouring components. The results indicate that IR microspectroscopy permits the identification of lac (the bands at 1715, 1378, 1309, 834, 812 and 774 cm^{-1}), kamala (the bands at 1551, 1346, 1167 and 1130 cm^{-1}), and logwood (the bands at 1503, 1476, 1293, 1209 and 1056 cm^{-1}), even in the spectra of aged model samples. The characteristic vibrational bands of the principal colouring components of madder and cochineal are hidden under the matrices of these dyes. The Raman microspectroscopy only permits reliable identification of kamala (the bands at 1626, 1600, 1573, 1552 and 1001 cm^{-1}) and logwood (the bands at 1607, 1565, 1413, 1394 and 701 cm^{-1}). Both the microspectroscopic methods are suitable for identification of kamala in model samples of colour layers containing inorganic white dyes.

Key words: red organic dyes, IR spectroscopy, Raman spectroscopy, identification

1. Introduction

Natural organic dyes are widely employed, primarily for the production of organic pigments and lacquers, owing to their colour intensity and insolubility in water. In the past, they were most often used to colour stained textiles by extracting the dye from a plant or an animal and by precipitating it on a suitable inorganic substrate. Most natural organic dyes are derivatives of indole (blue shades), phenol (yellow shades) or quinone (red shades) and have very similar chemical structures. The colouration of a particular dye is determined by the presence of some of the above derivatives, forming the so-called main colouring component [1-4].

To identify the dyes, electrochemical (voltammetry [5]), separation and spectrometric methods are used. Efficient separation techniques involve thin-layer chromatography [6], electromigration methods [6,7] (zone capillary electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography) and, primarily, high-performance reversed-phase liquid chromatography with UV photometric or mass-spectrometric detection [8-12]. The spectrometric methods applied to this task are molecular absorption spectrometry in UV and visible ranges [9, 13-15]. Infrared spectroscopy [16,17] (most often with Fourier transformation [18,19] and sometimes using the ATR crystal [20,21]) are frequently utilized for analyses of structurally different organic dyes. The Raman spectroscopy can also be used, however, organic dyes often exhibit pronounced fluorescence which complicates or even prevents the evaluation of the spectra. Therefore, the SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy) [22-27] and SERRS (surface-enhanced resonance Raman spectroscopy) [28-

31], or FT-Raman spectroscopy [32] are often used, because they decrease the fluorescence background.

1.1 Dyes

The main colouring component of the lac dye is the mixed laccaic acid (forms A to E, with major A form - see Fig. 1). The IR spectrum of laccaic acid (Natural Red 25) [33] primarily exhibits deformation vibrations of CH_2 and CH_3 groups in the region of 1500 - 350 cm^{-1}, vibrations of COO^- groups in conjugation with the C=C bonds of the aromatic nucleus in the region of 1720 - 1570 cm^{-1}, vibrations of O-H groups around 3300 cm^{-1} and vibration of the C-O bond in the region of 1100-1050 cm^{-1}. The cochineal dye is obtained from dried tips of fertilized females of the *Coccus cacti* species. The dye used is either an extract containing the main colouring component, carminic acid (or carmine), or directly crushed backs of the species which also contain proteins and quinine. Carminic acid also contains, in contrast to carmine, a glycosidic group which increases the intensity of bands in the region of 1100-1000 cm^{-1} [33,34]. Further intense bands can be found in the regions of 1620 - 1550 and 1450 - 1250 cm^{-1}. The madder dye is obtained from the *Rubia tinctorum* plant and contains two chemically similar colouring components alizarin and purpurin (see Fig. 1). The IR spectrum of the major dye, alizarin, contains very sharp bands, corresponding primarily to the vibrations of the C-H, C=O, C=C and C-O groups (characteristic bands at 1463, 1350, 1331, 1303, 1200 and 712 cm^{-1}). The main colouring component of the logwood dye is haematein, with vibrational bands at 1607, 1537, 1514, 1441, 1418, 1377, 1298, 1225, 1207, 1171 and 1066 cm^{-1} [33]. These bands are very intense and correspond to the vibrations of the C=C, COO^- and C-H groups. The main colouring component of the kamala dye is rottlerin, whose spectrum contains many intense bands in the regions around 3300 and 1700-1000 cm^{-1} [33], caused by the vibrations of O-H, C=C, C-H and C=O groups [34].

Natural dyes contain various organic and inorganic substances. The vibrational bands of them, especially those of proteins, saccharides, synthetic binders, whites and other inorganic pigments, cover the vibrational bands of the main colouring component and make its identification difficult [34]. The use of microscopic IR and Raman spectroscopy makes it, however, possible to find in the sample, which is a more or less heterogeneous, site at which the dye concentration is high and its spectrum is not disturbed by the environment. These techniques are limited by the size of the area monitored and by the possibilities of focusing the beam on the selected sample site containing only the grains of the organic dye.

1.2 White pigments

The most common whites, which have been used to prepare model samples of the coloured layer, are chalk ($CaCO_3$), lead white ($2PbCO_3.Pb(OH)_2$), zinc white (ZnO) and titanium white (TiO_2). The IR spectrum of chalk contains four pronounced vibrational bands at 1440, 1083, 1022 and 878 cm^{-1} [35]. The Raman spectrum of chalk exhibits pronounced bands at 1097, 1088 and 299 cm^{-1} [35]. The lead white has very rich IR and Raman spectra. The IR spectrum contains the most intense band at 1405 cm^{-1} and medium intense bands at 3541, 1114 and 1076 cm^{-1}. The Raman spectrum exhibits the most pronounced bands in the region of 1071 - 978 cm^{-1} [35]. On the other hand, zinc and titanium whites have very poor IR and Raman spectra, the most intense bands can be found at wavenumbers below 620 cm^{-1} [35] and thus the vibrational bands of the organic dyes studied are not obscured. The real effect of the presence of the whites discussed on the dye identification was verified on mixtures of kamala with the whites and linseed oil.

1.3 Linseed oil

The IR spectrum of polymerized linseed oil, which is most often used as the binder, consists primarily of more intense vibrational bands corresponding to C=O and C-H groups [20,34]. The wavenumbers of these bands are 3004, 2935, 2855, 1749, 1627, 1464, 1377, 1233, 1167, 1101, 968 and 723 cm^{-1}.

1.4 Scope of the present work

To critically evaluate the possibilities of identification of organic dyes in colour layers of works of art by various methods of vibrational spectroscopy, the kamala, logwood, cochineal, madder and lac dyes have been selected. They contain a primarily anthraquinone skeleton. Their spectra are similar, due to structural similarity of the main colouring components of the dyes (Fig. 1).

To find the specific bands for the dyes, the spectral behaviour of their colouring components was studied first and compared with the spectra of the dyes themselves. The methodical approach to identification of red organic dyes by microscopic IR and Raman spectroscopy was applied to non-aged and aged model samples of the colour layer.

2 Materials and methods

2.1 Reagents

The kamala and madder dyes were obtained from Kremer Pigmente GmbH & Co. KG, Germany. The cochineal dye - dried tips of *Coccus cacti* - was purchased from Sandragon, s.r.o., Czech Republic. The other dyes, logwood and lac, and the ZnO, TiO_2, $2PbCO_3.Pb(OH)_2$ and chalk ($CaCO_3$) whites were provided by the Department of Chemical Technology of Monument Conservation, Institute of Chemical Technology, Prague. Standard substances of the colouring compounds, carmine, carminic acid, laccaic acid (Natural Red 25), haematein and rottlerin were supplied by Sigma-Aldrich, Germany. Purpurin (1,2,4-trihydroxy-9,10-anthraquinone) was purchased from Fluka Chemie, Germany, and alizarin (1,2-dihydroxy-9,10-anthraquinone) was obtained from the Microbiological Institute, Academy of Sciences of the Czech Republic [12].

Undeclared data on the purity of the standard substances of the colouring agents and dyes were determined by the XRF analysis. Polymerized linseed oil (Umton Barvy, Czech Republic) was used for the preparation of model samples of colour layers.

2.2 Model samples and UV treatment

The model samples of colour layers were prepared by deposition of a dense paste of a colouring agent in polymerized linseed oil (5 to 30 % vol. of the dye) on a glass support and its two month storage in the air, until the homogeneous film was formed. Mixtures of kamala with the whites (zinc, titanium and lead whites and chalk) were prepared analogously in polymerized linseed oil, at dye : white : oil ratios of 1 : 2 : 5 or 1 : 2 : 10. The model samples were then subjected to artificial ageing in an illumination chamber, by irradiation with a Philips TL20W/09N lamp in visible and near ultraviolet region (ca. 300 - 450 nm), for 300 hours. The temperature of the sample surface during irradiation was approx. 25 ± 2 deg. of Celsius and the humidity of the air in the chamber amounted to 15 ± 5 %.

2.3 IR and Raman spectroscopy

For the measurements on the model samples of colour layers, the samples were deposited on a steel support and spread to form a thin layer. In the measurements of the spectra of the dyes alone and of their main colouring components, the samples on the support were subjected to no treatment.

Microscopic measurements of the IR spectra were carried out using the technique of reflexion absorption, minimizing possible reflexion deformation of the bands. A Bruker IFS 66v FTIR spectrometer with a Hyperion IR microscope and an automated scanning table, or a Nicolet 6700 FTIR spectrometer with a Continuum microscope were employed. The measurements were performed over a 650 to 4000 cm^{-1} range, with spectral resolution of 4 cm^{-1} and with 128 scans on average. The Raman spectra were measured using a Jobin-Yvon Labram HR instrument, with an Olympus confocal microscope and a CCD detector. The spectra were obtained after calibration for silicon (the pronounced band at 520.50 cm^{-1}), under these conditions: hole, 1000 μm, slit, 100 μm, grid, 600, and magnification, 50x. The measuring range was 300 to 2000 cm^{-1}, when using a diode

laser (785 nm) and a frequency-doubled Nd:YAG laser (532 nm). The spectra were treated by the OMNIC software, version 7.3.

3 Results and discussion

3.1 Lac dye

First, the IR spectrum of the lac dye was measured (see Fig. 2), which is basically identical with the vibrational bands of laccaic acid [33]. Therefore, the lac dye spectrum contains bands at wavenumbers of 1715, 1623, 1575, 1506, 1453, 1409, 1378, 1309, 1243, 1099 and 1051 cm^{-1}. In the Raman spectra of pure laccaic acid, excited by the 532 nm laser, the bands of the colouring component are hidden under strong fluorescence. When using the 785 nm laser, characteristic vibrational bands were recorded at 1574, 1463, 1234, 1097, 454 and 408 cm^{-1}. The Raman spectra of the actual lac dye could not be obtained with any of the lasers used due to strong fluorescence.

The vibrational bands of lac dye, corresponding to the vibrations of laccaic acid, the principal colouring component of the dye, can also be found in the IR spectrum of the model sample of the mixture of lac with polymerized linseed oil, at wavenumbers of 1625, 1573, 1409, 1309 and 1057 cm^{-1}. Identification was not prevented even by accelerated ageing which was not strong enough to cause massive photochemical degradation [21]. To identify the lac dye in the aged model sample (Fig. 2A), further vibrational bands can be used, at wavenumbers of 1509, 1014, 830, 810 and 777 cm^{-1}. Surprisingly, the presence of the aged polymerized oil containing long chains of C-C bonds decreases the dye fluorescence in the Raman spectra and permits the detection of the vibrational bands of laccaic acid at 1585, 1459, 1236, 1095, 453 and 410 cm^{-1}.

3.2 Cochineal dye

Cochineal contains carminic acid as the principal colouring component (see Fig. 1). The IR spectrum of carminic acid exhibits, in agreement with ref. [33], vibrational bands at wavenumbers of 1576, 1452, 1380, 1350, 1271, 1085, 1046 and 1006 cm^{-1}. A similar spectrum (bands at 1646, 1602, 1564, 1469, 1410, 1290, 1254, 1080, 1049 and 1009 cm^{-1}), with somewhat different band intensities, is found for carmine, which is sometimes considered to be carminic acid (see Fig. 3). Cochineal (*Coccus cacti*) exhibits very intense bands of its organic matrix at wavenumbers of 1628, 1566, 1460, 1414, 1078, 1051 and 1024 cm^{-1} in its IR spectrum (Fig. 3D). The vibrational bands of carminic acid are thus minority ones, due to being overlapped by the bands generated in the insect skeleton. The Raman spectra can only be obtained when the 785 nm laser is used for excitation, similar to the case of laccaic acid. Carminic acid can be identified, in spite of the high background fluorescence, on the basis of the vibrational bands at wavenumbers of 1466, 1220, 452 and 430 cm^{-1} (Fig. 4C). The Raman spectrum of carmine is richer and contains vibrational bands at wavenumbers of 1527, 1487, 1423, 1358, 1316, 1252, 1110, 567, 471 and 424 cm^{-1} (Fig. 4B). The high fluorescence of cochineal makes its identification by Raman spectroscopy impossible.

To prepare a model sample of the colour layer, carmine alone was used because it does not contain an organic matrix. In the IR spectrum of a mixture of carmine with polymerized linseed oil, the carmine vibrational bands are obscured by those of the oil. Accelerated ageing of the model sample causes a decrease in the intensity of the oil vibrational bands and increased visibility of the carmine ones, at wavenumbers of 1645, 1605, 1566, 1417 and 1292 cm^{-1} (Fig. 3A). The Raman spectrum of the aged model sample (Fig. 4A) contains vibrational bands at 1485, 1441, 1308, 1252, 1083, 574 and 463 cm^{-1}, which can also be found in the carmine Raman spectrum (Fig. 4B).

3.3 Madder dye

The IR spectrum of alizarin (one of the principal colouring components of madder) exhibits vibrational bands at wavenumbers of 1634, 1591, 1463, 1350, 1331, 1303, 1162 and 712 cm^{-1} (Fig. 5B) which basically agree with published spectra [19,20,33]. The IR spectrum of a further colouring component, purpurin (Fig. 5C) is identical with the database spectrum [33] and contains bands at wavenumbers of 1618, 1581, 1456, 1433, 1329, 1279, 1246, 1201 and 1167 cm^{-1}. On the other

hand, the Raman spectrum of alizarin contains more vibrational bands than that of purpurin in a range from 1100 to 1660 cm^{-1}. The bands are located at 1658, 1632, 1587, 1568, 1457, 1401, 1294, 1216, 1191, 1162, 682, 660, 468, 418, 359 and 345 cm^{-1} for alizarin (an agreement with ref. [13]), and at 1466, 1330, 1252, 1068, 453 and 417 cm^{-1} for purpurin. The madder dye itself (Fig. 5A) exhibits pronounced wide vibrational bands in its IR spectrum, which obscure the most intense bands of alizarin and purpurin. These bands correspond to hydrated binary inorganic sulphates, on the surface of which the dye is precipitated. High fluorescence of the madder dye in its Raman spectra prevents its identification; this holds for both the excitation lasers.

Therefore, only IR spectroscopy was used to identify the colouring components in the model sample of madder mixture with polymerized oil. The spectrum of this mixture exhibits only three vibrational bands which can be attributed to alizarin, at wavenumbers of 1595, 1337 and 1268 cm^{-1}. These bands can also be used to identify alizarin in the spectrum of the model sample after accelerated ageing.

3.4 Logwood dye

The IR spectrum of haematein (Fig. 6C), the main colouring component of logwood, contains bands at 1607, 1537, 1514, 1441, 1418, 1377, 1298, 1207, 1171 and 1066 cm^{-1}, which also predominate in the spectrum of logwood itself (Fig. 6B). However, the logwood spectrum, compared to that of haematein, misses the pronounced bands at 1535 and 1415 cm^{-1}, corresponding to vibrations of the COO^- and CH_2 groups, respectively. The Raman spectrum of haematein (only that obtained for excitation by the 532 nm laser - Fig. 7C) contains vibrational bands at wavenumbers of 1607, 1566, 1415, 1396, 1252, 1172, 770, 701, 633, 544 and 478 cm^{-1}. These bands are also found in the spectrum of the logwood dye itself (Fig. 7B).

The IR spectrum of the model sample of the logwood mixture with polymerized linseed oil has many vibrational bands obscured by the bands of the polymerized oil, but some bands of logwood and haematein can be found at 1605, 1503, 1476, 1322, 1295, 1262, 1210, 1120 and 1059 cm^{-1}. The logwood dye can again be identified in the aged model sample, at wavenumbers of 1612, 1504, 1321, 1285 and 1059 cm^{-1} (Fig. 6A). The logwood dye can also be identified in the Raman spectrum of the aged model sample (Fig. 7A), using excitation by the 532 nm laser. The spectrum of the mixture is identical with the spectra of logwood and haematein.

3.5 Kamala dye

The main colouring component of kamala dye is rottlerin (see Fig. 1). The rottlerin IR spectrum (Fig. 8C) contains vibrational bands at 1623, 1605, 1590, 1551, 1348, 1285, 1172 and 1132 cm^{-1}, which also predominate in the spectrum of the kamala dye itself (Fig. 8B).

The Raman spectrum of rottlerin (Fig. 9C) contains a number of characteristic bands at 1627, 1597, 1551, 1476, 1300, 1206, 1178, 1142, 1060, 998, 971, 860, 753, 580, 556, 478, 447, 400 and 368 cm^{-1}. The kamala dye exhibits many vibrational bands of rottlerin in its spectrum (Fig. 9B), the most pronounced being three bands, at 1626, 1600 and 1552 cm^{-1}.

The IR spectrum of the model kamala mixture with linseed oil (Fig. 8A) contains significant vibrational bands even after accelerated ageing, at 1552, 1347, 1286, 1130 and 1060 cm^{-1}, which can be used for the identification purposes. The band at 1167 cm^{-1} is not particularly characteristic and thus cannot be utilized for identification purposes.

As follows from the above text, the kamala dye is readily identifiable by both IR and Raman spectroscopy. Therefore, it was selected for evaluation of the effect of the presence of whites, which are commonly used in painting and which produce very strong vibrational bands (see, e.g., Fig. 10A-D), on its identification in the model samples. The microscopic techniques permit location of a grain of organic dye and recording of its spectrum even in the matrices of model samples containing inorganic whites. The IR spectra depicted in Fig. 11 were obtained on samples of model mixtures of the kamala dye with the whites studied and with the polymerized linseed oil (the dye : white : oil ratio equals 1 : 2 : 10), after accelerated ageing of the mixtures. The kamala identification is unequivocal in all the cases, thanks to the finding of specific vibrational bands in the region, 1000 -

1630 cm^{-1}. Analogously, the micro-Raman spectra provided only the kamala characteristic bands at 1625, 1600, 1550 and 998 cm^{-1}.

4 Conclusions

The possibilities of identification of the studied red dyes by microscopic techniques of IR and Raman spectroscopy and the characteristic vibrational bands are listed in Table 1. It can be seen from this table that IR microspectroscopy permits identification of lac, kamala and logwood dyes even in aged model samples of oil paintings. The characteristic vibrational bands are located at 1551, 1346, 1167 and 1130 cm^{-1} for the kamala dye, at 1503, 1476, 1293, 1209 and 1056 cm^{-1} for the logwood dye, and at 1715, 1378, 1309, 834, 812 and 774 cm^{-1} for the lac dye. The madder and cochineal characteristic vibrational bands are completely masked by the organic matrices or by the vibrational manifestations of the insect skeleton. The Raman microspectroscopy permits unambiguous identification of only those dyes which do not produce too high fluorescence. Among the studied dyes, only kamala (characteristic bands at 1626, 1600, 1573,1552 and 1001 cm^{-1}) and logwood (characteristic bands at 1607, 1565, 1413, 1394 and 701 cm^{-1}) satisfy this condition. With kamala it has been demonstrated that microscopic techniques of IR and Raman spectroscopy can be successfully used to identify dyes in model samples containing commonly used inorganic whites.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Grant Agency of Charles University in Prague (project SVV 261204) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Long-term research plan No. MSM0021620857 and RP 14/63). Professor Karel Štulík is thanked for translation of the manuscript into the English.

References

1. Čopíková J, Uher M, Lapčík O, Moravcová J, Dražar P. [Natural Colorants]. Chemické Listy 2005;99(11);802-16. Czech.
2. Šimůnková E, Bayerová T. [Pigments]. 1st ed. Praha: STOP; 1999. Czech.
3. Hřebíčková BA. Recepty starých mistrů aneb Malířské postupy středověku. 1st ed. Brno: Computer Press; 2006. Czech.
4. Wyplosz N. Laser desorption mass spectrometric studies of artists' organic pigments. 1st ed. Amsterdam: MolArt; 2003.
5. Grygar T, Kučková Š, Hradil D, Hradilová J. Electrochemical analysis of natural solid organic dyes and pigments. J Solid State Electrochem 2003;7(10);706-13.
6. Watanabe T, Terabe S. Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis. J Chromatogr, A 2000;880(1-2);311-22.
7. Puchalska M, Orlińska M, Ackacha MA, Połeć-Pawlak K, Jarosz M. Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. J Mass Spectrom 2003;38(12);1252-8.
8. Sanyova J. Mild extraction of dyes by hydrofluoric acid in routine analysis of historical paint micro-samples. Microchim Acta 2008;162(3-4);361-70.
9. Karapanagiotis I, Lakka A, Valianou L, Chryssoulakis Y. High-performance liquid chromatographic determination of colouring matters in historical garments from the Holy Mountain of Athos. Microchim Acta 2008;160(4);477-83.

10. Clementi C, Nowik W, Romani A, Cibin F, Favaro G. A spectrometric and chromatographic approach to the study of ageing of madder (*Rubia tinctorum* L.) dyestuff on wool. Anal Chim Acta 2007;596(1);46-54.
11. Novotná P, Pacáková V, Bosáková Z, Štulík K. High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. J Chromatogr, A 1999;863(2);235-41.
12. Bosáková Z, Peršl J, Jegorov A. Determination of lucidin in Rubia tinctorum aglycones by an HPLC method with isocratic elution. J High Resolut Chromatogr 2000;23(10);600-2.
13. Murcia-Mascarós S, Domingo C, Sanchez-Cortes S, Cañamares MV, Garcia-Ramos JV. Spectroscopic identification of alizarin in a mixture of organic red dyes by incorporation in Zr-Ormosil. J Raman Spectrosc 2005;36(5);420-6.
14. Kandelbauer A, Kessler W, Kessler RW. Online UV-visible spectroscopy and multivariate curve resolution as powerful tool for model-free investigation of laccase-catalysed oxidation. Anal Bioanal Chem 2008;390(5);1303-15.
15. Bettinger C, Zimmermann HW. New investigations on hematoxylin, hematein, and hematein-aluminium complexes. 1. Spectroscopic and physico-chemical properties of hematoxylin and hematein. Histochemistry 1991;95(3);279-88.
16. Tütem E, Apak R, Sözgen K. The interaction of antitumor-active anthraquinones with biologically important redox couples: I. Spectrophotometric investigation of the interaction of carminic acid and mitoxantrone with the iron (II, III) and copper (I, II) redox couples. J Inorg Biochem 1996;61(2);79-96.
17. Kučková Š, Němec I, Hynek R, Hradilová J, Grygar T. Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works. Anal Bioanal Chem 2005;382(2);275-82.
18. Hovaneissian M, Archier P, Vieillescazsn C. Influence of cetophenolic and diphenolic intramolecular hydrogen bonding on the chromatographic and spectroscopic properties of hydroxyanthraquinones. Dyes Pigm 2007;74(3);706-12.
19. Holmgren A, Wu LM, Forsling W. Fourier transform infrared and Raman study of Alizarin Red S adsorbed at the fluorite-water interface. Spectrochim Acta, Part A 1999;55(9);1721-30.
20. Marengo E, Liparota MC, Robotti E, Bobba M. Multivariate calibration applied to the field of cultural heritage: Analysis of the pigments on the surface of a painting. Anal Chim Acta 2005;553(1-2);111-22.
21. Marengo E, Liparota MC, Robotti E, Bobba M, Gennaro MC. Monitoring of pigmented surfaces in accelerated ageing process by ATR-FT-IR spectroscopy and multivariate control charts. Talanta 2005;66;1158-67.
22. Cañamares MV, Garcia-Ramos JV, Gómez-Varga JD, Domingo C, Sanchez-Cortes S. Ag nanoparticles prepared by laser photoreduction as substrates for in situ surface-enhanced raman scattering analysis of dyes. Langmuir 2007;23(9);5210-5.

23. Whitney AV, Casadio F, Van Duyne RP. Identification and Characterization of Artists' Red Dyes and Their Mixtures by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Appl Spectrosc 2007;61(9);994-1000.
24. Chen K, Leona M, Vo-Dinh KC, Yan F, Wabuyele MB, Vo-Dinh T. Application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the identification of anthraquinone dyes used in works of art. J Raman Spectrosc 2006;37(4);520-7.
25. Leona M, Stenger J, Ferloni E. Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art. J Raman Spectrosc 2006;37(10);981-992.
26. Whitney AV, Van Duyne RP, Casadio F. An innovative surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method for the identification of six historical red lakes and dyestuffs. J Raman Spectrosc 2006;37(10);993-1002.
27. Doherty B, Miliani C, Berghe IV, Sgamellotti A, Brunetti BG. Micro-Raman spectroscopic study of artificially aged natural and dyed wool. J Raman Spectrosc 2008;39(5);638-45.
28. Peica N, Kiefer W. Characterization of indigo carmine with surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids and island films, and theoretical calculations. J Raman Spectrosc 2008;39(1);47-60.
29. Shadi IT, Chowdhry BZ, Snowden MJ, Withnall R. Semi-quantitative analysis of indigo carmine, using silver colloids, by surface enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS). Spectrochim Acta, Part A 2003;59(10);2201-6.
30. Shadi IT, Chowdhry BZ, Snowden MJ, Withnall R. Semi-quantitative analysis of alizarin and purpurin by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids. J Raman Spectrosc 2004;35(8-9);800-7.
31. Shoute LCT, Loppnow GR. Excited-state dynamics of alizarin-sensitized TiO_2 nanoparticles from resonance Raman spectroscopy. J Chem Phys 2002;117(2);842-50.
32. De Oliveira LFC, Edwards HGM, Velozo ES, Nesbitt M. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. Vib Spectrosc 2002;28(2);243-9.
33. IRUG Spectral Database Edition 2000 Search Engine [internet]. The Infrared and Raman Users Group. c2003- [cited 2011 May 4]. Avaible from: http://www.irug.org/ed2k/search.asp
34. Sokrates G. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. 3th ed. London: Wiley; 2001.
35. e-VIBRATIONAL SPECTROSCOPIC DATABASES [internet]. Bilboa (ES): IBeA (Ikerkuntza eta Berrikuntza Analitikoa). [cited 2011 May 3]. Avaible from: http://www.ehu.es/udps/database/index1.html

Table

Table 1 Summary of the possibilities for identification of the studied dyes in model samples, using the methods of microscopic IR and Raman spectroscopy. Significant and specific (solid characters) vibrational bands of the dyes and their main colouring components are specified (wavenumbers, cm^{-1}). The hook - identifiable species; the cross - unidentifiable species; AG - accelerated ageing; N/A - not analyzed. Band intensity: vw - very weak; w - weak; m - medium; s - strong; vs - very strong.

method	Infrared microscopy			Raman microscopy	
sample	dye	dye with oil before AG	dye with oil after AG	dye	dye with oil after AG
logwood	✓	✓	✓	✓	✓
logwood	1611m, **1503m**, 1476m, 1445m, **1293s**, **1209s**, 1169m, **1056s**	1605s, 1504s, 1290s	1607m, 1504w, 1464m, 1290s, 1054s	1607m, **1565vs**, **1414m**, **1394s**, 701**w**, **543vw**, **477vw**	1600m, 1560vs, 1409m, 1392s, 696m, 538w, 473w
hematein	1607s, 1537s, 1514s, 1441vs, 1418vs, 1377s, 1298vs, 1207s, 1171s, 1066m			1607m, 1566vs, 1415m, 1396s, 701vw, 544w, 478w	
kamala dye	✓	✓	✓	✓	✓
kamala dye	1604vs, **1551m**, 1365m, **1346m**, 1284w, **1167m**, **1130m**	1607vs, 1549m, 1347s, 1167vs, 1130s	1606vs, 1551s, 1350vs, 1281vs, 1165vs, 1129vs	**1625vs**, 1600vs, **1550s**, **998vw**, **455w**	1625s, 1601vs, 1550s, 1000w, 454w
rottlerin	1623s, 1605vs, 1590s, 1551s, 1373w, 1348s, 1285m, 1172m, 1132m			1627vs, 1597m, 1551m, 998vw, 455w	
cochineal	✗	**N/A**	**N/A**	✗	**N/A**
cochineal	no dye bands			no spectrum	
		✗	✓	✓	✓
carmine	1646s, 1602s, 1564vs, 1469s, 1410s, 1290s, 1254m, 1080m, 1049w, 1009w, 669m		1640w, 1600w, 1564w, 1462m, 1411m	1487m, 1423m, 1316vs, 1252s, 1110w, 567vw, 471w, 424vw	1485m, 1441s, 1308vs, 1252m, 1083m, 574w, 463m
carminic acid	1576m, 1452vs, 1380m, 1350s, 1271vs, 1085vs, 1046vs, 1006m			1466vs, 1220m**,** 452m, 430m	
madder	✗	✗	✗	✗	✗
madder	1629w, 1588w, 1337m, 1297w,			no spectrum	no spectrum
alizarin	1634w, 1591m, 1463vs, 1350s, 1331vs, 1303vs, 1200m, 1162w, 1013w, 712m			1658w, 1587s, 1568m, 1457m, 1216w, 1191s, 468vs	
purpurin	1618m, 1581vs, 1456m, 1433s, 1329m, 1279vs, 1246s, 1201m, 1167s			1466vs, 1330s, 1252vs, 1068m, 453m, 417m	
lac dye	✓	✓	✓	✗	✗
lac dye	**1715w**, 1623m, 1575m, 1506w, 1443vs, 1406s, **1375s**, **1294vs**, 1237s, 1097w, 1049m	1457m, 1373m, 1101m	1618m, 1571m, 1504w, 1453s, 1403s, 1373s, 1297vs, 1240vs, 1098m, 1048m	no spectrum	no spectrum
laccaic acids	1718m, 1622s, 1571s, 1501w, 1443vs, 1406vs, 1375vs, 1294vs, 1237vs, 1097w, 1049vw			1574s, 1463vs, 1234s, 1097w, 454m, 408m	

Caption of figures:

Fig. 1 Chemical structures of the main colouring components of the red dyes studied.

Fig. 2 IR spectra of the lac dye in oil after accelerated ageing (A), of the lac dye (B) and of laccaic acid (C).

Fig. 3 IR spectra of the carmine dye mixed with oil after accelerated ageing (A), of carmine (B), of carminic acid (C) and of cochineal (*Coccus cacti*) (D).

Fig. 4 Raman spectra (excitation at 785 nm) of aged carmine-oil mixture (A), of carmine (B) and of carminic acid (C).

Fig. 5 IR spectra of madder (A), of alizarin (B) and of purpurin (C).

Fig. 6 IR spectra of the logwood dye mixed with oil after accelerated ageing (A), of the pure logwood dye (B) and of haematein (C).

Fig. 7 Raman spectra (excitation at 532 nm) of the aged model sample of logwood mixture with oil (A), of the logwood dye (B) and of its main colouring component, haematein (C).

Fig. 8 IR spectra of the kamala dye mixture with polymerized linseed oil after accelerated ageing (A), of the kamala dye (B) and of rottlerin (C).

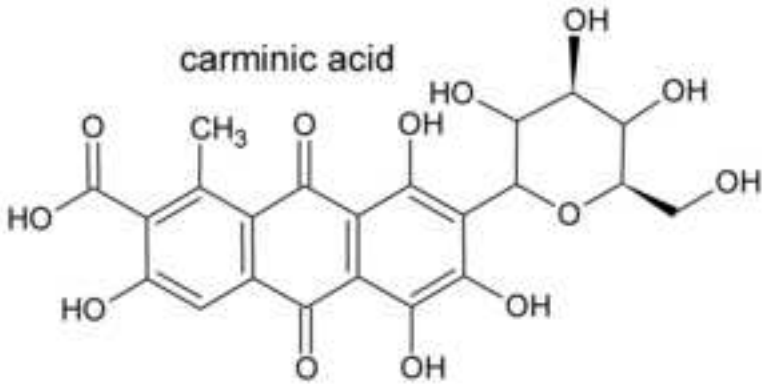
Fig. 9 Raman spectra (785 nm excitation) of the kamala dye mixture with polymerized linseed oil after accelerated ageing (A), of the kamala dye (B) and of rottlerin (C).

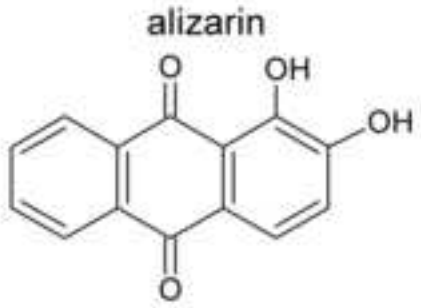
Fig. 10 IR spectra of inorganic whites (in KBr pellets) - ZnO (A), TiO_2 (B), $2PbCO_3.Pb(OH)_2$ (C), $CaCO_3$ (D) and the kamala dye alone (E).

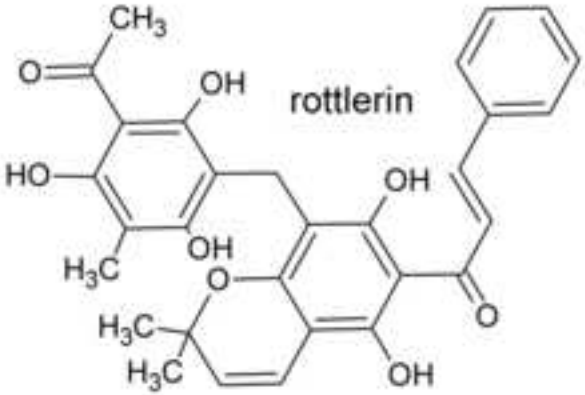
Fig. 11 IR spectra of mixtures of the kamala dye with the whites studied and with oil after accelerated ageing - ZnO (A), TiO_2 (B), $2PbCO_3.Pb(OH)_2$ (C), $CaCO_3$ (D) and the kamala dye alone (E).

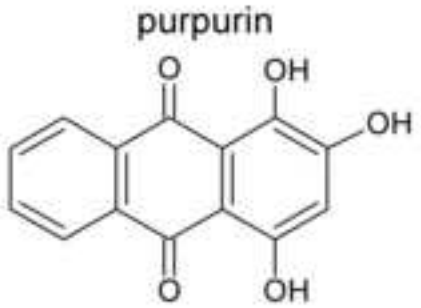
Figure

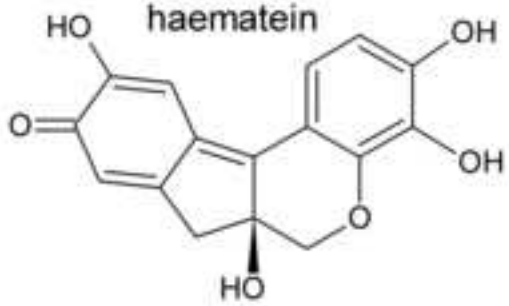
Click here to download high resolution image

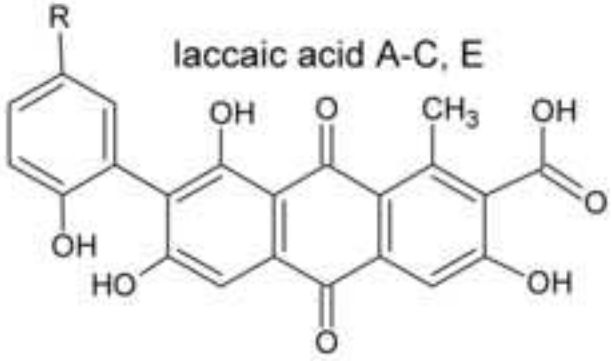




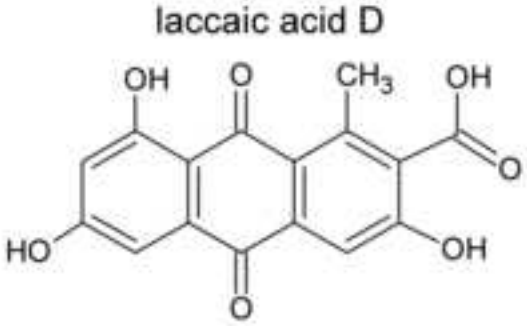




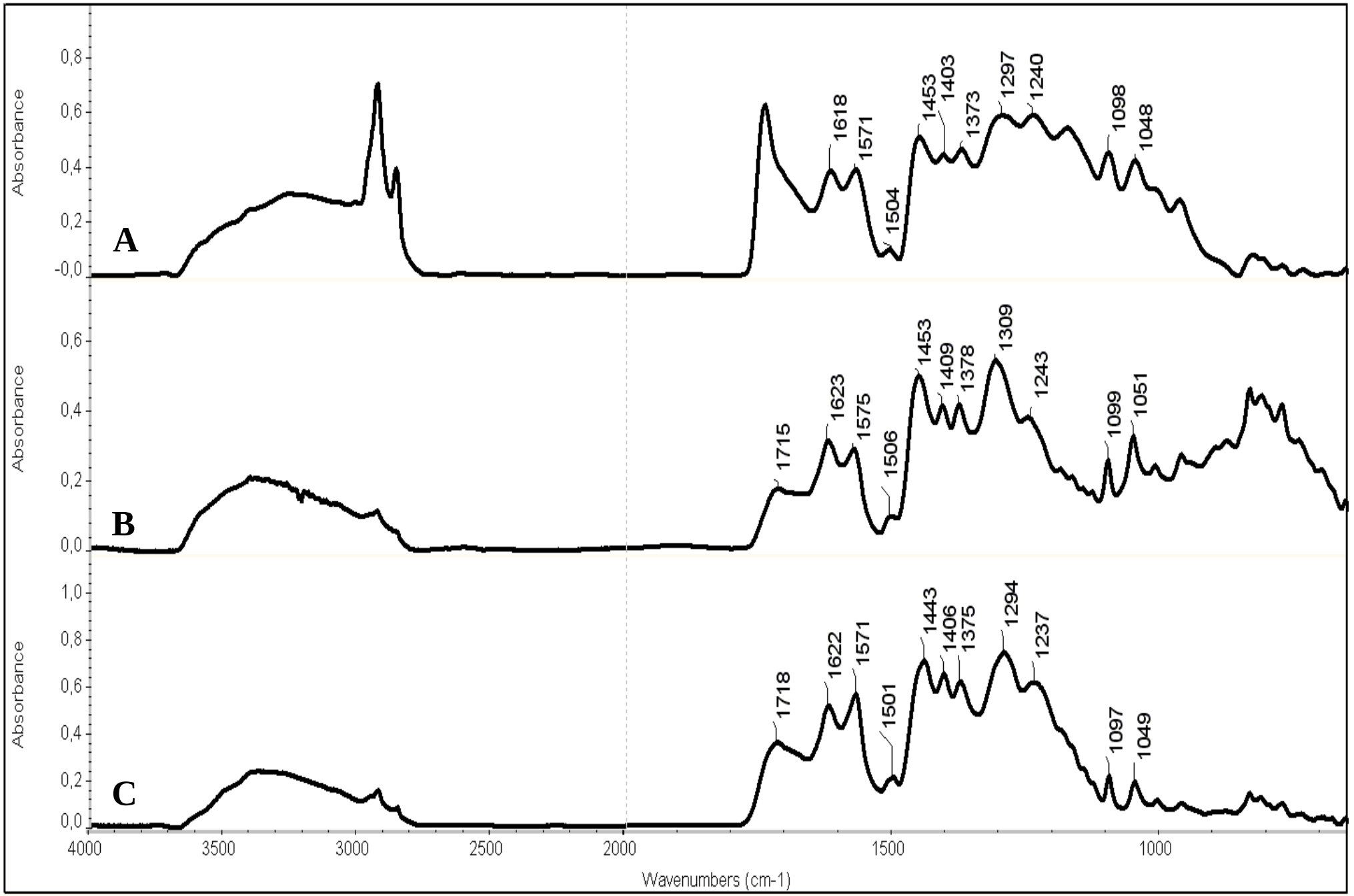




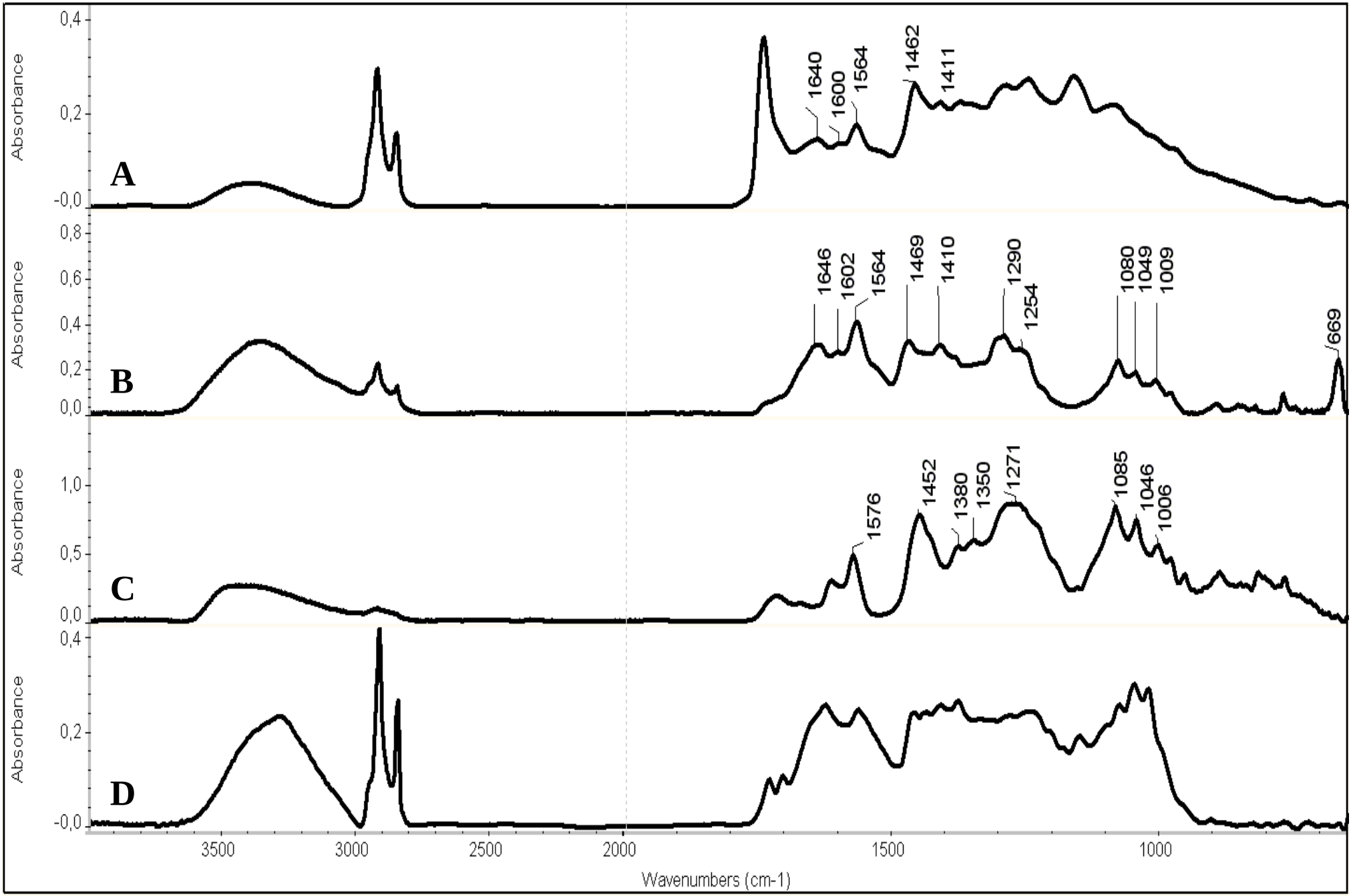
A: R = -$CH_2CH_2NHCOCH_3$
B: R = -CH_2CH_2OH
C: R = -$CH_2CH(NH_2)COOH$
E: R = -$CH_2CH_2NH_2$



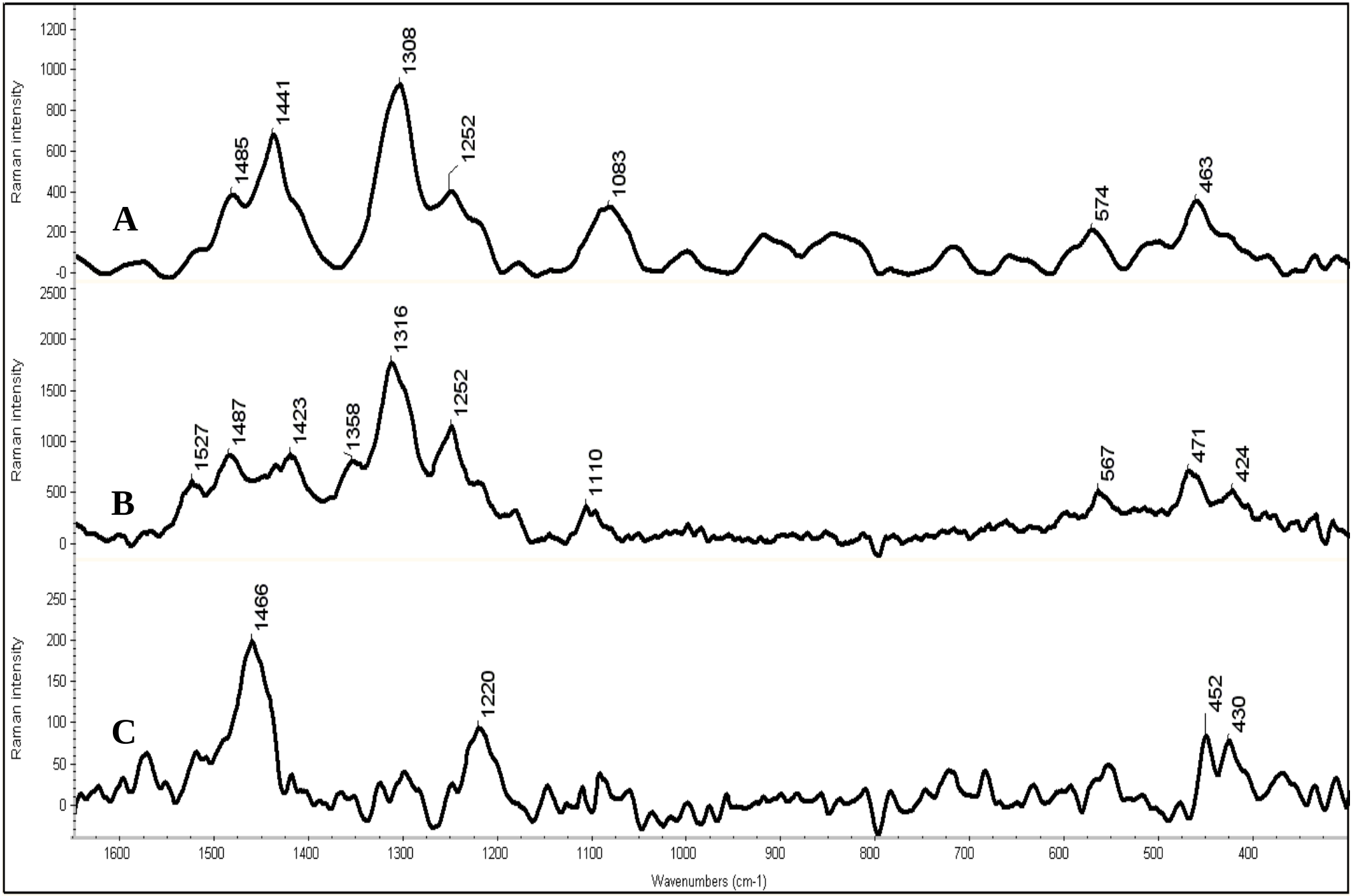
Figure


A
Absorbance
0,8
0,6
0,4
0,2
-0,0
1618
1571
1504
1453
1403
1373
1297
1240
1098
1048
B
Absorbance
0,6
0,4
0,2
0,0
1715
1623
1575
1506
1453
1409
1378
1309
1243
1099
1051
C
Absorbance
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
1718
1622
1571
1501
1443
1406
1375
1294
1237
1097
1049
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavenumbers (cm-1)

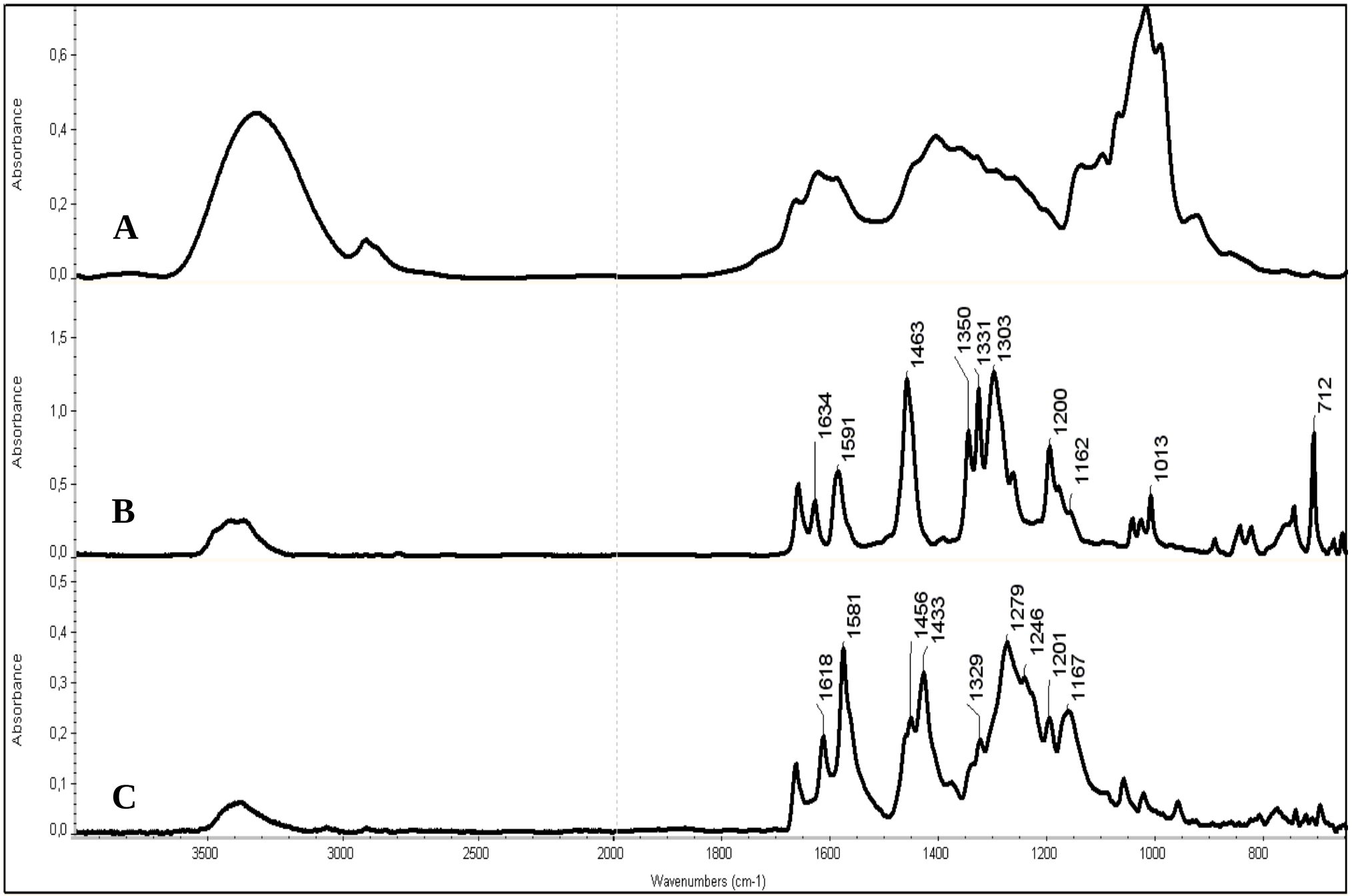
Figure


A
B
C
D
Absorbance
0,4
0,2
-0,0
0,8
0,6
0,0
1,0
0,5
1640
1600
1564
1462
1411
1646
1602
1564
1469
1410
1290
1254
1080
1049
1009
669
1576
1452
1380
1350
1271
1085
1046
1006
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavenumbers (cm-1)

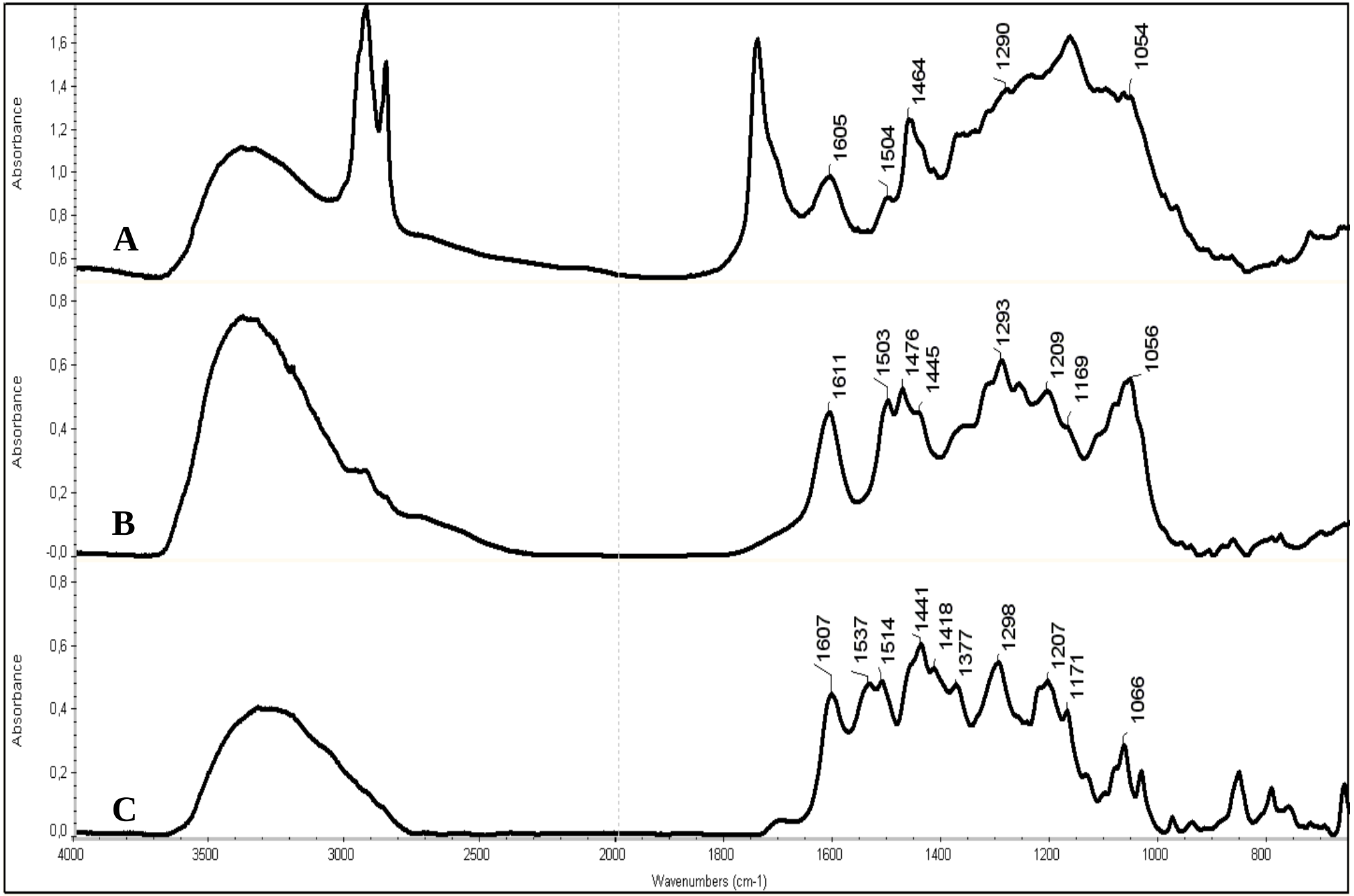
Figure


A
Raman intensity
1200
1000
800
600
400
200
-0
1485
1441
1308
1252
1083
574
463
B
Raman intensity
2500
2000
1500
1000
500
0
1527
1487
1423
1358
1316
1252
1110
567
471
424
C
Raman intensity
250
200
150
100
50
0
1466
1220
452
430
1600
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
Wavenumbers (cm-1)

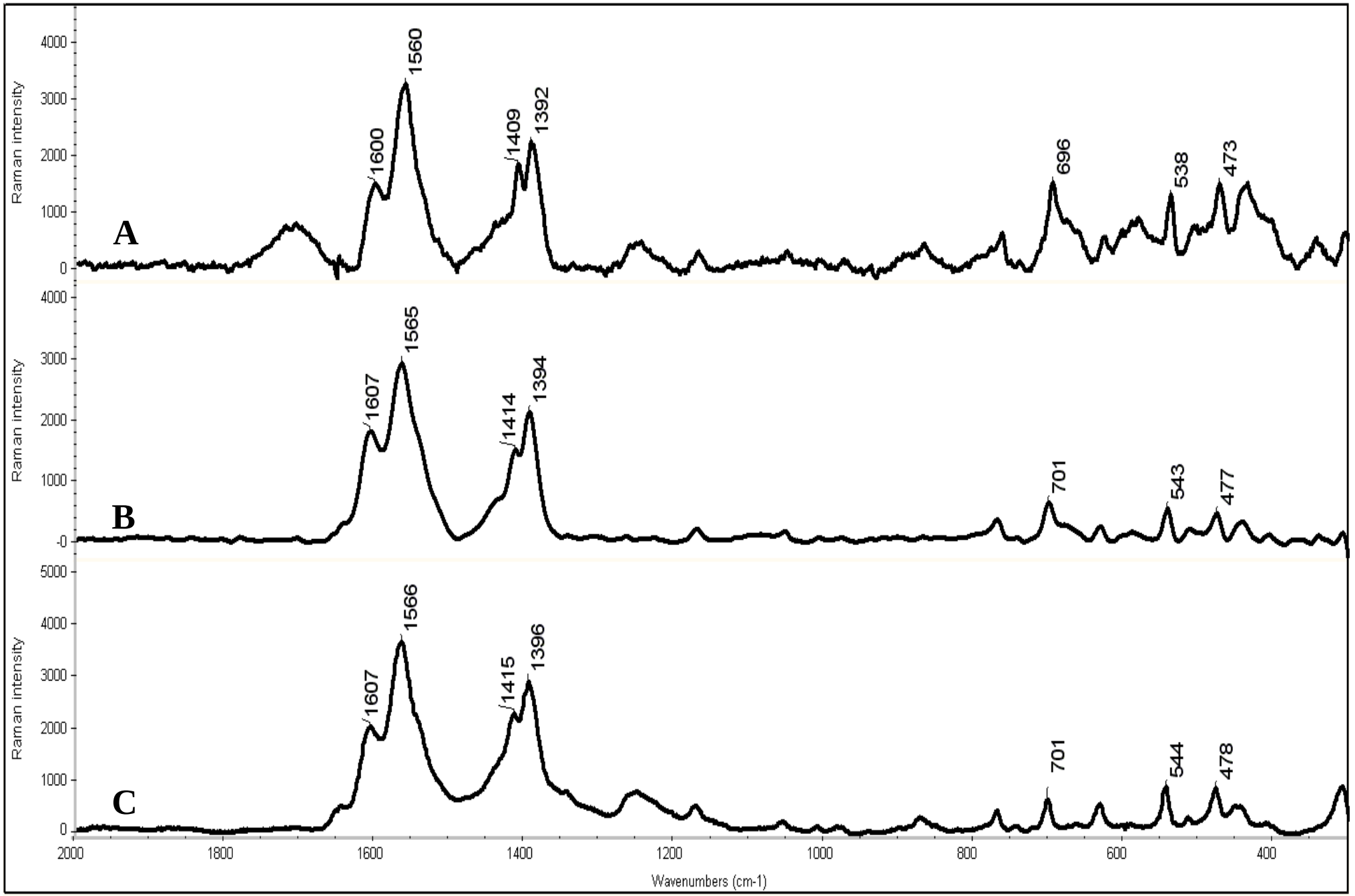
Figure


A
B
C
Absorbance
0,6
0,4
0,2
0,0
1,5
1,0
0,5
0,3
0,1
1634
1591
1463
1350
1331
1303
1200
1162
1013
712
1618
1581
1456
1433
1329
1279
1246
1201
1167
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
Wavenumbers (cm-1)

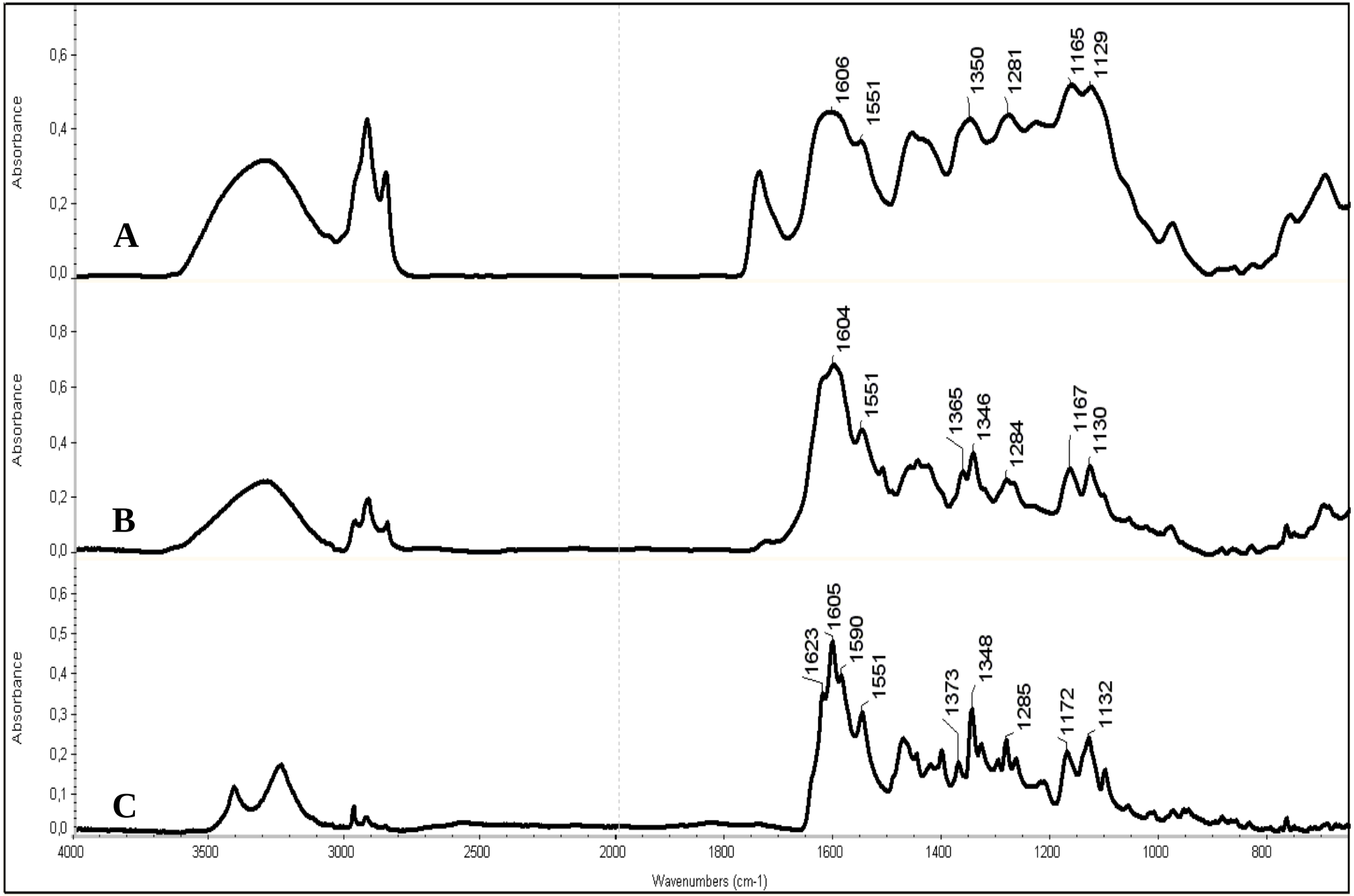
Figure


A
Absorbance
1605
1504
1464
1290
1054
B
Absorbance
1611
1503
1476
1445
1293
1209
1169
1056
C
Absorbance
1607
1537
1514
1441
1418
1377
1298
1207
1171
1066
4000
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
Wavenumbers (cm-1)

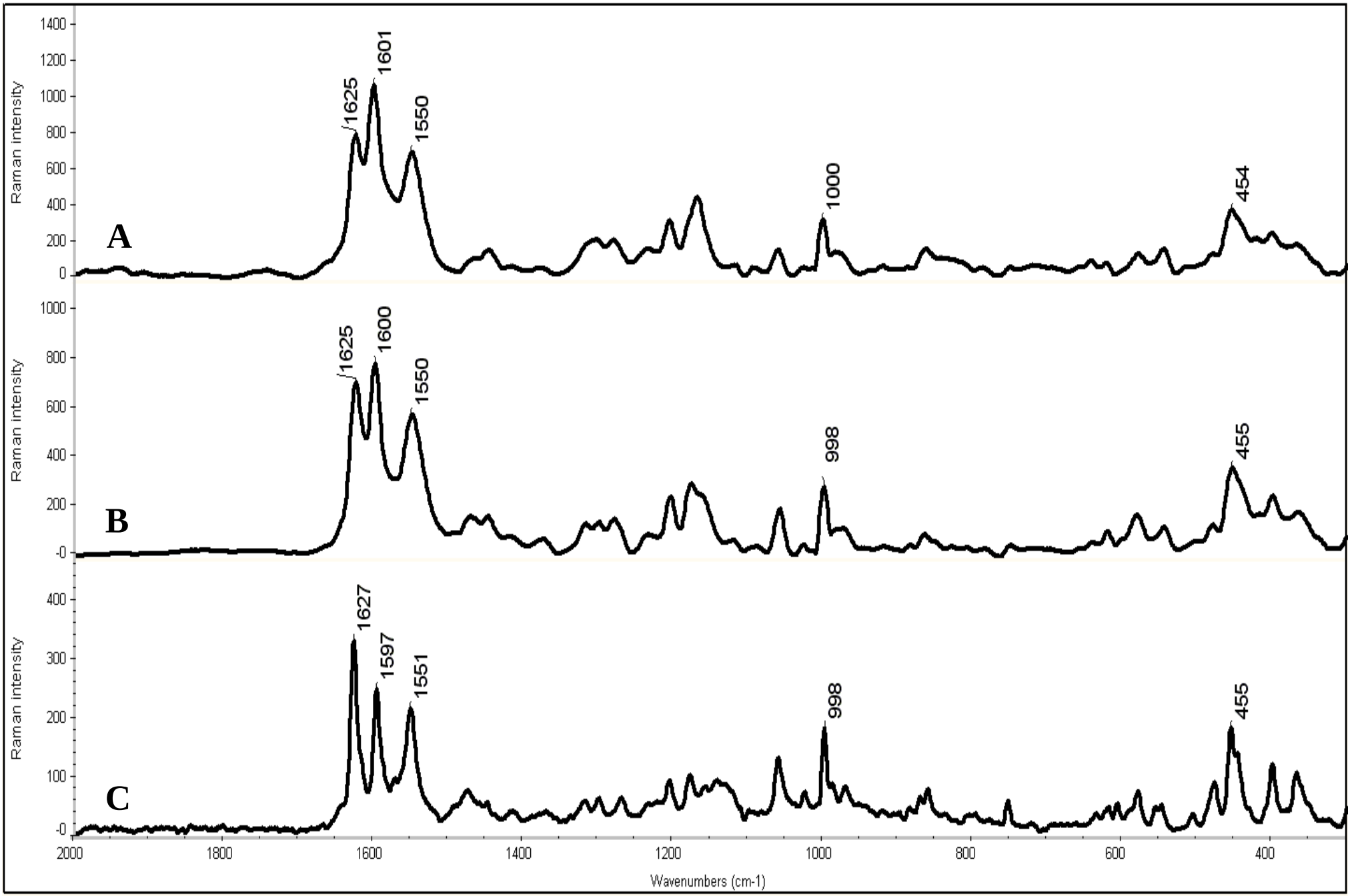
Figure


A
Raman intensity
4000
3000
2000
1000
0
1600
1560
1409
1392
696
538
473
B
Raman intensity
4000
3000
2000
1000
-0
1607
1565
1414
1394
701
543
477
C
Raman intensity
5000
4000
3000
2000
1000
0
1607
1566
1415
1396
701
544
478
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
Wavenumbers (cm-1)

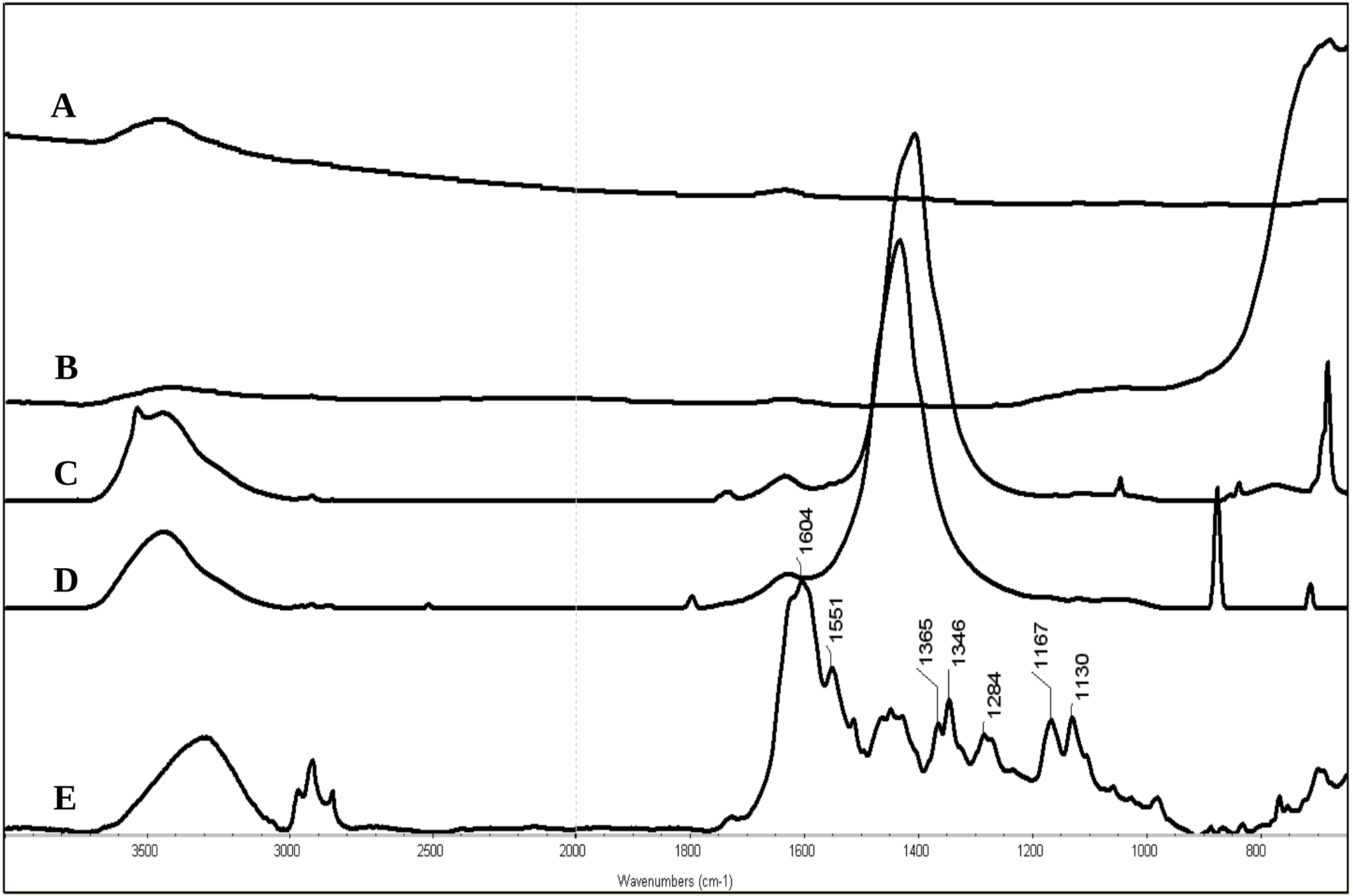
Figure


A
Absorbance
0,6
0,4
0,2
0,0
1606
1551
1350
1281
1165
1129
B
Absorbance
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
1604
1551
1365
1346
1284
1167
1130
C
Absorbance
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
1623
1605
1590
1551
1373
1348
1285
1172
1132
4000
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
Wavenumbers (cm-1)

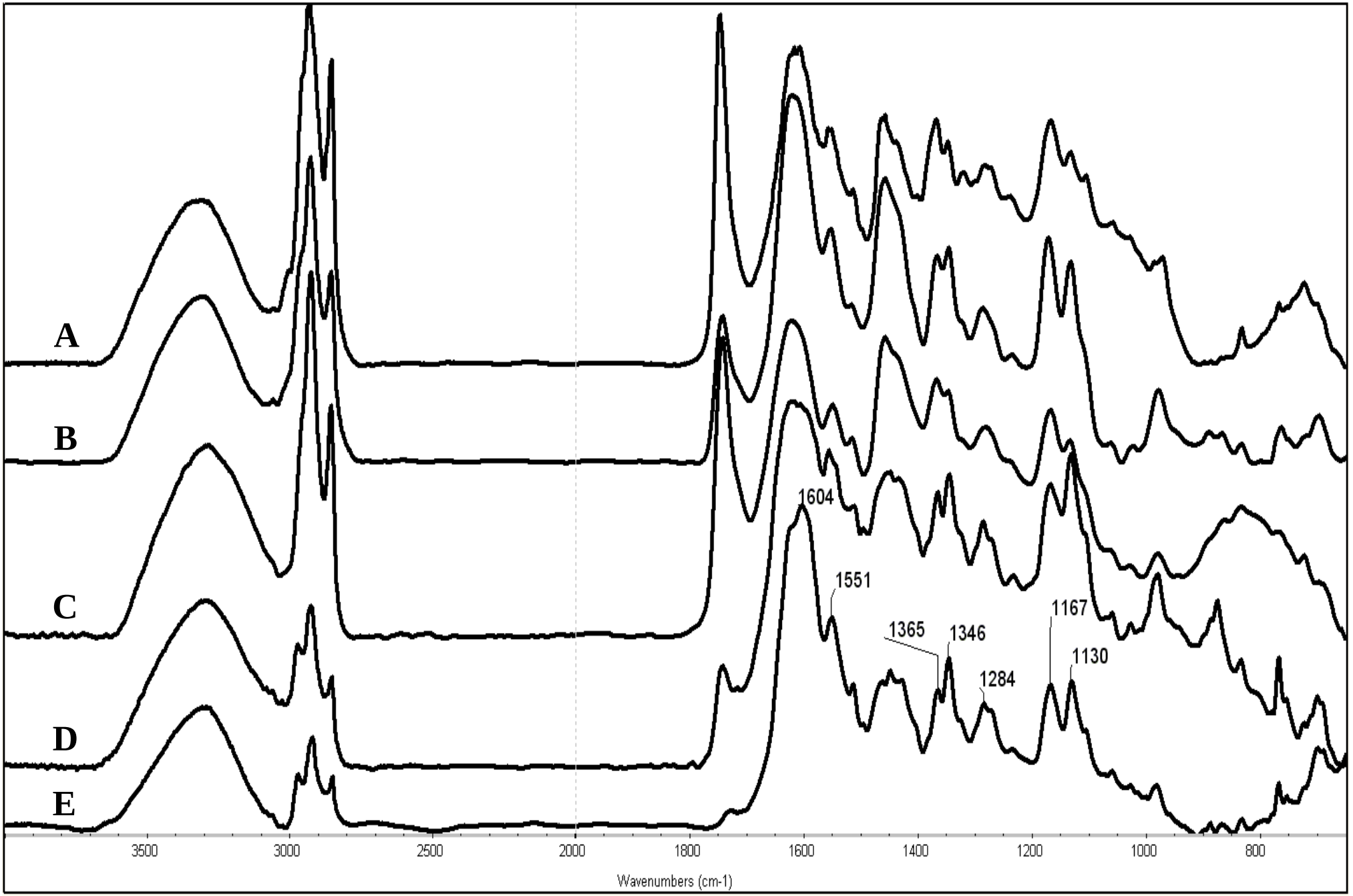
Figure


A
Raman intensity
1625
1601
1550
1000
454
B
Raman intensity
1625
1600
1550
998
455
C
Raman intensity
1627
1597
1551
998
455
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
Wavenumbers (cm-1)

Figure


A
B
C
D
E
1604
1551
1365
1346
1284
1167
1130
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
Wavenumbers (cm-1)

Figure


A
B
C
D
E
1604
1551
1365
1346
1284
1167
1130
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
Wavenumbers (cm-1)

PUBLIKACE V

Svobodová E., Ohlídalová M., Novotná M.: Možnosti identifikace červených organických barviv; In: *Muzea, památky a konzervace 2009*, Technické muzeum v Brně, Brno 2009, str. 45-47, ISBN 978-80-86413-68-6

Možnosti identifikace červených organických barviv

Eva Svobodová[1], Martina Ohlídalová[2], Miroslava Novotná[2]
[1]Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlovy v Praze; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
[2]Ústav chemické technologie restaurování památek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Úvod

Přírodní organická barviva lidé využívali k barvení kůží, textilií a dalších předmětů již ve starověku především v rozvinutých kulturách jako byly Řecko, Řím, Egypt a Čína. Později se přírodní barviva rozšířila po celém světě a byla hojně využívána až do druhé poloviny 19. století, kdy se začala vyrábět organická barviva synteticky. Vlastnosti takto vyrobených barviv jsou stabilnější a příprava je méně náročná a tím cenově výhodnější.[1-3]

Přírodní organická barviva (jak živočišného, tak rostlinného původu) se získávala zpravidla extrakcí. Podle lokality a klimatických podmínek, ve kterých se hmyz a rostliny vyskytovaly, obsahovala rozmanité deriváty převážně antrachinonů, které jsou pro ně typické. Toho se využívá při potvrzování pravosti, datace a místa vzniku uměleckých děl.[2]

Postupem času tyto látky degradují a konzervování nebo obnova uměleckých děl si vyžaduje zásah restaurátora, pro nějž je podstatné znát přesné složení použitých barev. Proto je vývoj analytických metod pro identifikaci těchto barviv důležitý. Organická přírodní barviva jsou převážně deriváty indolu, fenolu či chinonu s velmi podobnou chemickou strukturou. Z tohoto důvodu se k jejich identifikaci vyžaduje použití účinných separačních technik. Tyto metody jsou ale většinou destruktivní a vyžadují odběr vzorků. V popředí zájmu jsou proto vzhledem ke své nedestruktivnosti spektroskopické metody, které jsou dostatečně citlivé a umožňují identifikaci barviv již ve velmi malých množstvích.[1,4-7] Cílem této práce byla optimalizace spektroskopických metod (infračervené a Ramanovy spektroskopie) pro identifikaci vybraných přírodních červených organických barviv, jmenovitě akaroidu, brazilu, dračí krve, kamaly, kamelky, košenily, kraplaku, laky a santalu.

Metodika

Spektroskopická měření v infračervené oblasti v reflexním módu byla prováděna v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha na přístrojích Bruker IFS 66v s IR mikroskopem Hyperion s automatickým scanovacím stolkem a na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo-Nicolet, USA) ve spojení s mikroskopem Continuum v rozsahu 650–4000 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1} a počtu akumulací spekter 64–1028. Disperzní Ramanova spektroskopie byla prováděna na přístroji Jobin-Yvon Labram HR Raman spectrometer s konfokálním mikroskopem Olympus a CCD detektorem v rozsahu 300–2500 cm^{-1} pro dva budicí lasery (červený λ = 785 nm a zelený λ = 532 nm) opět v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha.

Navržená metodika byla aplikována na modelové vzorky barvené textilie a směsi barviv s olejem na skle. Vlněná a viskózová vlákna byla barvena dle návodů (cit.[4]). Dále byly připraveny modelové vzorky směsi barviva s lněným olejem ve formě husté pasty a směsi kamaly a běloby s lněným olejem v objemových poměrech 1 : 2 : 5 a 1 : 2 : 10.

Infračervená spektroskopie

Nejprve bylo proměřeno spektrální chování barvicích složek jednotlivých barviv. Tyto hlavní barvicí komponenty jsou majoritními složkami samotných barviv a jsou odpovědny za odstín a intenzitu barviva. Studovaná barviva jsou převážně chinoidní struktury, lišící se pouze počtem aromatických kruhů, hydroxylových a alkylových skupin. Jednotlivá spektra barviv obsahují stejné absorpční pásy a vzájemně se liší jen intenzitou či mírným posunem těchto pásů na ose vlnočtů (dáno vlivem okolních skupin). Na Obr. 1 jsou pro ukázku zobrazena spektra barviva kamaly (Obr. 1A) a jeho majoritní barvicí složky rottlerinu (Obr. 1B). Srovnáním obou spekter je patrná shoda absorpčních pásů barviva i její barvicí složky. Průběh infračervených spekter barviv tedy převážně ovlivňuje jejich hlavní barvicí složka a její absorpční pásy lze tedy využít k identifikaci samotného barviva.

Proměřením absorpčních spekter studovaných barviv v infračervené oblasti byly nalezeny některé specifické absorpční pásy, které jsou uvedeny v Tab. 1. Ty lze využít k předběžnému určení použitého barviva. K přesné identifikaci barviv je zapotřebí matematických úprav spekter k nalezení překrývajících se pásů či odstranění pásů nepříslušejících samotné barvicí složce.

Navržená metodika byla aplikována na modelové vzorky olejových barev, tedy směsi barviva s lněným olejem nanesené na skle ve formě husté pasty. Pro identifikaci barviva v této směsi byla nejprve proměřena infračervená absorpční spektra samotného oleje a poté oleje s barvivem. Tím se odlišily pásy oleje a barviva. Spektrum polymerovaného lněného oleje je mnohem chudší na absorpční pásy, neobsahuje hydroxylové skupiny. Na Obr. 2. je pro ukázku uvedeno spektrum kamaly s olejem (Obr. 2A) a samotného lněného oleje (Obr. 2B) v rozsahu vlnočtů 650–4000 cm^{-1}. Ze srovnání těchto spekter lze najít pásy příslušející pouze barvivu, a to v oblastech nad 3000 cm^{-1} a 1200–1700 cm^{-1}.

Barvivo	významné pásy [cm^{-1}]
brazil	1497; **1424**; 1363; 1250; 1113; 1047
santal	1737; 1506; 1424; 1327; **1226**; 1155; 1032
akaroid	1513; 1204; 1161; 835
dračí krev	1511; 1205; 1171; 954; 835
kamala	**1551**; 1346; 1167; **1130**
kampeška	1503; 1476; 1293; 1209; 1056
kraplak	1669; **1411**; 1146; **1022**; **996**
laka	**1715**; 1378; 1309; 834; **812**; **774**

pozn. tučně vyznačené vlnočty jsou specifické pro dané barvivo
Tab. 1: ***Významné absorpční pásy jednotlivých barviv***

Pokud do směsi barviva s polymerovaným lněným olejem byla přidána běloba (titanová, olovnatá a zinečnatá) či křída, absorpční pásy barviva v oblasti pod 1000 cm^{-1} jsou překryty absorpčními pásy příslušejícím anorganickým solím (převážně uhličitanům a síranům). To znesnadňuje identifikaci samotných barviv. Intenzita těchto pásů je převážně ovlivněna množstvím přidané běloby a s tím souvisejícím výběrem proměřovaného místa. Na Obr. 3 jsou pro ukázku uvedena jednotlivá infračervená spektra směsi kamaly s křídou a olejem v poměru 1 : 2 : 10 (Obr. 3A), směsi kamaly s křídou a olejem v poměru 1 : 2 : 5 (Obr. 3B), směsi kamaly s olejem (Obr. 3C) a dále spektrum samotného oleje přítomného ve směsi kamala/křída/olej (1 : 2 : 5) (Obr. 3D) a kamala/olej (Obr. 3E).

Další aplikací navržené metodiky infračervené spektroskopie byla identifikace barviv v barvených textiliích, jimiž byla vlákna barvené vlny a viskózy. Tato vlákna byla nejprve mořena třemi typy mořidel, a to síranem železnatým, síranem měďnatým a síranem draselnohlinitým. Tímto mořením získala vlákna vlny s viskózou různá zbarvení (Obr. 4), která ovlivnila výsledný odstín barvené textilie. Na Obr. 4A jsou zobrazena nejprve samotná nebarvená mořená vlákna v sestupném pořadí: vlákna mořena síranem draselnohlinitým, síranem železnatým a síranem měďnatým. Dále Obr. 4B–D obsahuje jednotlivá vlákna barvená vybranými studovanými barvivy (seřazeny v pořadí – levý sloupec shora: santal, kampeška, laka, kamala; pravý sloupec shora: košenila, brazil a kraplak). Takto připravené modelové vzorky barvené *textilie byly proměřeny v infračervené oblasti, a to jak vlněná* vlákna, tak vlákna viskózová. Vlněná vlákna ve svém spektru (Obr. 5) mají dva velmi intenzivní pásy nad a pod 1600 cm^{-1} příslušející amidové vazbě proteinů (na Obr. 5 označeny jako amide I a amide II), což znemožňuje využití specifických pásů barviv v této oblasti. Přesto lze barviva identifikovat pomocí specifických pásů ležících v oblasti nižších vlnočtů.

Oproti tomu viskózová vlákna jsou polysacharidová, tedy neobsahují amidovou vazbu, ale obsahují velké množství hydroxylových skupin, jejichž absorpční pásy jsou velmi intenzivní v okolí 1000 cm^{-1}. Na viskózovém vláknu se nám tedy barvivo identifikovat nepodařilo. Je to způsobeno také velmi malou afinitou mořenových barviv k těmto vláknům, která se tak velmi špatně barví. Ukázky jednotlivých infračervených absorpčních spekter vlny mořené síranem draselnohlinitým barvené kamalou, samotné vlny mořené síranem draselnohlinitým, kamaly a rottlerinu jsou uvedeny na Obr. 5. Obr. 6 znázorňuje infračervená spektra viskózových vláken, a to viskózového vlákna se síranem draselnohlinitým a stejného vlákna barveného kamalou. Absorpční pásy při vlnočtech 1004 cm^{-1} a 988 cm^{-1} zvýrazněné na Obr. 6A představují velmi intenzivní pásy sacharidů.

Infračervená spektroskopie je tedy vhodnou metodou k identifikaci červených organických barviv pomocí specifických absorpčních pásů a s využitím matematických úprav spekter. Ovšem tato identifikace je na modelových vzorcích barvené textilie velmi ztížena. Například u vlny absorpční pásy samotného textilního vlákna překrývají absorpční pásy použitého historického barviva. Přesto lze barvivo určit pomocí identifikace pásů v oblastech vlnočtů, při kterých vlákno textilie neabsorbuje. Oproti tomu viskózová vlákna se navíc velmi špatně zvolenými barvivy barví, což je jeden z důvodů, proč se nám na těchto vláknech nepodařilo barvivo identifikovat.

V modelových vzorcích olejových barev se pomocí infračervené spektroskopie podařilo identifikovat použité barvivo, ale tato identifikace je velmi ztížena v přítomnosti jiných anorganických pigmentů, především bělob. Ty mají absorpční pásy o vyšších intenzitách, které pásy organických barviv překrývají. Identifikaci reálných olejových maleb také bude ztěžovat menší obsah organického barviva, než jaký byl použit při přípravě modelových vzorků.

Ramanova spektroskopie

Podobně jako u infračervené spektroskopie byla proměřena spektra jednotlivých barvicích složek. Tyto hlavní komponenty barviv mají ve většině případů velmi silnou fluorescenci pozadí, která překrývá absorpční pásy jednotlivých strukturních skupin těchto barvicích látek. Vyšší energie budicího laseru ale barvicí složky spaluje, nižší energie zase není dostačující k excitaci absorbujících skupin. Ramanova spektra jednotlivých komerčně dostupných barvicích složek organických červených barviv byla měřena pro dva budicí lasery, a to laser červený o vlnové délce záření 785 nm a zelený laser o vlnové délce záření 532 nm. Pro každou hlavní barvicí komponentu byly zvlášť měněny podmínky měření od intenzity paprsku přes doby pulsu až k počtu akumulací spekter. Přesto se podařilo získat spektra pouze pro dvě barvicí složky, a to rottlerinu a hemateinu, které jsou obsaženy *v kamale, respektive v kampešce. Přičemž kamala vyka*zuje Ramanovo spektrum pro oba použité budicí lasery oproti kampešce, jejíž strukturní skupiny jsou excitovány pouze po ozáření zeleným laserem. Z těchto důvodů byla dále metodou Ramanovy spektroskopie měřena pouze tato dvě barviva. Pro ukázku jsou na *Obr. 7 zobrazena Rama*nova spektra kampešky (Obr. 7A) a hemateinu (Obr. 7B) po excitaci zeleným laserem. Opět i zde je patrná shoda jednotlivých pásů, které potvrzují majoritní podíl této barvicí komponenty (hemateinu) na celkové barevnosti barviva (kampešky).

Z důvodu výše uvedeného byla Ramanova spektra modelových vzorků barvené textilie proměřena pouze pro vlákna barvená kamalou a kampeškou. Ve srovnání se spektry infračervenými samotné mořené textilie nevykazují žádné absorpční pásy ani po ozáření vyšší energií a dokonce organická barviva ve své struktuře stabilizují. Ramanova spektra barvených textilií tedy umožňují přesnou identifikaci použitých organických červených barviv na vlněných vláknech,

jak je uvedeno pro ukázku na Obr. 8. Jsou zde uvedena Ramanova spektra jak vlněných vláken mořených síranem železnatým barvených kamalou (Obr. 8A), tak i Ramanovo spektrum samotné kamaly (Obr. 8B) po excitaci červeným laserem. Ze srovnání obou spekter je patrná přítomnost pásů příslušející pouze skupinám organického barviva.

Závěr

Pro vybraná přírodní červená organická barviva (akaroid, brazil, dračí krev, kamala, kampeška, košenila, kraplak, laka a santal) byla optimalizována metodika identifikace metodou infračervené spektroskopie v reflexním módu v rozsahu vlnočtů 650–4000 cm^{-1}. Byla proměřena jednotlivá infračervená spektra jak jednotlivých barviv, tak i jejich hlavních barvicích složek, pokud byly komerčně dostupné. Na základě porovnání spekter byly nalezeny významné a specifické spektrální pásy jednotlivých barviv, kterými je lze v prvním přiblížení identifikovat a rozlišit od ostatních studovaných barviv. Metodika infračervené spektroskopie byla ověřena na modelových vzorcích barvených textilních vláken (vlněná a viskózová vlákna mořená třemi různými mořidly) a směsi barviva s lněným olejem. Na barvených vlněných vláknech byla pro nižší vlnočty identifikována jednotlivá barviva oproti vláknům viskózovým, která se obtížně barví. Ve směsi barviva s olejem byla identifikace snazší díky chudému spektru polymerovaného oleje. Naopak přídavek anorganického pigmentu do směsi barviva s lněným olejem identifikaci ztížil.

Technika identifikace metodou infračervené spektroskopie byla doplněna o metodu disperzní Ramanovy mikrospektroskopie v rozsahu vlnočtů 300–2500 cm^{-1} pro dva dostupné budicí lasery, a to pro červený laser o vlnové délce 785 nm a laser zelený o vlnové délce 532 nm. Nejprve byla měřena spektra hlavních barvicích složek studovaných barviv a poté jednotlivých barviv, ale byly nalezeny pouze pro dvě barviva, a to kamalu (po excitaci oběma budicími lasery) a kampešku (pouze po excitaci zeleným laserem). Metodika byla úspěšně použita pro identifikaci kamalou a kampeškou barvená vlákna vlny s viskózou (mořená opět třemi druhy mořidel). Pro identifikaci ostatních barviv metodou disperzní Ramanovy mikroskopie není vhodné použití výše uvedených budicích laserů. Excitace těchto barviv by mohla být dosažena pro budicí lasery o vyšších vlnových délkách blízkých infračervenému spektru.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu Grantové agentury Univerzity Karlovy (Projekt 69807)

Literatura

1) ČOPÍKOVÁ, J. – UHER, M. – LAPČÍK, O. – MORAVCOVÁ, J. – DRAŠAR, P.: Chem. Listy 99 (2005), s. 802–816.
2) ŠIMŮNKOVÁ, E. – BAYEROVÁ, T.: *Pigmenty.* Praha, STOP 1999.
3) HŘEBÍČKOVÁ, B. A.: *Recepty starých mistrů aneb Malířské postupy středověku.* Brno, Computer Press 2006.
4) SCHWEPPE, H.: *Handbuch der Naturfarbstoffe – Vorkommmen – Verwendung – Nachweis.* Landsberg/Lach, Ecomed 1992.
5) WYPLOSZ, N.: *Laser desorption mass spectrometric studies of artists´ organic pigments.* Amsterdam, MolArt 2003.
6) HOFENK DE GRAAFF, J. H. – ROELOFS, W. G. TH. – VAN BOMMEL, M. R.: *The Colourful Past: Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs.* Abegg-Stiftung a Archetype Publications, 2004.
7) KARSBEEK, N.: Studies in Conservation 50 (2005), s. 205–229.

Viz Obrazová příloha s. 88

Identification of Red Organic Dyes

Eva Svobodová[1], Martina Ohlídalová[2], Miroslava Novotná[2]
[1]Faculty of Csience, Charles University in Prague; Institute of Chemical Technology Prague
[2]Department of Chemical Technology of Monument Conservation, Institute of Chemical Technology Prague

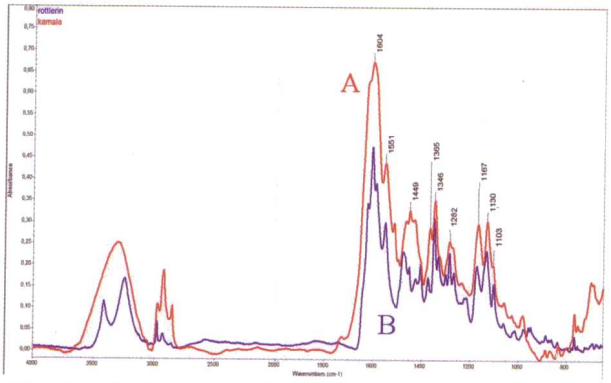
Red organic dyes, produced by animals and/or plants, are mostly based on quinone, flavonoid, and indole derivatives. To identify, electrochemical, separation, and especially spectrometric non-destructive methods are used. This paper deals with an indentification of red organic dyes, namely brazil wood, sandal wood, dragon blood, lac, cochineal, logwood, kamala, and kraplak. The IR and Raman spectroscopy were employed. As red active components, carmine with carminic and laccaic acid, alizarine, purpurin, rottlerin, and haematein standards were chosen.

As said above, to describe a spectral behaviour of standards as well as natural dyes, IR spectroscopy in range 650–4000 cm^{-1} in reflexive mode and Raman spectroscopy (actuate lasers 785 nm and 532 nm) in range 300–2500 cm^{-1} were employed. But, dyes assessed by Raman spectroscopy show high fluorescence, therefore no optimal measure settings for most active components of dyes, and dyes themselves, could be found. Furthermore, laboratory samples of coloured cotton fibres (cotton and viscose were stained with alumni, iron, and copper soils), mixture dye-oil (linseed oil), and mixture kamala with white-oil (carouse, zinc-, titanium-, chalk white) on glass were prepared. Achieved spectra data on laboratory samples were compared with spectra from standards and natural dyes testing. For identification, specific lines of some dyes were found.

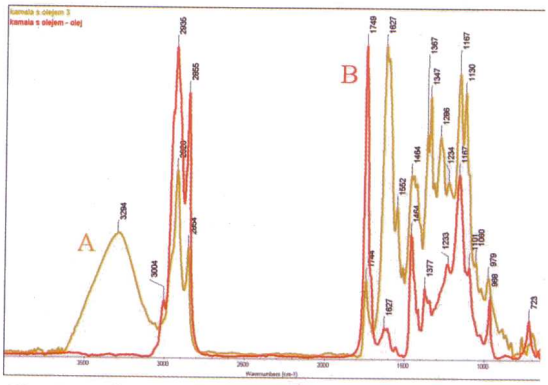
As a result, Raman spectroscopy with this experimental settings is not suitable for organic red dyes identification because of their high fluorescence. In contrast, IR spectroscopy permits an identification of some dyes in form of coloured cotton and/or mixture dye-oil.

Možnosti identifikace červených organických barviv
Identification of Red Organic Dyes

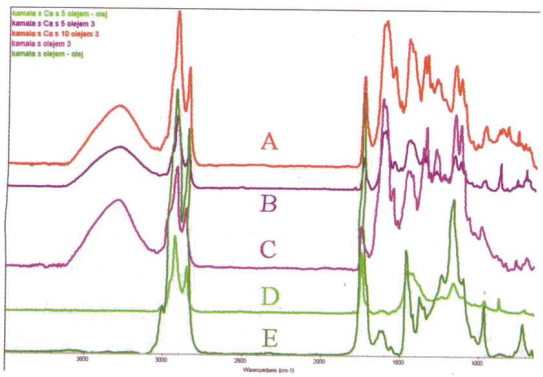
Eva Svobodová[1], Martina Ohlídalová[2], Miroslava Novotná[2]
[1]*Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*
[2]*Ústav chemické technologie restaurování památek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*



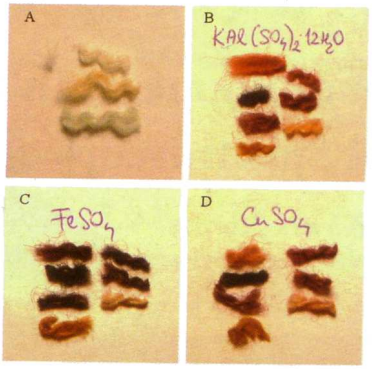
Obr. 1: ***Infračervené spektrum kamaly (A) a rottlerinu (B) v absorpčních jednotkách; rozsah vlnočtů 650–4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1} a 64 akumulací spekter***



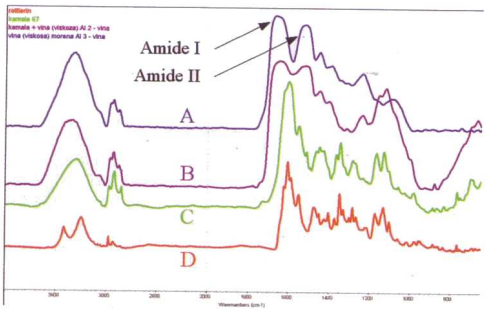
Obr. 2: ***Infračervené spektrum kamaly s lněným olejem (A) a samotného lněného oleje (B) v absorpčních jednotkách; rozsah vlnočtů 650–4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1} a 64 akumulací spekter***



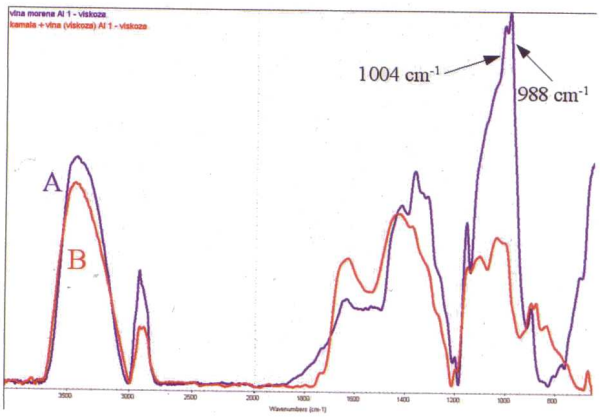
Obr. 3: ***Infračervené spektrum směsi kamaly s křídou a olejem v poměru 1 : 2 : 10 (A), směsi kamaly s křídou a olejem v poměru 1 : 2 : 5 (B), směsi kamaly s olejem (C) a dále spektrum samotného oleje přítomného ve směsi kamala/křída/olej (1 : 2 : 5) (D) a kamala/olej (E) v absorpčních jednotkách; rozsah vlnočtů 650–4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1} a 128 akumulací spekter***



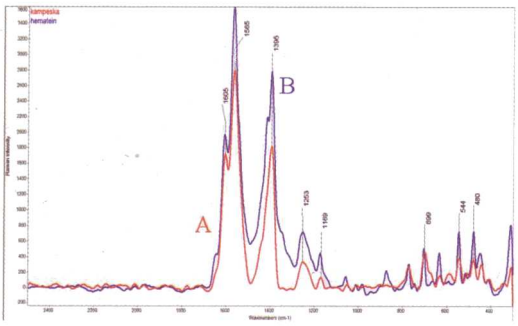
Obr. 4: ***Fotografie mořených vláken vlny s viskózou (A) a dále barvených vláken mořených síranem draselnohlinitým (B), síranem železnatým (C) a síranem měďnatým (D); foto Svobodová 2009***



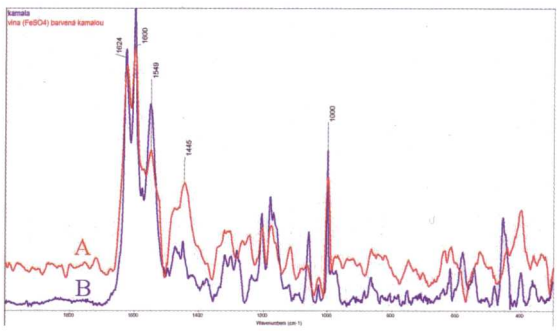
Obr. 5: ***Infračervená spektra vlněného vlákna (mořena síranem hlinitodraselným) (A), téhož vlákna barveného kamalou (B), kamaly (C) a rottlerinu, jenž je barvicí složkou kamaly (D); rozsah vlnočtů 650–4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1} a 128 akumulací spekter***



Obr. 6: ***Infračervená spektra viskózového vlákna se síranem draselnohlinitým (A) a stejného vlákna barveného kamalou (B) v absorpčních jednotkách; rozsah vlnočtů 650–4000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1} a 128 akumulací spekter***



Obr. 7: ***Ramanova spektra po excitaci zeleným laserem kampešky (A) (1% filtr, 3 s, 60 akumulací spekter) a hemateinu (B) (10% filtr, 1 s, 30 akumulací spekter); rozsah vlnočtů 300–2500 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}***

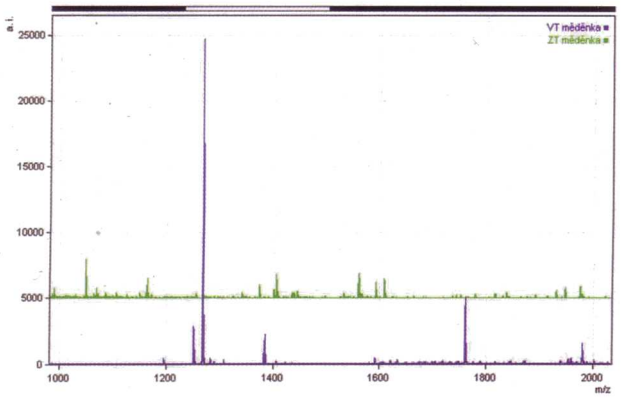


Obr. 8: ***Ramanova spektra po excitaci červeným laserem pro vlněné vlákno mořené síranem železnatým barvené kamalou (A) (100% filtr, 10 s, 40 akumulací spekter) a kamalu (B) (10% filtr, 10 s, 40 akumulací spekter); rozsah vlnočtů 300–2000 cm^{-1}, spektrální rozlišení 4 cm^{-1}***

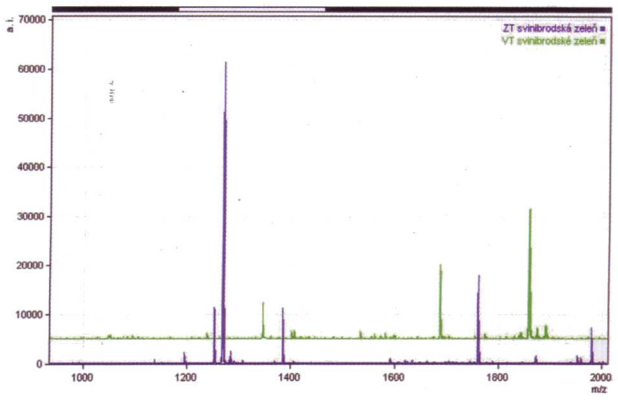
Vliv anorganických pigmentů na identifikaci vaječných temper pomocí hmotnostní spektrometrie

The Influence of Inorganic Pigments on the Identification of EGG Temperas by Mass Spectrometry

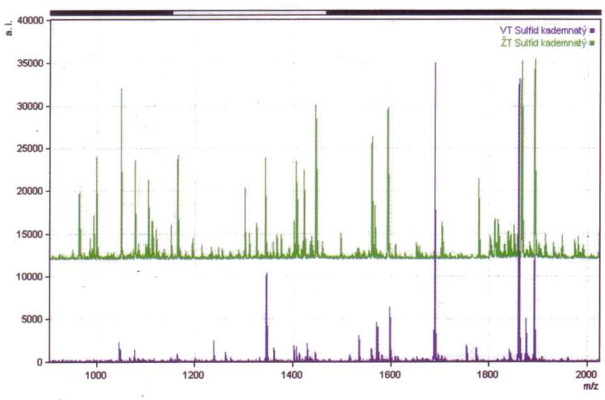
Lucie Čámská[1], Štěpánka Kučková[1,2], Radovan Hynek[2], Milan Kodíček[2]
[1]Katedra chemie a didaktiky chemie, Pedagogická fakulta Univerzity Karlovy v Praze
[2]Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze



Obr. 2: ***Spektra vaječné a žloutkové tempery smíchané s měděnkou***



Obr. 3: ***Spektra vaječné a žloutkové tempery smíchané se svinibrodskou zelení***



Obr. 4: ***Spektra vaječné a žloutkové tempery smíchané se sulfidem kademnatým***