

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<sup>-3</sup> octanovém pufru, pH 5 a 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> tetraborátový pufr o pH 8,5 s 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-1</sup>, kampeška 1503, 1476, 1293, 1209 a 1056 cm<sup>-1</sup>, a laka 1715, 1378, 1309, 834, 812 a 774 cm<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>) a kamala (1626, 1600, 1573, 1552 a 1001 cm<sup>-1</sup>). 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·dm<sup>-3</sup> acetate buffer, pH 5, and 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA in 0.025 mol·dm<sup>-3</sup> 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·dm<sup>-3</sup> sodium dodecyl sulfate in 0.01 mol·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-1</sup> for dye lac, 1551, 1346, 1167 and 1130 cm<sup>-1</sup> for dye kamala, and 1503, 1476, 1293, 1209 and 1056 cm<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>) and logwood (1607, 1565, 1413, 1394 and 701 cm<sup>-1</sup>). 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.

<b>Obsah</b>	
<b>1 ÚVOD</b>	<b>12</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Barviva, pigmenty a barevné látky</b>	<b>13</b>
2.1.1 Pigmenty	13
2.1.2 Barviva	14
2.1.3 Malba a barevná vrstva	15
<b>2.2 Barviva jako chemické látky</b>	<b>16</b>
2.2.1 Indigo	17
2.2.2 Chinonová barviva	17
2.2.2.1 <i>Kermes</i>	18
2.2.2.2 <i>Košenila polská a arménská</i>	18
2.2.2.3 <i>Košenila</i>	19
2.2.2.4 <i>Laka</i>	20
2.2.3 Mořenová barviva	21
2.2.3.1 <i>Mořena</i>	21
2.2.4 Červená dřeva	24
2.2.4.1 <i>Brazilské dřevo</i>	24
2.2.4.2 <i>Santal</i>	25
2.2.5 Kampeška	26
2.2.6 Kamala	27
2.2.7 Akaroid a dračí krev	28
<b>2.3 Degradace</b>	<b>29</b>
<b>2.4 Identifikace přírodních barviv</b>	<b>29</b>
2.4.1 Separační metody	30
2.4.2 Spektrální metody	36
<b>2.5 Principy metod</b>	<b>39</b>
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
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Použité chemikálie</b>	<b>43</b>
3.1.1 Barviva	43



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

<b>PŘÍLOHA</b>	<b>88</b>
<b>Publikace I</b>	<b>89</b>
<b>Publikace II</b>	<b>120</b>
<b>Publikace III</b>	<b>126</b>
<b>Publikace IV</b>	<b>136</b>
<b>Publikace V</b>	<b>159</b>

## 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	vysokoučinná 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- $\beta$ -CD	hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin
hydroxypropyl- $\gamma$ -CD	hydroxypropyl- $\gamma$ -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
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -cyklodextrin
$\beta$ -CD	$\beta$ -cyklodextrin
$\gamma$ -CD	$\gamma$ -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 fází)
$m$	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 intenzita pásů
$w$	slabá intenzita pásů
$\delta_a$	asymetrická deformační vibrace
$\delta_s$	symetrická deformační vibrace
$\lambda$	vlnová délka
$\mu_{eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost
$v_a$	asymetrická valenční vibrace
$v_s$	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] odpovědné 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  $\pi$  elektrony a jsou nezbytné pro vazbu barevných látek k substrátu. Vzájemná kombinace chromoforů a auxochromů ovlivňuje intenzitu výsledného zbarvení. 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 ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  a další). Tento kation přechodného kovu  $\text{M}^{z+}$  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 nanáší podkladové vrstvy, jejichž kvalita ovlivňuje trvanlivost obrazu. Na dřevo se využívá křída či sádra v kliču, někdy i s klíženým plátnem proti popraskání barevné vrstvy. Při malbě na plátno jsou podkladové vrstvy tvořeny také křídou či sádrrou v kliču, 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 nanáší 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 tempéry 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, krocín 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 bilirubin, 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 *Bigonía tecomá*.

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 samic *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, tempery, 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 ( $M^{I\text{III}}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) či sírany přechodných kovů, ovlivňují výslednou barvu vláken. 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.

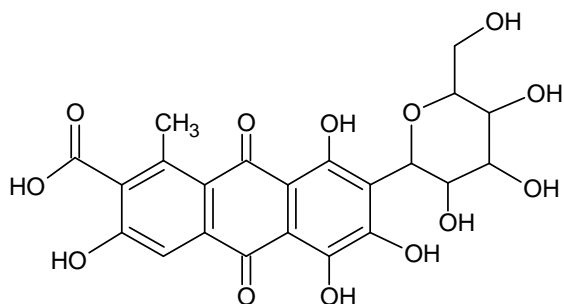
#### 2.2.2.2 *Košenila polská a arménská*

Z těl červce *Porphyrophora polonica* (dříve *Margarodes polonicus*) žijícího na kořenech chmelku vytrvalého (*Scleranthus 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 %). Stejně 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 kationů 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 rozdrčených těl oplodněných samiček hmyzu červce nopálového (*Dactylopius coccus*, dříve *Coccus cacti*). Tento hmyz žije na různých druzích opuncí (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 (kationy chromu a železa), jasně červený (kation cínu) a vínový (kation mědi). Uplatnění našla dále v malířských technikách akvarelu, tempery, 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.



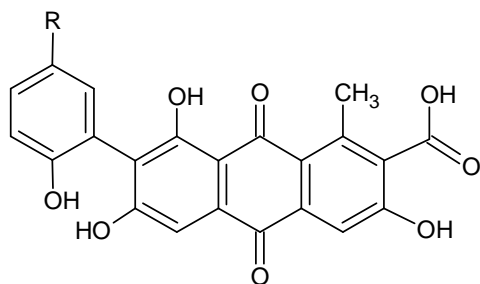
Obr. 1 Karmínová kyselina

#### 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.

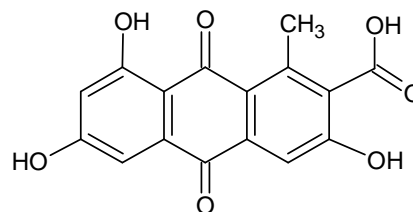
Kromě typu A jsou známy další čtyři typy: lakaová kyselina B, C, D a E (obr. 2). Lakaová kyselina typu D (obr. 3) je značně podobná kermesové kyselině a bývá také označována jako flavokermesová či xanthokermesová kyselina, která se vyskytuje též v barvivech kermes a v různých druzích barviva košenila, 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 roku 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  $\text{Al}^{3+}$ ), jasně červeným ( $\text{Sn}^{4+}$ ) a purpurovým ( $\text{Fe}^{3+}$ ).



- A: R =  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$   
 B: R =  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   
 C: R =  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$   
 E: R =  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

Obr. 2 Lakaová kyselina typ A – C, E



Obr. 3 Lakaová kyselina typ D

### 2.2.3 Mořenová barviva

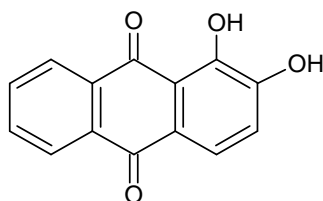
Další velkou podskupinou anthrachinonových barviv jsou tzv. mořenová barviva, tedy barviva získaná z mořeny barvířské a dalších rostlin obsahujících alizarin, převážně čeledě *Rubiaceae*. Mezi nejvýznamnější zdroje těchto barviv patří rostliny rodů *Rubia*, *Galium* a *Relbunium*; dále *Morinda* a *Oldenlandia*. 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.

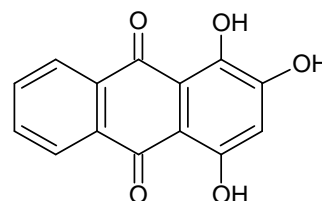
#### 2.2.3.1 Mořena

Mořena, čili kraplak (angl. madder) patří mezi nepoužívanější 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

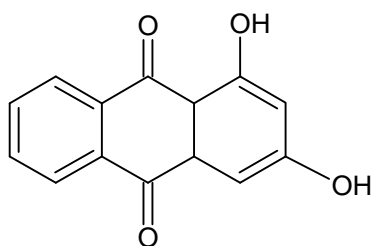
velká množství glykosidů alizarinu a pseudopurpurinu, které se hydrolyzou minerálními kyselinami z glykosidické formy uvolňují. Pseudopurpurin dále podléhá dekarboxylaci během skladování vysušených kořenů mořeny a přechází tak na purpurin. Glykosid alizarinu bývá označován jako tzv. ruberythrinová či ruberythrová kyselina (6'-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -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.



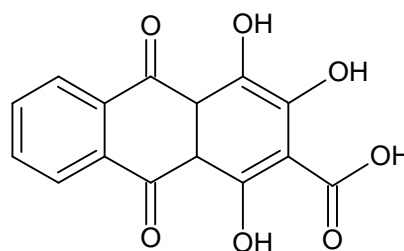
Obr. 4 Alizarin



Obr. 5 Purpurin



Obr. 6 Xanthopurpurin



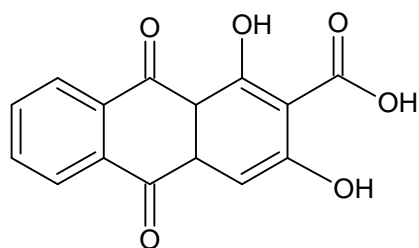
Obr. 7 Pseudopurpurin

Alizarin je však se svou fenolickou strukturou příkladem acidobazického indikátoru, který v závislosti na bazicitě prostředí disociuje, čímž mění uspořádání 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

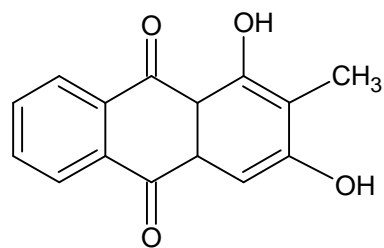


červené, fialové, oranžové barvy, přes lila až k hnědé barvě. K moření vláken byl nejčastěji používán tzv. alum, tedy alkalický síran (nejčastěji podvojný síran draselnohlinitý), který dával vlněným vláknům ve spojení s alizarinem cihlově červenou barvu. Fialové barvy se docílilo mořením železitými a 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 nebyla 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 anthragaloldimethylether. Dalším je červeně až hnědě zbarvený kraplak indický, za jehož odstín jsou odpovědné 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



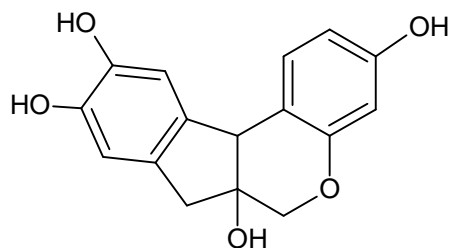
Obr. 9 Rubiadin

## 2.2.4 Červená dřeva

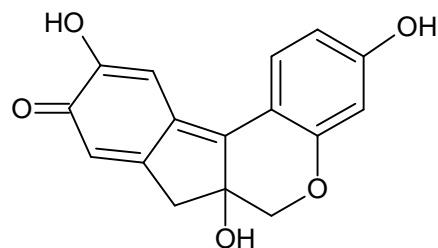
Další dvě studovaná červená organická barviva santal a brazilské dřevo patří do skupiny tzv. červených dřev. Červená dřeva můžeme dělit na dvě skupiny v závislosti na rozpustnosti hlavních barvicích složek ve vodě, tedy na rozpustná a nerozpustná červená dřeva. Brazilské dřevo, obsahující hlavní barvicí 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, caliaturood 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

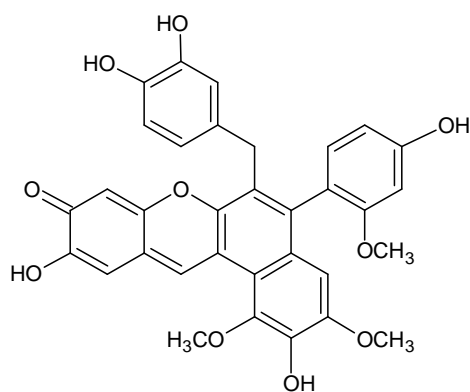
Brazilin můžeme nalézt v rozličných druzích stromů z rodu *Caesalpinia* [3]. Bezbarvý brazilin je ve vodě rozpustný a rozpouští se za vzniku žlutého roztoku, který vzdušnou oxidací či fermentací přechází do karmínově červeného

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

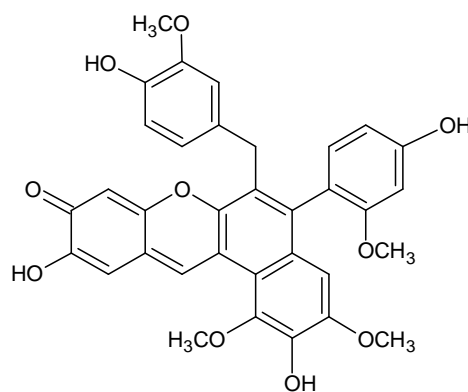
Brazilské dřevo bylo používáno k výrobě akvarelových barev, v knižní malbě, k malbě miniatur, k tvorbě inkoustů a samozřejmě k barvení textilií. Brazíl patří mezi mořenová barviva, jehož odstíny připomínaly textilie barvené mořenou, a proto byl někdy přímo za mořenu zaměňován. Nejčastějším mořidlem byla hlinitá mořidla (červený odstín), dále cínicitá (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



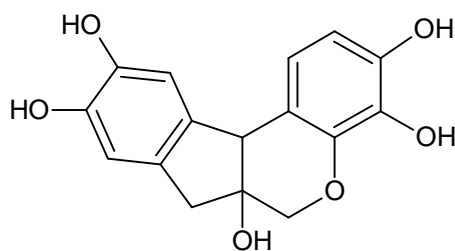
Obr. 13 Santalin B

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.

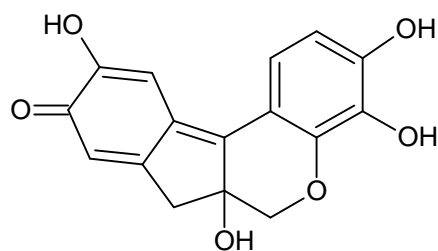
Santal byl již starými Indy používán k výrobě dekoračního nábytku, výrobě nábytkových laků, ale také k barvení textilu a to jak přímým barvením bavlny a vlny, tak barvením s použitím mořidla (nejčastěji soli cíničitě). Použití hlinitých iontů k moření zajišťuje textilií červené zbarvení (případně oranžovo-červené při barvení africkým santalem), cíničitě 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 světlostalost 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.

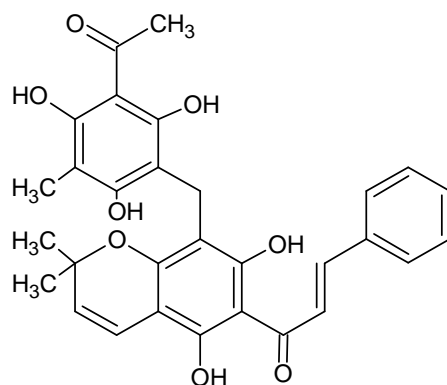
Do Evropy byla kampeška dovážena z centrální a Jižní Ameriky (stromy *Haematoxylum campechianum* rostou převážně v Mexiku a Brazílii, dále i v oblasti západní Indie) po jejím objevení Španěly v 16. století. V 17. – 19. století byla kampeška nejčastěji využívána v akvarelu, k tisku na kaliko [4] a k barvení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

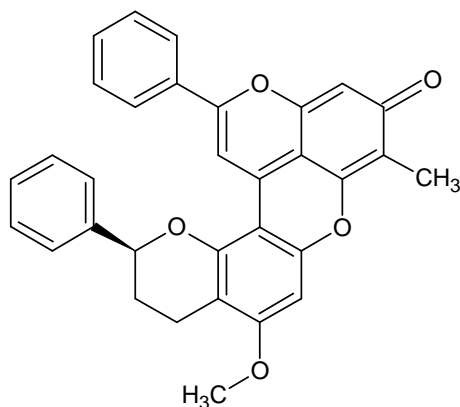
V současné době není světová produkce přírodní kamaly významná, jelikož ji zastínila stálejší a levnější syntetická barviva. Přesto nachází své uplatnění v lékařství [6,7], kosmetice a jako potravinářské barvivo.



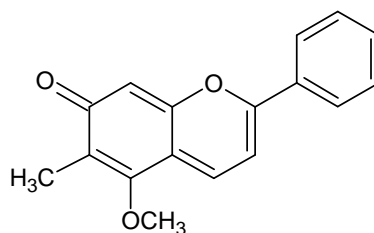
Obr. 16 Rottlerin

### 2.2.7 Akaroid a dračí krev

Akaroid je prášek červeno-hnědé barvy původem ze stromů rodu *Xanthothrea* 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 barvivo dračí krev. Její hlavní barvicí složky jsou pyryliová barviva dracorubin (obr. 17) a dracorhodin (obr. 18). Dračí krev je získávána ze stromů *Calamus draco*, *Xanthothrea*, *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 matici, 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 využívána 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 polariry. 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 používána k rychlé identifikaci barviv a určení jejich čistoty. Organická barviva byla dříve úspěšně separována na mikrokrytalické 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) *tert*-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 popsanych 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 využívána 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 trimethylsilylderivatů 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]

Vysokoučinná 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·dm<sup>-3</sup> 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·dm<sup>-3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/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·dm<sup>-3</sup> 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. Stejně 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. Degradací procesy jsou obecně vyšší u purpurinu oproti alizarinu a jsou jimi sníženy 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·dm<sup>-3</sup> 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 methanolickeém extraktu byliny *Rhei Rhizoma* v nepokryté kapiláře s elektrolytem 10/90 (v/v) acetonitril/0,03 mol·cm<sup>-3</sup> 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 rhabarb (*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  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritanem sodným (pH 9,30),  $0,030 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\beta$ -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  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\alpha$ -cyklodextrinem ( $\alpha$ -CD) v  $0,03 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritanu sodném (pH 10,0) obsahujícím 20 % acetonitrilu, aplikované napětí 20 kV a detekci při 254 nm. Kromě  $\alpha$ -CD, který byl nejvhodnější, autoři vyzkoušeli i hydroxypropyl- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, hydroxypropyl- $\gamma$ -CD a  $\beta$ -CD. V práci [46] byl nejvýhodnějším systémem separace emodinu, chrysophanolu, aloe-emodinu, rheinu a physcionu  $0,035 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový pufr (pH 11,0) obsahující  $0,020 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\beta$ -CD a  $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  močovinu při aplikovaném napětí 20 kV a detekci při 254 nm v nepokryté kapiláře.  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  Hydroxypropyl- $\gamma$ -CD v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDS (dodecylsulfát sodný), čímž byla využita metoda MEKC, ovšem autorům se za těchto podmínek nepodařilo analyty odseparovat s dostatečným rozlišením. MEKC analýza těchto analytů byla úspěšná v práci [48] za experimentálních podmínek: nepokrytá kapilára, napětí 15 kV, detekce při 254 nm, elektrolyt:  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  borátový pufr (pH 11) obsahující  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDS a  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  STC (taurocholát sodný) s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\beta$ -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  $0,025 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDC v  $0,050 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  borátovém pufru o pH 11 [49];  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDC v  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  borátovém pufru o pH 9 s přídavkem 15 % acetonitrilu [50] a  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDC v  $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  borátovém pufru ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ -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<sup>-3</sup> SDS v 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> tetraborátu sodném s 0,0125 mol·dm<sup>-3</sup> dihydrogenfosforečnanem 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<sup>-3</sup> fosforečnanem sodným (pH 8,5) v případě UV detekce (při 260 a 270 nm), respektive 0,02 mol·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> SDS v 0,02 mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritanu sodném s přídatkem 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 absorpční 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  $\text{cm}^{-1}$  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 kliš [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<sup>-3</sup> 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 textilií barvené extraktem z kořene mořeny barvířské. Barviva alizarin, purpurin, lakaová kyselina, karmínová kyselina, brazilin, brazilin, 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 uhličitánů 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 příměsí, které tvoří velmi složitou matici.

## 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. Vztlínání 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 přísadkou 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 nabitě micely a má tudíž vlastní elektroforetickou pohyblivost. Separované látky se rozdělují mezi micely a nosný elektrolyt podle své polariry. 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 maticích 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 matic.

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 vedoucích 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 ( $\text{CS}(\text{NH}_2)_2$ , 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 ( $\text{TiO}_2$ ), olovnatá běloba ( $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ ) a křída ( $\text{CaCO}_3$ ) 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  $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  při rozlišení  $4 \text{ cm}^{-1}$ ) byla prováděna v Centrálních laboratořích VŠCHT Praha na přístrojích Bruker IFS 66v s IR mikroskopem Hyperion s automatickým skenovacím stolem a na FTIR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo-Nicolet, USA) ve spojení s mikroskopem

Continuum. Disperzní Ramanova spektroskopie byla prováděna v rozsahu vlnočtů  $300 - 2500 \text{ cm}^{-1}$  pro dva budící lasery (červený o  $\lambda = 785 \text{ nm}$  a zelený o  $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) 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<sup>3D</sup>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  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  na nemodifikované křemenné kapiláře firmy CACO s.r.o. (Slovensko) o parametrech: vnitřní průměr  $d_i = 75 \text{ }\mu\text{m}$ , vnější průměr  $d_o = 380 \text{ }\mu\text{m}$ , délka kapiláry k detekčnímu okénku  $L_D = 55,8 \text{ cm}$  a celková délka kapiláry  $L_C = 70 \text{ cm}$ . Kapilára byla na začátku měření promývána deionizovanou vodou (5 min),  $1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH (10 min), opět vodou (5 min) a elektrolytem (10 min). Během analýz byla kapilára promývána  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  či  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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 scanner 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 Konduktivity & pH Meter (JenWay Ltd., Velká Británie) a roztoky analytů a elektrolyty byly sonifikovány v ultrazvukové lázni ULTRASONIC LC 30 H (Elma<sup>®</sup>, 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  $(25 \pm 2)$  °C a relativní vlhkost vzduchu v osvitové jednotce byla  $(15 \pm 5)$  %.

### 3.3 PŘÍPRAVA MODELOVÝCH VZORKŮ OLEJOVÉ MALBY

Na skleněné mikroskopické sklo byla nanášena 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 nanášeny 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 rozstříhána 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 zahřata 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 zahřata 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 obdélníčky 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)  $\mu_{\text{eff}}$ :

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

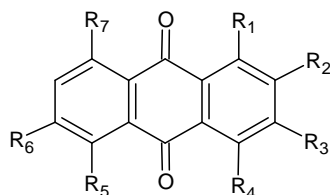
kde  $\mu_{\text{eff}}$  je efektivní elektroforetická pohyblivost (rozměr  $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $t_{\text{eof}}$  a  $t_{\text{mig},i}$  jsou migrační časy neutrálního značkovače elektroosmotického toku a  $i$ -té nabitě látky (rozměr min),  $L_C$  je celková délka 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  $\text{p}K_a$  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  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  fosfátový a  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  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

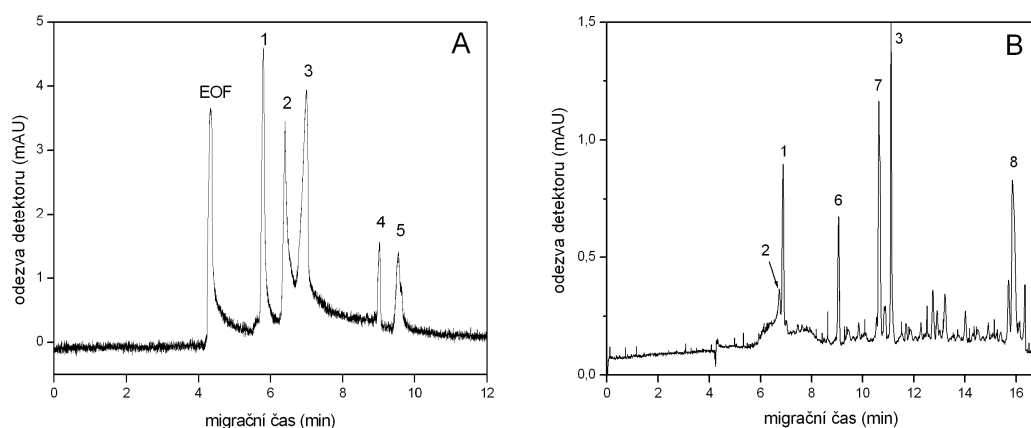
s vypočítanými disociačními konstantami s elektroosmotickým tokem při pH nižším než 8,5. V alkalickém prostředí získávají záporný náboj, a tak i vlastní elektroforetickou mobilitu. Ostatní deriváty jsou i v neutrálním pH částečně nabity a jejich elektroforetická mobilita vzrůstá s rostoucí alkalitou 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 <sub>1</sub>	$pK_{a,1}$	R <sub>2</sub>	$pK_{a,2}$	R <sub>3</sub>	$pK_{a,3}$	R <sub>4</sub>	$pK_{a,4}$	R <sub>5</sub>	$pK_{a,5}$	R <sub>6</sub>	$pK_{a,6}$	R <sub>7</sub>	$pK_{a,7}$	$\log P$
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 <sub>3</sub>	-	-	-	OH	7,0	OH	9,2	1,1
penta-HA	OH	11,2	-	-	OH	5,3	COCH <sub>3</sub>	-	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<sub>2</sub> (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<sub>1</sub>, 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<sup>-3</sup> fosfátový pufr (pH 7,6) [82], napětí 15 kV; (B) 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritan sodný (pH 10,1), napětí 20 kV.

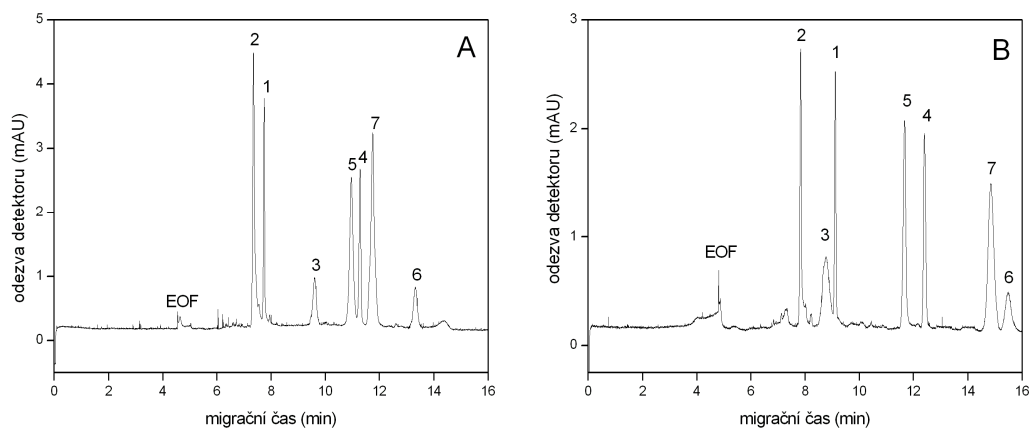
Pro zlepšení rozpustnosti analytů byl studován i micelární systém, tedy micelární elektrokinetická chromatografie. Vzhledem ke struktuře studovaných analytů byl vybrán dodecylsulfát sodný (SDS) jako vhodný anionogenní tenzid o koncentraci 0,01 – 0,02 mol·dm<sup>-3</sup>, která ve vodném roztoku tetraboritanu sodného či fosforečnanu a hydrogenfosforečnanu sodného přesahuje kritickou micelární koncentraci 8 mmol·dm<sup>-3</sup> [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 fází 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  $\mu_{\text{eff}}$  hydroxyderivátů anthrachinonu v MEKC při různých pH a koncentracích SDS. BGE: 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> tetraborátový pufr (pH 8,5 – 10,8) a 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> fosfátový pufr (pH 6,5 – 7,5).

pufr	pH	$\mu_{\text{eff}}$ (10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )						
		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<sup>-3</sup> v 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> tetraboritan sodný o pH 8,5 s 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> 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:  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritan sodný, pH 9,5 (A) či pH 8,5 (B) s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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  $1\cdot 10^{-6} - 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $5\cdot 10^{-7} - 5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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 píků na koncentraci, jsou uvedeny v tabulce 3. Meze stanovení jednotlivých analytů (řádově  $10^{-6} - 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) jsou dostatečně nízké pro stanovení malých množství organických barviv v barvených vláknech po extrakci, která velmi často vykazuje nízkou výtěžnost.



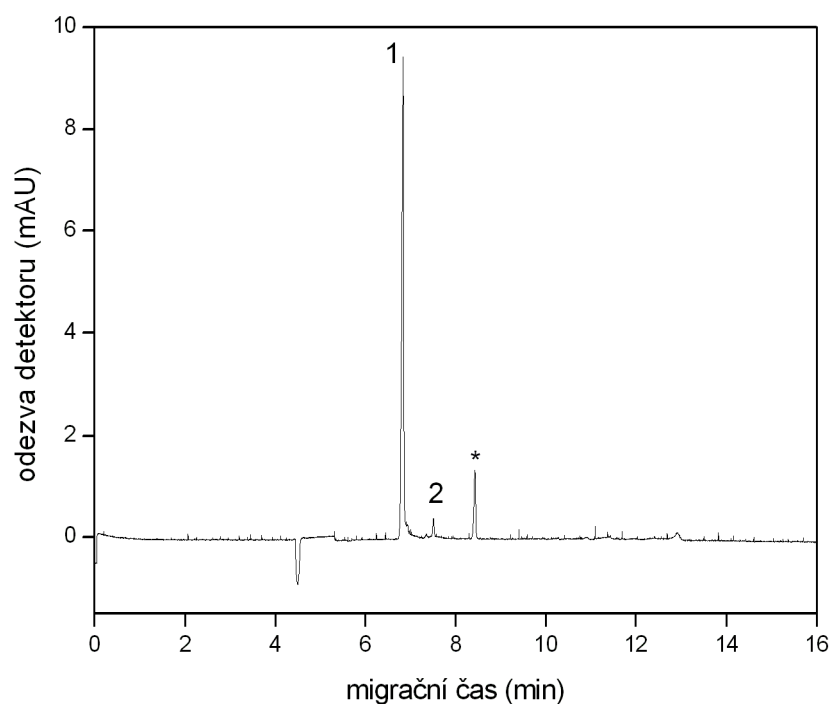
Tabulka 3 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) hydroxyderivátů anthrachinonu určené z regresních rovnic zpracovaných pro závislost výšky píku na koncentraci analytu. BGE: 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> tetraborátový pufr, pH 8,5 s přidavkem 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> SDS, dávkování 20 mbar po 5 s,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

analyt	LOD (mol·dm <sup>-3</sup> )	LOQ (mol·dm <sup>-3</sup> )
1-HA	5,00·10 <sup>-7</sup>	1,66·10 <sup>-6</sup>
2-HA	2,20·10 <sup>-7</sup>	7,41·10 <sup>-7</sup>
alizarin	4,00·10 <sup>-7</sup>	1,33·10 <sup>-6</sup>
quinizarin	1,28·10 <sup>-6</sup>	4,25·10 <sup>-6</sup>
purpurin	1,16·10 <sup>-6</sup>	3,86·10 <sup>-6</sup>
tetra-HA	4,21·10 <sup>-7</sup>	1,40·10 <sup>-6</sup>
penta-HA	2,10·10 <sup>-7</sup>	6,99·10 <sup>-7</sup>

#### 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<sup>-3</sup> tetraboritan sodný o pH 8,5 s 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> 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.

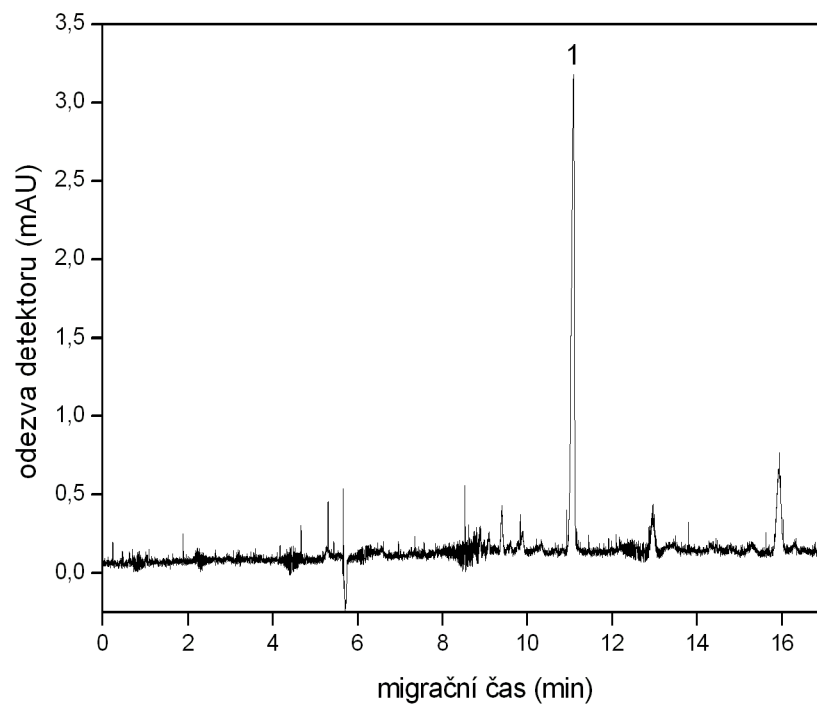
Kvantifikace alizarinu a purpurinu vycházela z lineární závislosti plochy píku na koncentraci analytu. Obsah alizarinu a purpurinu byl stanoven čtyřmi nezávislými analýzami methanolického extraktu *Rubia tinctorum*. Průměrná koncentrace alizarinu v extraktu byla 399 μmol·dm<sup>-3</sup> (RSD = 4,0 %),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



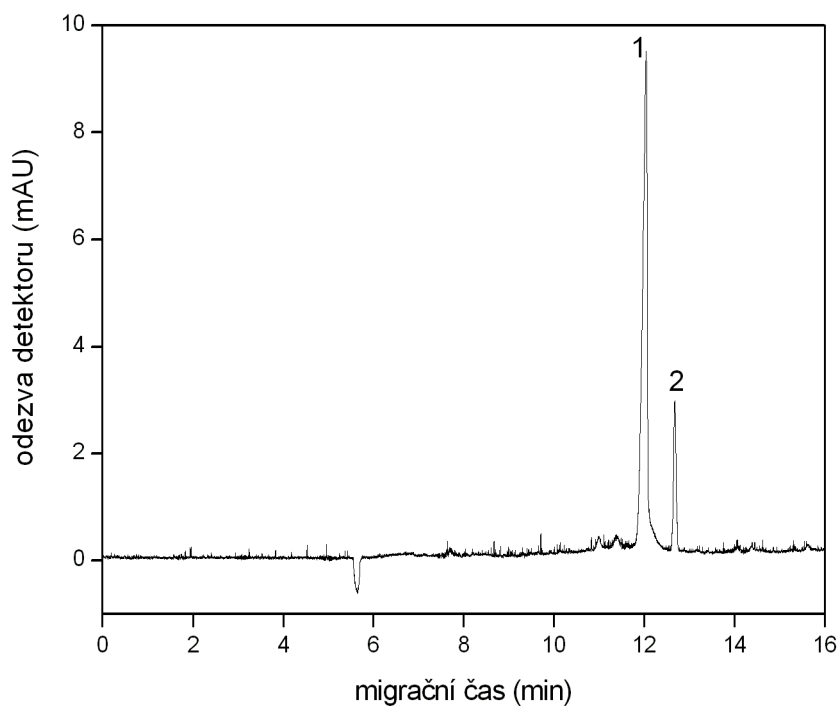
Obr. 21 MEKC elektroferogram methanolického extraktu *Rubia tinctorum* – (1) alizarin, (2) purpurin, (\*) pravděpodobně xanthopurpurin. BGE:  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritan sodný, pH 8,5 s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV, detekce 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  $31,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  analytu penta-HA (RSD = 4,2 %) a  $5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  analytu tetra-HA (RSD = 4,0 %).

Výtěžnosti extrakce analytů (vypočteny z plochy píků) získaných z reálných vzorků byly stanoveny pro dvě koncentrační hladiny, a to  $1,0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro tetra-HA a purpurin, a  $1,0\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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.



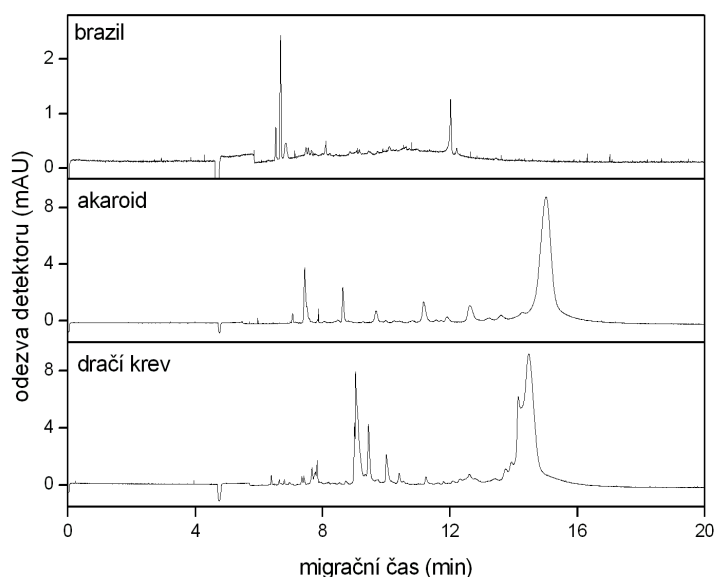
Obr. 22 MEKC analýza methanolického extraktu z *Rubia Cordifolia* – (1) 2-HA. BGE: 0,01 mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> SDS, dávkování 20 mbar po 3 s, napětí 20 kV, detekce při 254 nm.



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

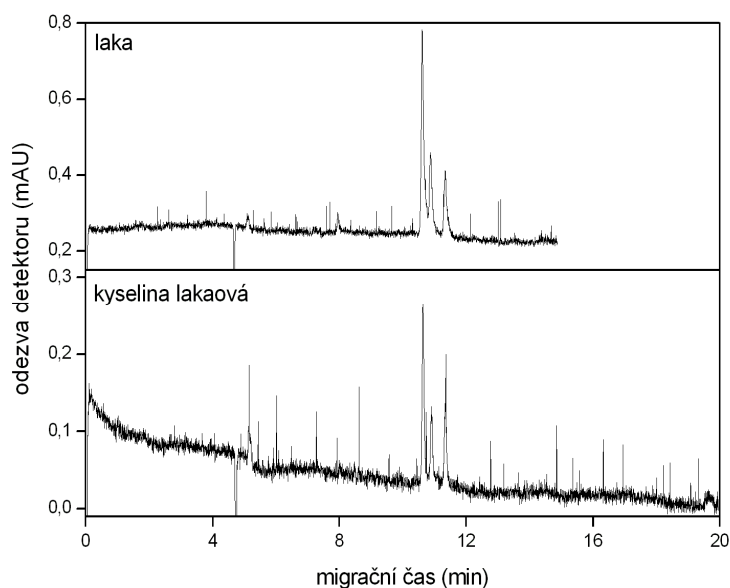
#### 4.1.1.3 Barviva (publikace II-III)

Za optimalizovaných podmínek, tedy  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritan sodný o pH 8,5 s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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).



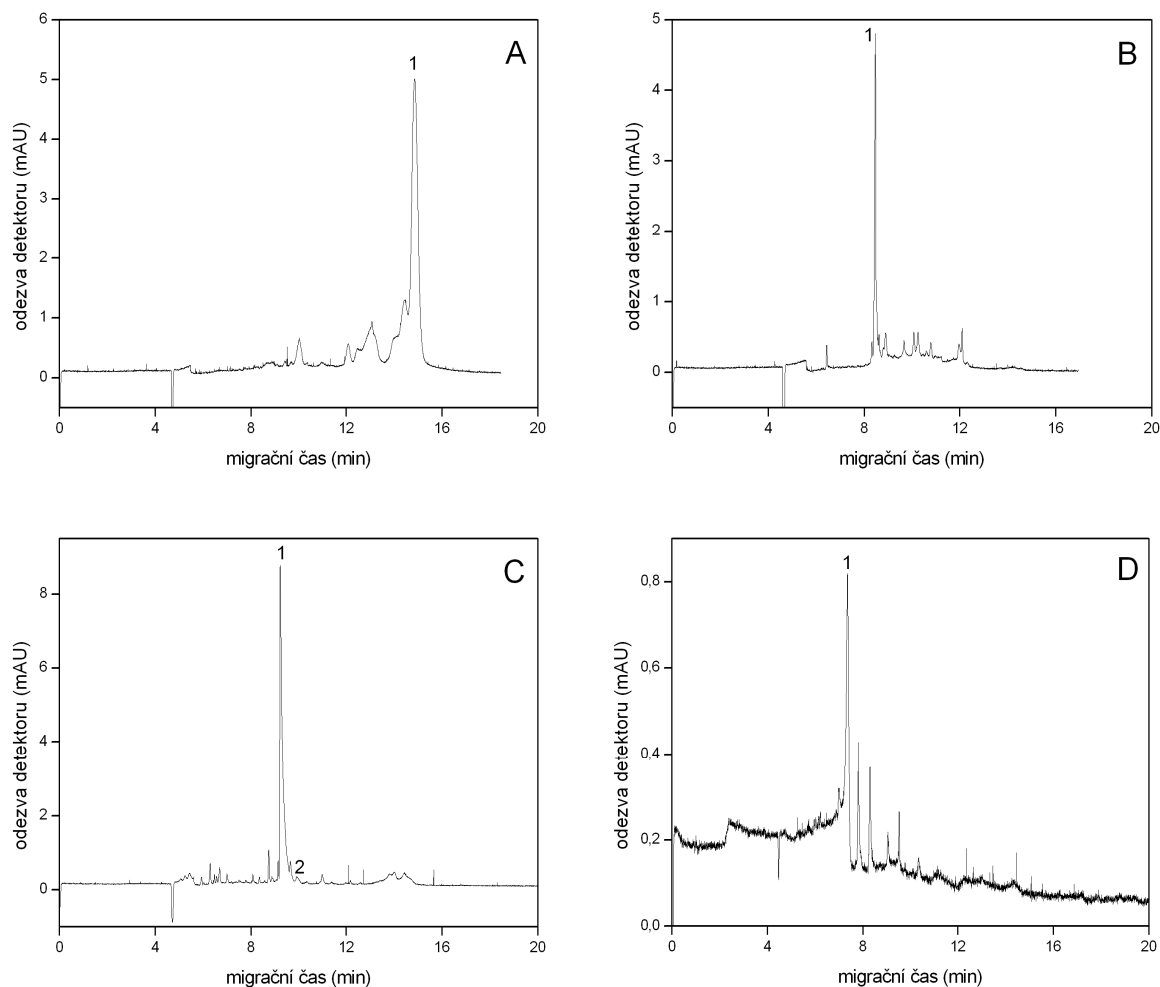
Obr. 24 MEKC záznamy měření barviv brazil, akaroid a dračí krev. BGE:  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritan sodný, pH 8,5 s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  SDS, dávkování 20 mbar (v případě dračí krve 30 mbar) po 5 s, napětí 20 kV a detekce při 254 nm.

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 patrný tři formy). BGE:  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraboritan sodný, pH 8,5 s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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<sup>-3</sup> tetraboritan sodný, pH 8,5 s 0,015 mol·dm<sup>-3</sup> SDS, dávkování 20 mbar po 5 s, napětí 20 kV a detekce při 254 nm.

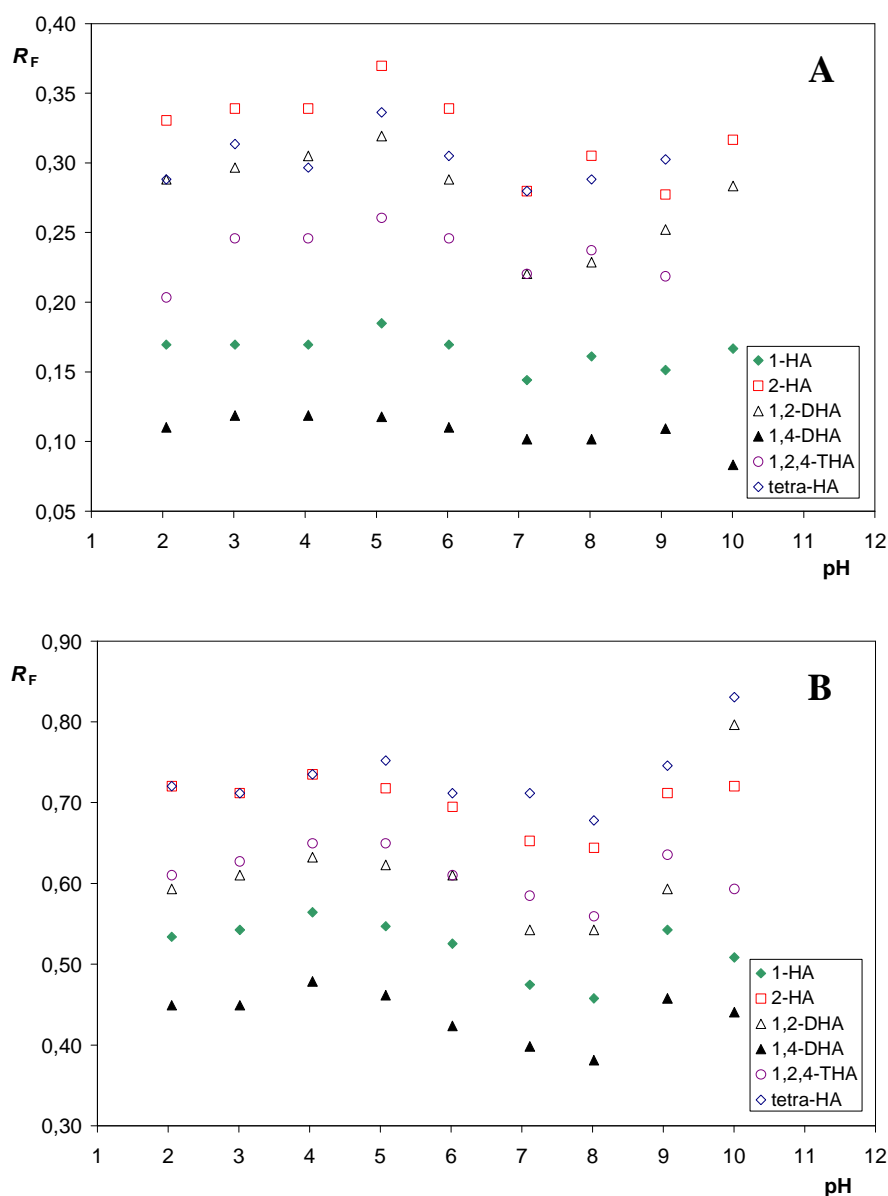
#### 4.1.2 TLC (publikace III)

Pro separaci studovaných organických barviv byl hledán vhodný „univerzální“ eluční systém s využitím silikagelových stacionárních fází. Obdobně jako u kapilární elektroforézy 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 fází 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<sup>-3</sup> octanovém pufru, pH 2 – 6 a dále 60/40 či 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm<sup>-3</sup> 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. Pufráčnými roztoky byly 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> octan sodný s 1% TEA pro hodnoty pH 2 - 6 a 0,025 mol·dm<sup>-3</sup> 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



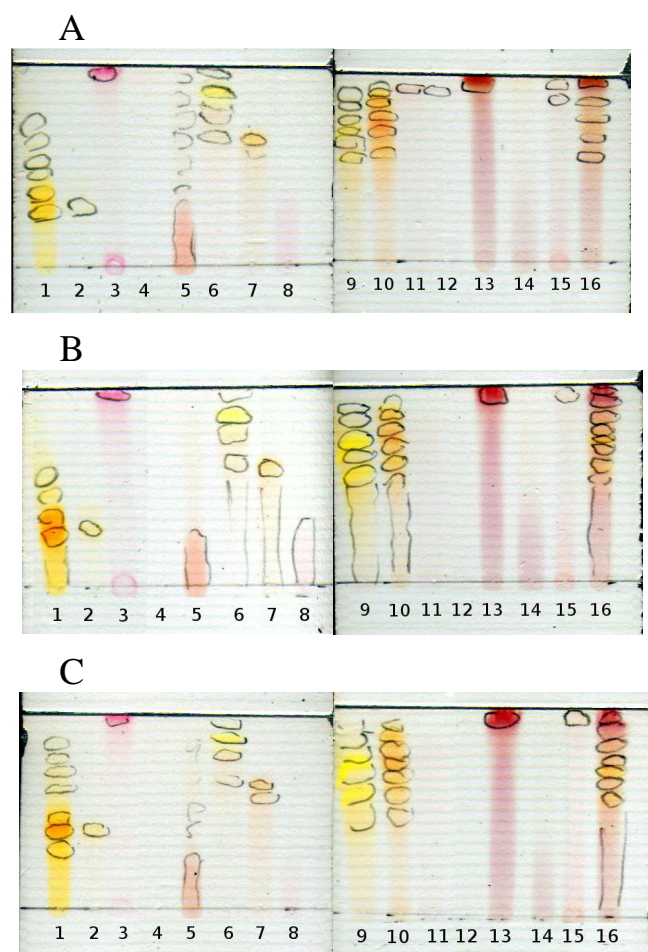
nepřekročily hodnotu 0,40. Oproti tomu ve vyvíjecí fázi tvořené z 80 obj. % MeOH mají analyty retardační faktory v rozmezí 0,40 – 0,90.

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<sup>-3</sup> octanovém pufru, pH 5 a 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm<sup>-3</sup> 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<sup>-3</sup> octanovém pufru, pH 5 a dále 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v 0,025 mol·dm<sup>-3</sup> 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 směsí 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<sup>-3</sup> acetátový pufr s 1% TEA, pH 5 (A), 80/20 (v/v) MeOH/0,025 mol·dm<sup>-3</sup> tetraboritan sodný s 1% TEA, pH 7 (B) a pH 9 (C).

#### 4.1.3 Dílčí závěr

Separací 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 nepřenositelné 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<sup>-3</sup> 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  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Díky své vysoké separační účinnosti lze za optimalizovaných podmínek ( $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraborátový pufr o pH 8,5 s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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 přísluší 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  $\text{CH}_2$  a  $\text{CH}_3$  skupin v oblasti  $1450 - 1230 \text{ cm}^{-1}$ , vibrace skupin  $\text{C}=\text{O}$  ve skupině  $\text{COO}^-$  a v konjugaci s vazbami  $\text{C}=\text{C}$  aromatického jádra v oblasti  $1720 - 1570 \text{ cm}^{-1}$  a vibrace OH skupiny včetně vazby  $\text{C}-\text{O}$  ve skupině OH v oblasti kolem  $3300 \text{ cm}^{-1}$  a  $1100 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ . Barvivo košenila obsahuje hlavní barvicí složku karmínovou kyselinu (případně karmín). Karmínová kyselina oproti karmínu obsahuje i glykosidickou skupinu, která

zvysuje intenzitu vibračních pásů v oblasti 1100 – 1000  $\text{cm}^{-1}$  příslušející vibracím OH skupin [77,84]. Další intenzivní pásy lze nalézt v oblastech 1620 – 1550  $\text{cm}^{-1}$  a 1450 – 1250  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$ ). Hlavní barvicí složkou barviva kampeška je hematein. Vibrační pásy hemateinu 1607, 1537, 1514, 1441, 1418, 1377, 1298, 1225, 1207, 1171 a 1066  $\text{cm}^{-1}$  [77] jsou velmi intenzivní a příslušejí převážně vibracím C=C, C=O (ve skupině COO<sup>-</sup>) 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  $\text{cm}^{-1}$  a 1700 – 1000  $\text{cm}^{-1}$  [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 zadeček 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  $\text{cm}^{-1}$ , 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  $\text{cm}^{-1}$  překryty intenzivními pásy iontů  $\text{SO}_4^{2-}$  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 spektroskopii. Intenzity pásů: vw = velmi slabá, w = slabá, m = střední, s = silná, vs = velmi silná

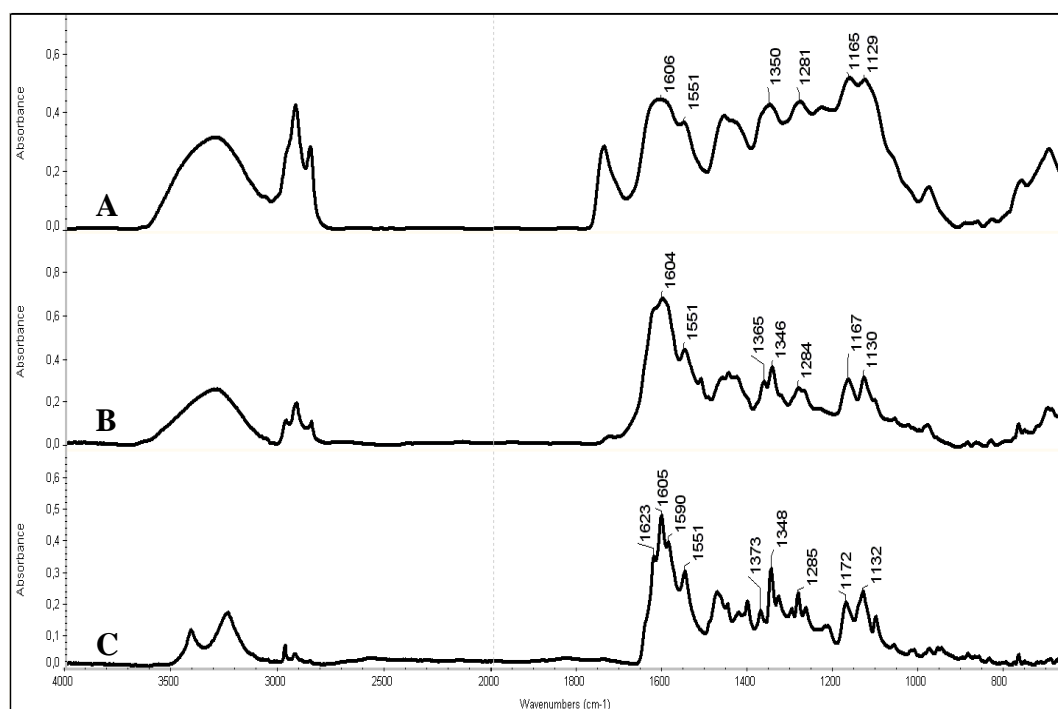
kamala cm <sup>-1</sup>	rottlerin cm <sup>-1</sup>	Orientační přiřazení	brazil cm <sup>-1</sup>	kampeška cm <sup>-1</sup>	hematein cm <sup>-1</sup>	dračí krev cm <sup>-1</sup>	akaroid cm <sup>-1</sup>	santal cm <sup>-1</sup>	košenila cm <sup>-1</sup>	karmínová kyselina cm <sup>-1</sup>	kraplak cm <sup>-1</sup>	alizarin cm <sup>-1</sup>	purpurin cm <sup>-1</sup>	laka cm <sup>-1</sup>	lakaová kyselina cm <sup>-1</sup>
-	3416 w	$\nu(\text{OH})/\nu(\text{C}=\text{O})$ v intramolekulární H-vazbě	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3295 w,br	3243 w,br	$\nu(\text{OH})$	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	$\nu_a(\text{CH}_3)$	-	2970 w	-	3025 w	3000 vw	-	-	-	-	-	3071 vw	-	2952 vw
2922 w	2933 vw	$\nu_a(\text{CH}_2)$	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	$\nu_a(\text{CH}_3+\text{CH}_2)$	2848 sh	2848 sh	-	2831 vw	2839 vw	2848 sh	2850 s	-	-	-	-	2851 sh	2854 vw
1724 vw	-	-	-	-	-	-	-	<b>1737 vw</b>	1730 w	1720 w	-	-	-	<b>1715 w</b>	1718 m
-	-	-	-	-	1697 vw	-	-	-	1703 w	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	1649 w	-	-	-	1673 vw	<b>1669 w</b>	1665 w	1669 w	-	-
-	1623 s	$\nu(\text{C}=\text{O})$ v konjugaci s C=C a v intramolekulární H-vazbě/ $\nu(\text{C}=\text{C})$ 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 <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	1594 w	-	-	1588 w	1591 m	1581 vs	-	-
<b>1551 m</b>	1551 s	C=O ve skupině COO <sup>-</sup>	-	-	1537 s	-	-	1549 vw	1566 m amide II	1576 m	-	-	-	1575 m	1571 s
1512 m	-	$\nu(\text{C}=\text{C})$ fenyl, akceptor	<b>1497 s</b>	<b>1503 m</b>	1514 s	<b>1511 vs</b>	<b>1513 s</b>	<b>1506 m</b>	-	-	-	-	-	1507 w	1501 w
1463 w	1475 m	$\nu(\text{C}=\text{C})$ fenyl, akceptor	-	<b>1476 s</b>	-	-	-	1461 m	1462 m	-	-	1463 vs	1456 m	-	-
1449 m	1451 m	$\delta_a(\text{CH}_3+\text{CH}_2)$	1449 s	1445 m	1441 vs	1453 m	1443 m	-	1437 m	1452 vs	-	-	1433 s	1453 vs	1443 vs
1424 sh	1425 w	$\delta(\text{CH}_2)$ rovinná	<b>1424 s</b>	-	-	-	-	<b>1424 m</b>	-	-	-	-	-	-	-
-	1404 m	$\delta(\text{CH}_2)$ rovinná	1412 sh	-	1418 vs	-	-	-	1414 s	-	<b>1411 m</b>	-	-	1409 s	1406 vs
-	1373 w	$\delta_s(\text{CH}_3+\text{CH}_2)$	1374 s	-	1377 s	-	-	1369 m	1380 s	1380 m	-	1401 vw	1382 w	<b>1378 s</b>	1375 vs
1365 w	-	-	<b>1363 m</b>	1362 m	-	1359 w	1365 m	-	-	-	1361 m	-	-	-	-
<b>1346 m</b>	1348 s	$\delta(\text{C-H})$	-	-	-	1341 w	1340 w	-	-	1350 s	-	1350 s	-	-	-
-	1331 m	$\delta_s(\text{C-H})$ , skelet	-	1323 sh	-	-	-	<b>1327 m</b>	-	-	-	1331 vs	1329 m	-	-
-	1300 w	$\delta_s(\text{C-H})$ , skelet	-	<b>1293 s</b>	1298 vs	-	-	-	-	-	1297 w	1303 vs	-	<b>1309 vs</b>	1294 vs
1284 w	1285 m	$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C}) + \delta(\text{CH}_2)$	1281 s	-	-	1283 m	-	-	-	-	-	-	1279 vs	-	-
-	1267 w	$\nu(\text{C-H})$ rovinná + $\nu(\text{C-O})$	<b>1250 s</b>	1261 s	-	-	1263 m	<b>1266 m</b>	-	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	-	<b>1209 s</b>	1207 s	<b>1205 s</b>	<b>1204 m</b>	-	-	-	-	1200 m	1201 m	-	-

Tabulka 4 pokračování

kamala cm <sup>-1</sup>	rottlerin cm <sup>-1</sup>	Orientační přiřazení	brazil cm <sup>-1</sup>	kampeška cm <sup>-1</sup>	hematein cm <sup>-1</sup>	dračí krev cm <sup>-1</sup>	akaroid cm <sup>-1</sup>	santal cm <sup>-1</sup>	košenila cm <sup>-1</sup>	karmínová kyselina cm <sup>-1</sup>	kraplak cm <sup>-1</sup>	alizarin cm <sup>-1</sup>	purpurin cm <sup>-1</sup>	laka cm <sup>-1</sup>	lakaová kyselina cm <sup>-1</sup>
-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1183 w	-	1190 m	1184 sh
<b>1167 m</b>	1172 m	v(C-O) ve skupině OH	1163 m	1169 m	1171 s	<b>1171 s</b>	<b>1161 m</b>	<b>1155 s</b>	1153 m	1154 w	-	1162 w	1167 s	1163 m	1169 sh
-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1146 m</b>	-	-	1148 w	1142 sh
<b>1130 m</b>	1132 m	v(C-O) ve skupině OH	-	-	1138 w	-	-	-	-	-	-	-	-	1127 w	1127 sh
1103 w	1103 w	v(C-O) ve skupině OH	<b>1113 m</b>	-	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	<b>1047 m</b>	<b>1056 s</b>	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	-	<b>1022 vs</b>	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	<b>954 vw</b>	-	-	-	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	<b>834 m</b>	<b>835 s</b>	834 vw	-	848 w	-	849 vw	-	<b>834 vs</b>	834 w
-	-	nespecifická mimorovinná vibrace	-	-	-	-	-	-	-	818 w	-	828 vw	813 vw	<b>812 vs</b>	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	-	<b>774 s</b>	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)

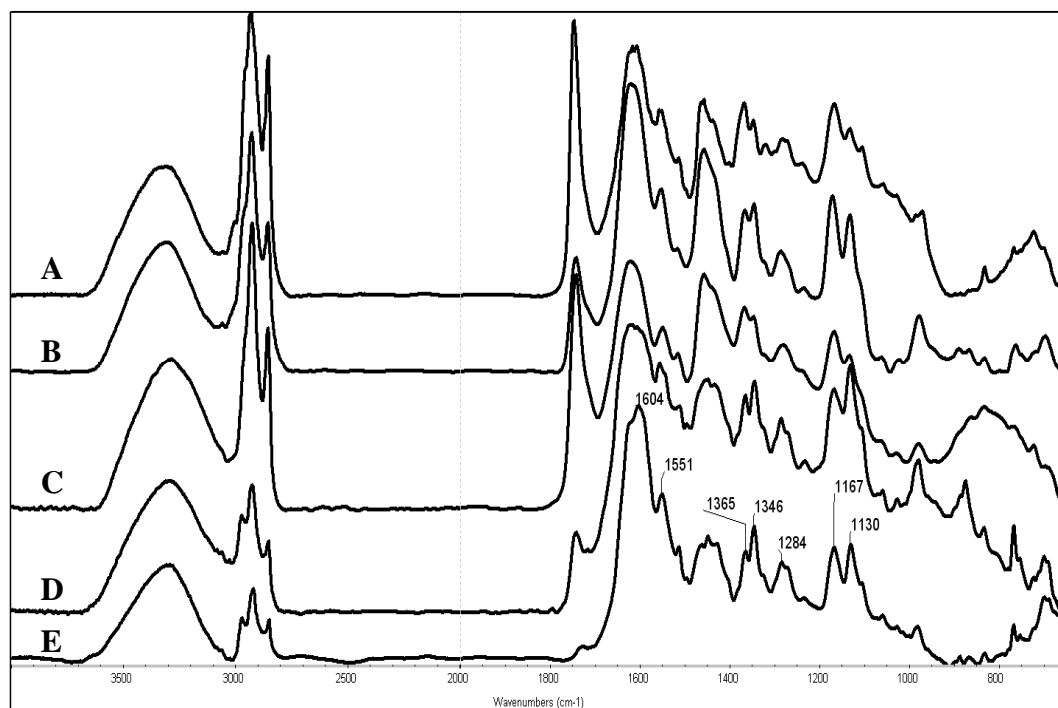
Navržená metodika byla aplikována na modelové vzorky olejových barev, tedy směsi barviva s lněným olejem ve formě husté pasty nanesené na skle. Infračervené spektrum polymerovaného lněného oleje, který byl historicky nejčastěji používán jako pojivo tvořící jemný průhledný film, je mnohem chudší a tvoří jej především intenzivnější vibrační pásy odpovídající vibracím C=O a C-H vazeb [64,84], a to jak valenčním, tak i deformačním ( $3004, 2935, 2855, 1749, 1627, 1464, 1377, 1233, 1167, 1101, 968, 723 \text{ cm}^{-1}$ ). 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 ukázkou 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  $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Pro identifikaci kamaly lze využít vibrační pásy  $1606, 1551, 1360, 1281, 1165$  a  $1129 \text{ cm}^{-1}$ .



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  $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , spektrální rozlišení  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

Jak v nestárnutém, tak v stárnutém modelovém vzorku směsi kampašky s polymerovaným lněným olejem lze v infračerveném spektru identifikovat barvivo kampaška pomocí vibračních pásů pro vlnočty 1612, 1504, 1321, 1285 a 1059  $\text{cm}^{-1}$ . Ve spektru směsi kraplaku s olejem nalezneme pouze tři vibrační pásy, které přísluší alizarinu při vlnočtech 1595, 1337 a 1268  $\text{cm}^{-1}$ . Tytéž vibrační pásy nalezneme i ve spektru urychleně stárnutého modelového vzorku. Ve spektru stárnuté směsi laku s olejem identifikujeme laku pomocí pásů při vlnočtech 1625, 1573, 1509, 1409, 1309, 1057, 1014, 830, 810 a 777  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$ ), akaroid (1605, 1513, 1339 a 835  $\text{cm}^{-1}$ ), brazil (1612, 1502, 1242 a 853  $\text{cm}^{-1}$ ) a santal (1595 a 1318  $\text{cm}^{-1}$ ).

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<sub>2</sub>, (C) 2PbCO<sub>3</sub>·Pb(OH)<sub>2</sub>, (D) CaCO<sub>3</sub>; a (E) kamala; rozsah vlnočtů 650 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , spektrální rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ .

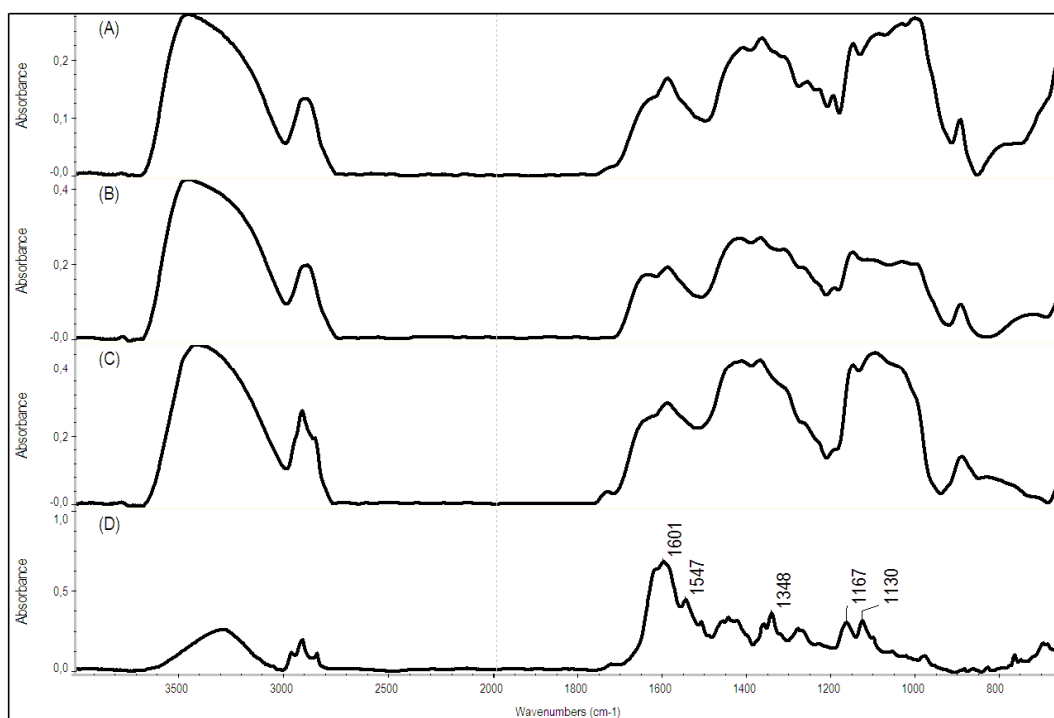


#### 4.2.1.2 Barvená textilie (publikace V)

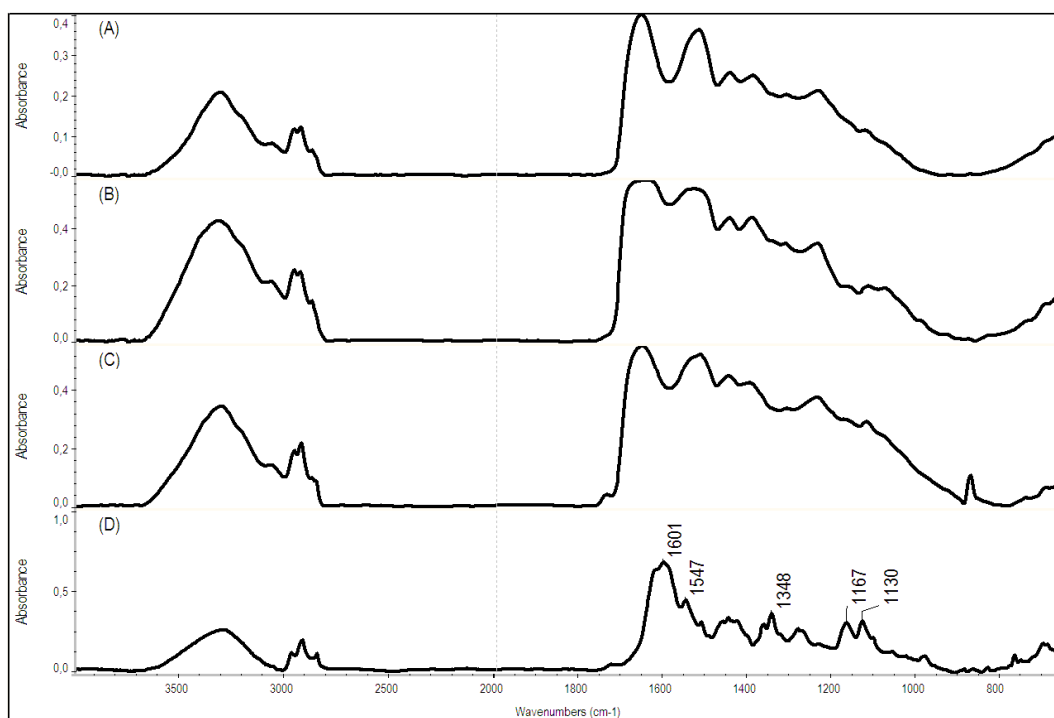
Metodika mikroskopické infračervené spektroskopie byla dále ověřena na identifikaci studovaných barviv v barvených textilních vláknech vlny s viskózou. Vlněná vlákna mořená ionty  $\text{Al}^{3+}$  (vlina zbarvená bíle),  $\text{Fe}^{2+}$  (vlina světle hnědá) a  $\text{Cu}^{2+}$  (vlina světle zelená) obsahují ve svém spektru intenzivní pásy v oblasti  $2800 - 3600 \text{ cm}^{-1}$  příslušející vibracím OH, N-H a C-H skupin [84]. Dva nejintenzivnější proteinové pásy (amid I a amid II) s vlnočty kolem  $1650$  a  $1550 \text{ cm}^{-1}$  příslušejí vibracím C=O vazby, resp. N-H a C-N vazby [84]. Viskózová vlákna jsou sacharidového skeletu, což se projevuje ve spektru silnými pásy v oblastech vlnočtů  $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  a  $1500 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ . 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  $3341 \text{ cm}^{-1}$  na  $3311 \text{ cm}^{-1}$ ) a v intenzitě vibračních 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  $\text{Al}^{3+}$ ) barveného kamalou lze najít vibrační pásy, které se odlišují od spektra nebarvené vlny, a to pro vlnočty  $1738$ ,  $1167$  a  $1130 \text{ cm}^{-1}$ . Tyto pásy nalezneme i v infračerveném spektru kamaly, respektive rottlerinu (tabulka 4). Ostatní významné vibrační pásy kamaly ( $1551 \text{ cm}^{-1}$  a  $1346 \text{ cm}^{-1}$ ) jsou překryty intenzivnějšími pásy vlněného vlákna. Ve spektru stárnutého vlněného vlákna barveného kamalou (mořeného ionty  $\text{Al}^{3+}$ ) lze přes snížení intenzity vibračních pásů využít pás odpovídající vlnočtu  $1121 \text{ cm}^{-1}$  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.



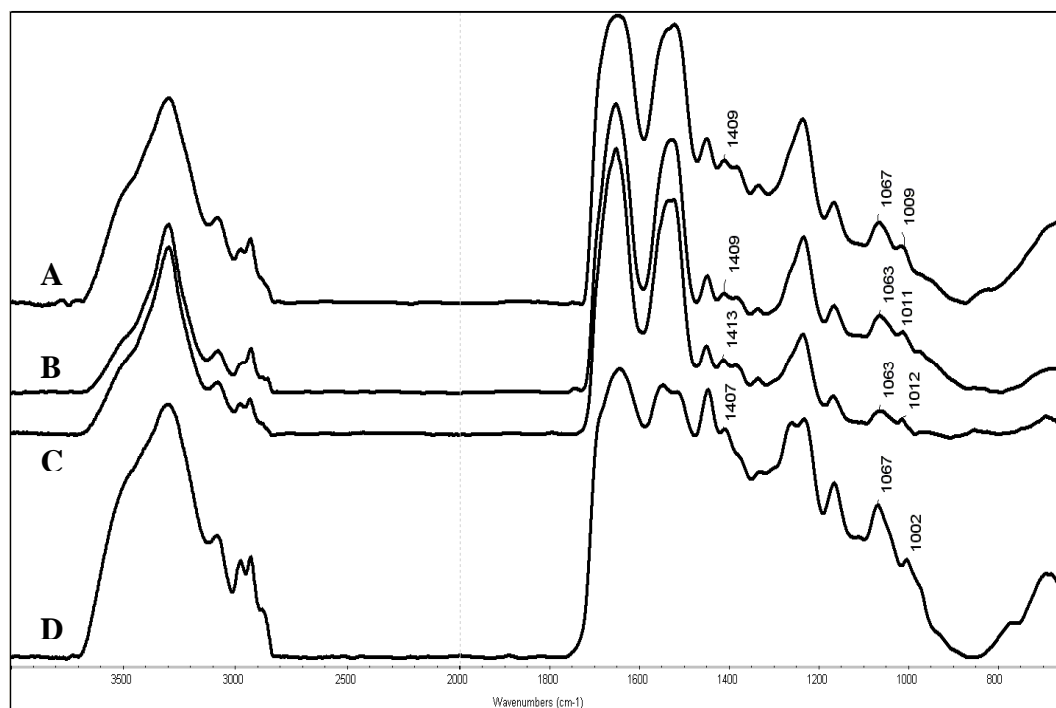
Obr. 31 Infračervená spektra viskózních vláken barvených kamalou po urychleném stárnutí, kde vlákno bylo mořeno ionty (A)  $\text{Al}^{3+}$ , (B)  $\text{Cu}^{2+}$ , (C)  $\text{Fe}^{2+}$  a (D) spektrum samotného barviva kamala; rozsah vlnočtů  $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , spektrální rozlišení  $4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



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

#### 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  $1650\text{ cm}^{-1}$  a  $1550\text{ cm}^{-1}$ , 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  $1012\text{ cm}^{-1}$ . 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. Zbývá 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  $650 - 4000\text{ cm}^{-1}$ , spektrální rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 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.

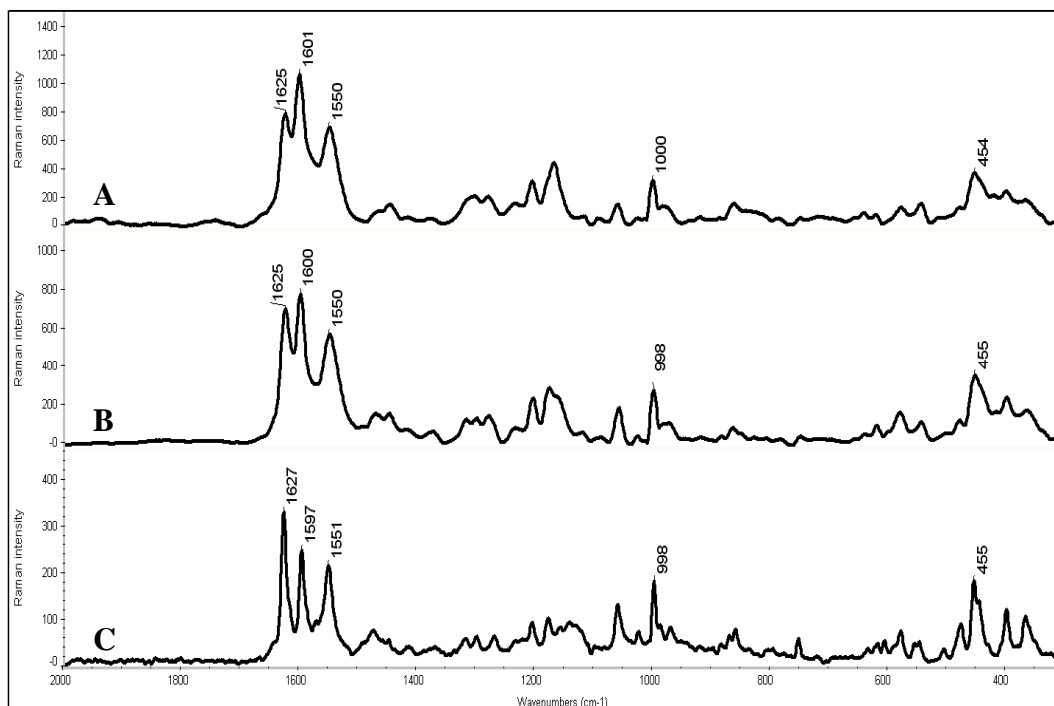
V Ramanově spektru rottlerinů nalezneme řadu významných pásů odpovídající vlnovým 1627, 1597, 1551, 1476, 1300, 1206, 1178, 1142, 1060, 998, 971, 860, 753, 580, 556, 478, 447, 400 a 368  $\text{cm}^{-1}$ . Barvivo kamala vykazuje v Ramanově spektroskopii obdobná spektra jako rottlerin, kdy nejvýraznějšími pásy jsou tři vibrační pásy pro vlnové 1626, 1600 a 1552  $\text{cm}^{-1}$ , které jsou pro kamalu, respektive rottlerin specifické. Ramanovo spektrum hemateinu tvoří vibrační pásy pro vlnové 1607, 1566, 1415, 1396, 1252, 1172, 770, 701, 633, 544 a 478  $\text{cm}^{-1}$ , 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  $\text{cm}^{-1}$ . Nalezneme zde vibrační pásy 1658, 1632, 1587, 1568, 1457, 1401, 1294, 1216, 1191, 1162, 682, 660, 468, 418, 359 a 345  $\text{cm}^{-1}$  pro alizarin (shoda s [71]), a 1466, 1330, 1252, 1068, 453 a 417  $\text{cm}^{-1}$  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 převyšeno vysokou fluorescencí. Při excitaci laserem 785 nm získáme vibrační pásy při vlnových 1574, 1463, 1234, 1097, 454 a 408  $\text{cm}^{-1}$ . Opět díky vysoké fluorescenci se samotné barvivo laka nepodařilo 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 vlnových 1466, 1220, 452 a 430  $\text{cm}^{-1}$ . Ramanovo spektrum karmínu je bohatší, obsahuje vibrační pásy při vlnových 1487, 1423, 1358, 1316, 1252, 1110, 567, 471 a 424  $\text{cm}^{-1}$ . 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

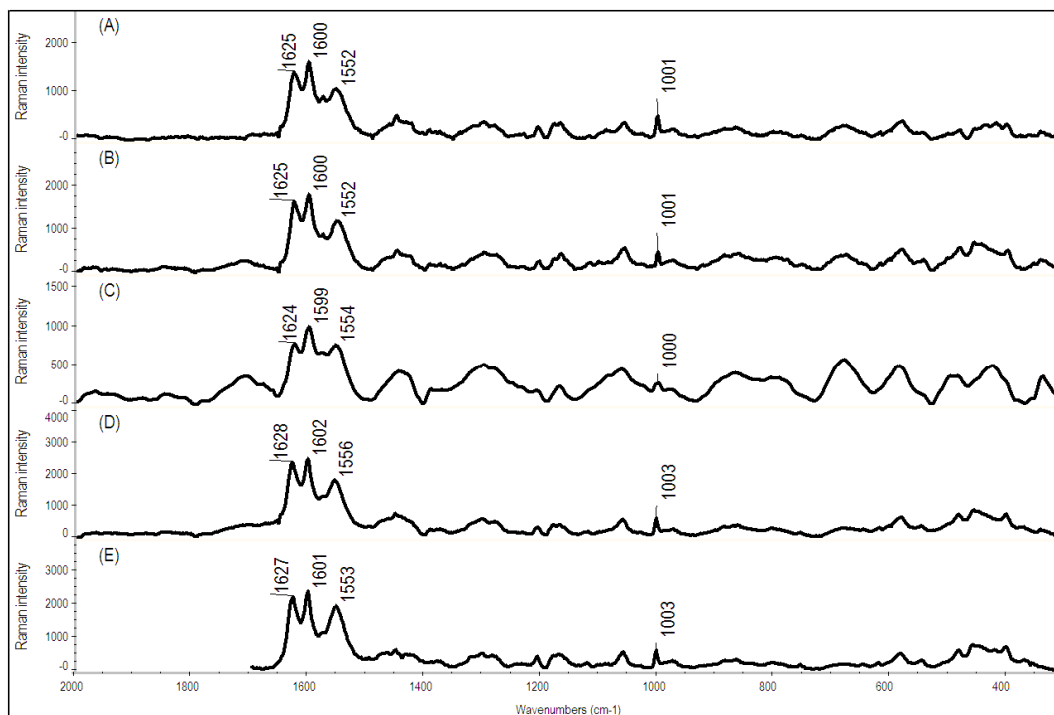
Vlnočty v rozmezí 1700 cm <sup>-1</sup> – 1140 cm <sup>-1</sup>										Vlnočty v rozmezí 1140 cm <sup>-1</sup> – 300 cm <sup>-1</sup>									
kamala cm <sup>-1</sup>	rotlerin cm <sup>-1</sup>	Orientační přiřazení	kampeška cm <sup>-1</sup>	hematein cm <sup>-1</sup>	karmínová kyselina cm <sup>-1</sup>	karmín cm <sup>-1</sup>	alizarin cm <sup>-1</sup>	purpurin cm <sup>-1</sup>	lakaová kyselina cm <sup>-1</sup>	kamala cm <sup>-1</sup>	rotlerin cm <sup>-1</sup>	Orientační přiřazení	kampeška cm <sup>-1</sup>	hematein cm <sup>-1</sup>	karmínová kyselina cm <sup>-1</sup>	karmín cm <sup>-1</sup>	alizarin cm <sup>-1</sup>	purpurin cm <sup>-1</sup>	lakaová kyselina cm <sup>-1</sup>
-	-		-	-	-	-	1658 w	-	-	-	-		-	-	-	1110 vw	-	-	-
1628 vs	1630 vs	v(C=O) v konjugaci s C=C a v intramolekulární H-vazbě/v(C=C) fenyl	-	-	-	-	1632 w	-	-	1062 vw	1064 w	v(C-O) skupiny OH	-	1058 vw	-	-	-	1068 m	1097 w
1602 vs	1600 m	C=C konjugované (aromaty)	1607 m	1607 m	-	-	1587 s	-	-	1003 vw	1001 vw	v(C-H) mimorovinné	-	-	-	-	-	-	-
1554 s	1555 m	C=O skupiny COO <sup>-</sup>	1565 vs	1566 vs	-	1527 w	1568 m	-	1574 s	972 vw	976 vw		-	-	-	-	-	968 w	-
-	-		-	-	1497 m	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	903 vw	-
1469 vw	1480 vw	v(C=C) fenyl	-	-	1475 sh	1487 m	-	-	-	865 vw	863 vw		-	874 vw	-	-	-	831 vw	-
-	-		-	-	1466 vs	-	1457 m	1466 vs	1463 vs	-	805 vw		-	-	-	-	-	-	-
-	-		-	-	1459 s	-	-	-	-	-	757 vw		771 vw	770 vw	-	-	-	-	-
1451 vw	-		-	-	1451 s	-	-	-	-	-	-		701 w	703 vw	-	-	682 vw	-	-
-	-		-	-	1443 sh	1423 m	-	-	-	585 vw	583 vw		633 vw	633 vw	-	-	660 w	657 vw	-
1422 vw	-		1413 sh	1415 m	-	-	-	-	-	-	554 vw		-	-	-	-	-	-	-
-	-		1394 s	1396 s	-	-	1402 vw	-	-	-	-		543 vw	544 w	-	567 w	568 vw	-	-
1380 vw	-		-	-	-	-	-	-	1379 m	484 vw	483 w	mimorovinné a rovinné vibrace substituovaného benzenu	477 vw	478 w	-	471 m	484 w	-	513 vw
-	-		-	-	-	-	1358 m	-	1326 m	458 w	450 w	mimorovinné a rovinné vibrace substituovaného benzenu	442 vw	452 vw	452 m	-	468 vs	453 m	454 m
1304 vw	1303 vw		-	-	-	1316 vs	1294 vw	-	-	-	-		-	-	430 m	424 w	-	-	-
-	-		-	1252 vw	-	1252 s	-	1252 vs	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
-	-		1248 vw	-	1227 m	-	-	-	1234 s	403 vw	404 w	nespecifické mimo- a rovinné vibrace	-	-	-	-	418 w	417 m	408 m
-	-		-	-	1220 m	-	-	-	-	-	371 vw	nespecifické mimo- a rovinné vibrace	-	-	-	-	388 w	-	-
1208 vw	1209 vw		-	-	1213 m	-	1216 w	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
1177 vw	1183 vw	v(C-O) skupiny OH	-	-	-	-	1191 s	-	-	-	-		-	-	-	-	345 w	-	-
-	-		-	1172 vw	-	-	1162 w	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
-	1147 vw	v(C-O) skupiny OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-		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  $\text{cm}^{-1}$ . Ramanovo spektrum stárnutého modelového vzorku karmínu s olejem obsahuje vibrační pásy pro vlnočty 1525, 1485, 1442, 1309, 1255, 1224 a 462  $\text{cm}^{-1}$ , 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  $\text{cm}^{-1}$  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  $\text{cm}^{-1}$ . Identifikace kraplaku, akaroidu, brazilu, dračí krve a santalu v modelovém vzorku směsi barviva s polymerovaným olejem technikou Ramanovy mikrospektroskopie 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  $\text{cm}^{-1}$ , spektrální rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ .



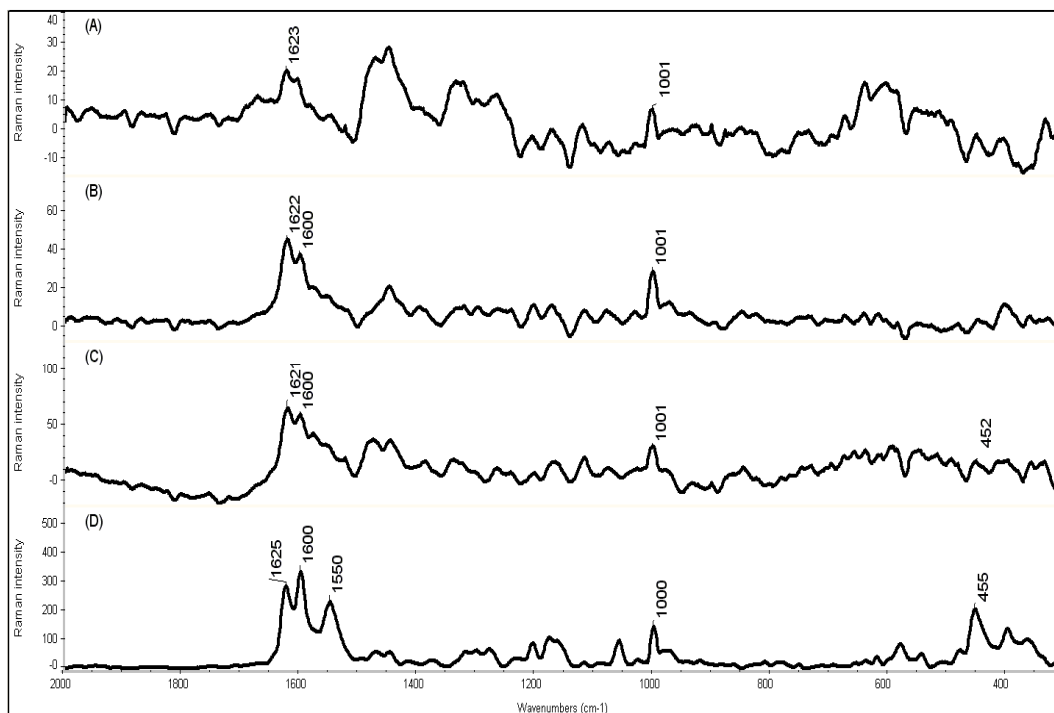
Obr. 35 Ramanova spektra směsí kamaly s bělobou a polymerovaným olejem v poměru 1:2:10 (v/v/v) po urychleném stárnutí, kde bělobou byl (A) ZnO, (B) TiO<sub>2</sub>, (C) Pb(OH)<sub>2</sub> · 2 PbCO<sub>3</sub> a (D) CaCO<sub>3</sub>, a (E) spektrum samotného barviva kamala po excitaci při 532 nm; rozsah vlnočtů 300 – 2000 cm<sup>-1</sup>, spektrální rozlišení 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 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<sup>2+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, 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<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> a FeSO<sub>4</sub>, 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<sup>-1</sup>. Obdobně lze v stárnutých vlněných vláknech identifikovat barvivo kampeška po nalezení specifických vibračních pásů pro vlnočty 1607, 1565, 1413, 1394 a 701 cm<sup>-1</sup>.

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)  $\text{Fe}^{2+}$ , (B)  $\text{Cu}^{2+}$ , (C)  $\text{Al}^{3+}$  a (D) spektrum samotného barviva kamala po excitaci při 785 nm; rozsah vlnočtů 300 – 2000  $\text{cm}^{-1}$ , spektrální rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 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  $\text{cm}^{-1}$ , kampešku 1503, 1476, 1293, 1209 a 1056  $\text{cm}^{-1}$  a laku 1715, 1378, 1309, 834, 812 a 774  $\text{cm}^{-1}$ . U barviva kraplak jsou vibrační pásy příslušející pásům jeho hlavních barvicích složek slity do širokých pásů. Nejintenzivnější pásy odpovídají anorganické matici, 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 přiřadit 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  $\text{cm}^{-1}$ ) a kampeška (1607, 1565, 1413, 1394 a 701  $\text{cm}^{-1}$ ). 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  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octanovém pufru, pH 5 a 80/20 (v/v) MeOH/1% TEA v  $0,025 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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 anthrachinonových derivátů. Jako elektrolyt byl vybrán  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fosfátový a  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraborátový pufr o pH 6,5 – 10,8 s přidavkem dodecylsulfátu sodného o koncentraci 0,00 –  $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Optimalizované podmínky, tj.  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  tetraborátový pufr o pH 8,5 s  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  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 barvicích 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  $\text{cm}^{-1}$ , kampešky 1503, 1476, 1293, 1209 a 1056  $\text{cm}^{-1}$  a laky 1715, 1378, 1309, 834, 812 a 774  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$  po excitaci při 532 nm a barvivo kamala s vibračními pásy 1626, 1600, 1573, 1552 a 1001  $\text{cm}^{-1}$  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  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . 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.; Drašar, 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. Příkryl, 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.; Połec-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.; Połec-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 – Vorkommen – 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