



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Mgr inż. Olga Otłowska
Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: IDENTYFIKACJA NATURALNYCH ORGANICZNYCH
SUBSTANCJI BARWIĄCYCH OBECNYCH W HISTORYCZNYCH FARBACH I TEKSTYLIACH

Tytuł rozprawy w języku angielskim: IDENTIFICATION OF NATURAL ORGANIC DYESTUFFS
PRESENT IN HISTORICAL PAINTS AND TEXTILES

Promotor
<i>Podpis</i>
Dr hab. Magdalena Śliwka-Kaszyńska

Gdańsk, 2018

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	3
ABSTRACT	5
WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	7
WPROWADZENIE	9
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	11
1. Definicja barwy	11
2. Podział barwników	11
2.1. Flawonoidy i ich glikozydy	12
2.2. Barwniki chinoidowe i ich glikozydy	16
2.4. Karotenoidy	18
2.5. Indygoidy	18
2.6. Inne barwniki z grupy polifenoli	20
3. Fotodegradacja barwników	22
4. Laki barwne i zaprawy barwierskie	23
5. Metody izolacji i identyfikacji substancji barwiących z różnego typu matryc	24
ZAŁĄCZNIK I	26
II. CEL I ZAKRES PRACY	27
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	28
1. Odczynniki	28
2. Materiał badawczy	29
3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	30
4. Laki barwne i farby artystyczne	31
5. Optymalizacja metody izolacji substancji barwiących	33
5.1. Wpływ rodzaju ekstrahenta	33
5.1.1. Farby modelowe	33
5.1.2. Historyczna farba <i>Jaune de Indien</i>	36
5.2. Wpływ stężenia ekstrahenta	41
5.3. Wpływ temperatury	43
5.4. Oczyszczanie ekstraktów techniką ekstrakcji do fazy stałej	44
5.5. Wpływ czasu pracy łaźni ultradźwiękowej	44
5.6. Metody izolacji substancji barwiących z różnego typu matryc	46

6.	Optymalizacja warunków pracy chromatografu cieczowego i spektrometru mas	46
7.	Analiza próbek o znaczeniu historycznym.....	52
7.1.	Substancje barwiące obecne w tkaninach historycznych	52
7.1.1.	Włókna pochodzące z XVI-wiecznego kobierca.....	52
7.1.2.	Włókna pochodzące ze średniowiecznego arrasu	67
7.2.	Substancje barwiące obecne w farbach historycznych.....	69
7.2.1.	Farby pochodzące z tubek Jana Matejki.....	70
7.2.2.	Farby pochodzące z palet malarskich.....	81
7.2.3.	Farby pochodzące z obrazów XIX wiecznych malarzy	85
7.3.	Substancje barwiących obecne w wybranych surowcach barwierskich.....	88
7.3.1.	Żółcienie.....	88
7.3.2.	Czerwienie.....	92
7.3.3.	Błękity	99
8.	Fotodegradacja barwników	101
8.1.	Identyfikacja produktów fotodegradacji barwników w ekstraktach surowców barwierskich	101
8.2.	Identyfikacja produktów fotodegradacji barwników w farbach.....	116
9.	Podsumowanie i wnioski końcowe	117
10.	Dorobek naukowy	120
	LITERATURA.....	122
	SUPLEMENT PRACY	129

STRESZCZENIE

Przy badaniu obiektów muzealnych, w tym obrazów czy też historycznych tkanin, istotną rolę odgrywa identyfikacja materiałów użytych do ich powstania. Stanowi to ogromne wyzwanie dla badaczy i wymaga zastosowania zaawansowanych technik analitycznych. Naturalne substancje barwiące są komponentami większości dzieł sztuki, a ich identyfikacja dostarcza informacji istotnych dla szerokiego grona specjalistów zajmujących się obiektami muzealnymi. Znajomość składu barwników pomocna jest nie tylko w opracowaniu odpowiedniej i efektywnej procedury konserwatorskiej, ustaleniu okresu powstania dzieła i jego pochodzenia, ale także w potwierdzeniu jego autentyczności i w końcu utworzeniu rzetelnej dokumentacji muzealnej. Izolacja i identyfikacja barwników obecnych w farbach artystycznych jest pracochłonna i często dość skomplikowana. Farby w swoim składzie zawierają bowiem nie tylko barwniki, ale także spoiwa malarskie i inne dodatki, które utrudniają prawidłową identyfikację substancji barwiących. Co więcej, naturalne barwniki organiczne występują w farbach w postaci tak zwanych laków, będących kompleksami substancji barwiących z metalami osadzonymi na nośnikach nieorganicznych. W tkaninach natomiast związane są z włóknem za pomocą zapraw barwierskich. Procedura pobierania próbek farb z obrazów jest bardziej kontrowersyjna niż w przypadku wyciągania pojedynczych włókien z tekstyliów. W celu ustalenia, z jakiego surowca barwierskiego pochodzą dane substancje barwiące niezbędna jest identyfikacja nie tylko głównych składników, ale i tych występujących w ilościach śladowych. Pozwala to bowiem na odróżnienie surowców barwierskich pochodzących z blisko spokrewnionych gatunków.

Naturalne barwniki organiczne pozyskiwane z roślin, owadów czy też skorupiaków występują często w formie niestabilnych chemicznie glikozydów. W celu ich prawidłowej identyfikacji w pierwszym etapie należy tak wyizolować je z danej matrycy, aby nie spowodować ich zmian strukturalnych. Z tego też względu zastosowanie łagodnej ale i efektywnej metody ekstrakcji odgrywa kluczową rolę. Barwniki organiczne różnią się budową chemiczną i mają często odmienne właściwości fizykochemiczne, co powinno być uwzględnione w trakcie analizy. Problematyka badań barwników z próbek muzealnych jest bardzo rozległa. Sprawia to konieczność opracowania optymalnej metodyki ich izolacji i identyfikacji.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie uniwersalnej metody izolacji i identyfikacji substancji barwiących obecnych w różnego typu matrycach z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (HPLC-MS).

W ramach badań zrealizowano następujące cele badawcze:

- opracowano metodykę izolacji substancji barwiących z farb, tkanin oraz surowców barwierskich;
- opracowano uniwersalną metodę identyfikacji substancji barwiących z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią UV-Vis i spektrometrią mas;
- przeprowadzono pełną identyfikację substancji barwiących obecnych w surowcach barwierskich;
- przygotowano laki barwne oraz modelowe farby olejne na podstawie archiwalnych przepisów;
- zidentyfikowano szereg substancji barwiących oraz produktów ich naturalnej degradacji w historycznych próbkach farb i tekstyliów;
- na podstawie analiz SEM-EDS oraz FTIR scharakteryzowano zaprawy barwierskie oraz rodzaj włókien historycznych;
- ekstrakty z surowców barwierskich oraz farby modelowe poddano procesowi naświetlania lampą ksenonową;
- ustalono struktury chemiczne produktów fotodegradacji.

Przeprowadzone badania przyczyniają się do poszerzenia wiedzy na temat barwników stosowanych przez danych artystów. Pozwalają przybliżyć ich warsztat artystyczny, jak i poznać preferencje w wyborze określonej palety barw. Dostarczają również cennych informacji na temat rozpowszechnienia i stosowalności danych barwników w konkretnym okresie dziejowym. Przyczynić się to może do pewniejszego datowania dzieła, a nawet potwierdzenia jego autentyczności. Istotne jest to zarówno dla historyków sztuki, jak i dla całego rynku aukcyjnego oraz muzeów gromadzących swoje zbiory. Znajomość składu substancji barwiących obecnych w różnego rodzaju surowcach barwierskich dostarcza także cennych informacji przydatnych i innym dziedzinom nauki, w tym chemii konserwatorskiej, chemii związków naturalnych czy biologii.

ABSTRACT

In the study of objects of cultural heritage such as textiles and paints, the identification of the materials plays an important role. This is a huge challenge for scientists and requires application of advanced analytical techniques. Natural organic dyestuffs are components of many works of art. The identification of colouring substances present in historical objects provides relevant information for a wide range of specialists dealing with works of art. Knowledge about natural dyes in historical objects is helpful for the development of effective and appropriate conservation strategies, to determine the origin of an artefact, as well as to obtain historical information necessary for the purposes of documenting an artwork and determining a work's authenticity. The isolation and identification of dyestuffs from paints used by artists is complicated and time-consuming. Paints, in their composition, contain not only dyes and pigments but also painting binder and other additives which hinder the isolation and identification of colouring substances. In addition, the natural organic dyes extracted from paints, due to their origin, often exist in lake pigment form (complex of dye with metal). In textiles dyes are bonded with fibre through the use of mordants. Moreover, the sampling of paint from a painting is more controversial than the sampling of individual fibres from historical textiles. Identification of a particular raw material of dye is usually based on the presence of its main components, while minor components are important for differentiating between dyes originating from closely related sources. The natural organic dyes extracted from plants, insects or shellfish, due to their origin, often exist in glycosidic form. In order to properly identify colouring substances, it is necessary to isolate them from the matrix without changing the primary structure of the colouring substances. For this reason, the use of a mild and also effective extraction method plays a key role. It should be added that a number of substances with quite different physicochemical properties can be responsible for the colour of one natural dye. This needs to be considered when the methods used for the extraction and chromatographic separation of colouring substances are being developed. The analysis of dyestuffs present in art works is a very broad field. It seems justified that an optimal and universal methodology of dyes isolation and identification should be developed.

The aim of the PhD thesis therefore, was to develop a universal method of isolating and identifying the dyestuffs' different matrixes using high performance liquid chromatography coupled with UV-Vis spectroscopy and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS).

Over the course of the PhD research, basic tasks were performed:

- development of method for the isolation of colouring substances from paint, textiles and dye raw materials

- development of a universal method of identification of colouring substances using high performance liquid chromatography coupled with UV-Vis spectroscopy and mass spectrometry
- performing a spectrochromatographic analysis of dyestuffs present in extracts of dye raw materials
- preparation of lakes and oil paints according to historical recipes
- identification of dyestuffs and its degradation products present in the historical paints and textiles
- identification of mordants and types of historical threads using SEM-EDS and FTIR techniques
- performing photodegradation process of the extracts of dye raw materials and paint samples and identification of photodegradation products.

The conducted research contributes to broadening the knowledge about the dyes used by given artists. It allows for characterising the dyer's painting workshop, as well as the determination of the artists' preferences for specific colours. It also provides valuable information on the prevalence and applicability of exact dyes in a particular historical period. This may contribute to a more reliable dating of the work and even confirmation of its authenticity. This information will be significant to the art history professionals, as well as the art auction market and the museums that store their collections. The knowledge about the dye raw materials' composition will supply valuable information to other scientific fields, including conservation chemistry, chemistry of natural compounds and biology.

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

ACN- acetonitryl

Ala- alanina

DAD- *Diode Array Detector*, detektor z matrycą diodową

DMSO- dimetylosulfotlenek

EIC- *Extracted Ion Chromatogram*, rekonstruowane chromatogramy jonowe

ESI- *Electrospray Ionization*, jonizacja poprzez elektrorozpylanie

FT-IR- *Fourier-transform infrared spectroscopy*, Spektroskopii w Podczerwieni z Transformacją Fouriera

G- kwas galusowy

Glu- glukoza

Gly- glicyna

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*, Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa

Ksy- ksyloza

m/z- *mass to charge ratio*, stosunek masy do ładunku

MeOH- metanol

MS- *Mass spectrometry*, Spektrometria Mas

MS/MS- *Tandem Mass Spectrometry*, Tandemowa Spektrometria Mas

nzyd.-niezidentyfikowany

Rha- ramnoza

RP- *Reversed Phase*, układ faz odwróconych

SCAN- *Scan Monitoring*, praca spektrometru mas w trybie przemiatacia całego widma

SEM- *Scanning Electron Microscopy*, Skaningowa Mikroskopia Elektronowa

SPE- *Solid Phase Extraction*, ekstrakcja do fazy stałej



TFA- kwas trifluorooctowy

TIC- *Total Ion Current Chromatogram*, chromatogram całkowitego prądu jonowego

XRF- *X-Ray Fluorescence*, Fluorescencyjna Spektroskopia Rentgenowska

WPROWADZENIE

Już od czasów prehistorycznych ludzie pozostawiali ślady w swoim otoczeniu w postaci namalowanych obrazów. Upiększały one ich świat i wyrażały myśli oraz uczucia. Często też znakowały terytorium i były sposobem wskazania na przykład źródła żywności lub wody. Z czasem nasi przodkowie odkryli, że pigmenty działają bardziej efektywnie po zmieszaniu ich z medium, takim jak woda lub tłuszcz zwierzęcy. Pierwszymi obrazami były malowidła naskalne. Starożytni ludy ozdabiali ściany jaskiń farbą wykonaną z błota lub węgla drzewnego zmieszaną z tłuszczem lub śliną. Prehistoryczni malarze używali pigmentów dostępnych w ich bezpośrednim otoczeniu. Pigmenty te zwane pigmentami ziemnymi (z *ang.* earth pigments) przyklejały się do ścian jaskiń częściowo dlatego, że zostały one uwięzione w porowatej ścianie a częściowo dlatego, że środki wiążące (ślina lub tłuszcz) wysychały i przywierały z czasem do ścian [1].

Dzieje barwników pozyskiwanych z naturalnych źródeł roślinnych lub zwierzęcych są znacznie młodsze i sięgają czasów starożytnego Egiptu i Grecji [2, 3]. Jedną z najwcześniej poznanych substancji barwiących jest indygo, kraplak i koszenila stosowane już od około 4000 lat [1, 4]. Ekstrakty roślinne i zwierzęce, oraz minerały były jedynym źródłem barwników i pigmentów do drugiej połowy XIX wieku. Swoje zastosowanie znalazły nie tylko w przemyśle barwierskim, ale i w malarstwie. Otrzymanie fuksyny, pierwszego syntetycznego barwnika stało się momentem przełomowym w historii surowców barwierskich [5]. Druga połowa XIX wieku to okres, w którym barwniki naturalne zaczęto stopniowo zastępować barwnikami syntetycznymi. Naturalne barwniki organiczne wciąż wzbudzają zainteresowanie wśród konserwatorów i kustoszy dzieł sztuki, gdyż to one właśnie są składnikami większości artefaktów [6].

Przy badaniu obrazów i ich renowacji istotną rolę odgrywa identyfikacja materiałów malarskich stosowanych przez danych artystów [4]. Na jej podstawie ocenić można cechy charakterystyczne poszczególnych dzieł sztuki. Wiedza na temat użytych barwników pomaga ustalić okres powstania dzieła, określić jego pochodzenie, a także opracować odpowiednią procedurę renowacji [7]. W tym miejscu zacytować można fragment opracowania Toniego Rotha i Richarda Jacobiego - dwóch znanych niemieckich konserwatorów zabytków: „*Skoro już malarz, wolny twórca, ponosi określoną odpowiedzialność za trwałość swojego dzieła, to cóż dopiero mówić o konserwatorze, któremu często powierza się ratunek najcenniejszych dóbr kultury. Dogłębna znajomość podstaw i zasad techniki malarskiej jest alfą i omegą jego zawodu. Można by nazwać kwestią sumienia ów obowiązek konserwatora dokładania największych starań w celu przyswajania sobie na bieżąco wszelkich informacji dotyczących badań i zdobyczy w zakresie technologii malarskiej*” [8]. Fragment ten niewątpliwie potwierdza, że znajomość materiałów malarskich oraz precyzyjne ustalenie składu chemicznego

substancji barwiących dostarcza informacji na temat technologii tworzenia danych obiektów artystycznych. Analizując warsztat malarski danego artysty uwzględnić należy jego preferencje w wyborze ściśle określonej palety barw. Przytoczyć tu można z kolei fragment opisujący twórczość Cézanne'a: „*W portrecie przyjaciela jeszcze po roku pozostawało niewielkie miejsce niezamalowane. Zapytany dlaczego tak jest, odpowiedział, że aby tamto miejsce uzupełnić, musiałby cały obraz namalować na nowo. Do tego stopnia każdy szczegół musi być zestrojony z siecią relacji całej struktury obrazu, do tego stopnia wrażliwe jest oko wielkich malarzy.*” Świadczy on o subtelności malarza w wyczuciu kompozycji, proporcji i ich wzajemnego powiązania [8]. Zachowanie pierwotnych zamierzeń twórcy powinno być uwzględnione w trakcie prac konserwatorskich danego dzieła. Jednym z elementów przydatnych przy określaniu warsztatu malarskiego jest identyfikacja zawartych w farbach barwników. Znajomość pełnego składu substancji barwiących dostarcza istotnych informacji dla szerokiego grona specjalistów zajmujących się tego typu dziełami sztuki. Co więcej, umożliwia przeprowadzenie renowacji dzieła w miarę możliwości zgodnie z decyzjami ideowymi i estetycznymi podejmowanymi przez jego twórcę.

Izolacja substancji barwiących z farb artystycznych jest zadaniem dość skomplikowanym. Farby w swoim składzie zawierają nie tylko barwniki, lecz także spoiwa malarskie i wypełniacze. Ich obecność utrudnia izolację i poprawną identyfikację barwników. Naturalne substancje barwiące, ze względu na swoje pochodzenie występują często w formie glikozydów [4]. Za kolor danego barwidła odpowiadać może nawet kilkanaście substancji. Mogą one mieć bardzo zbliżone lub znacznie różniące się właściwości fizykochemiczne, co powinno być uwzględnione podczas opracowywania metod ich izolacji i identyfikacji. Naturalne barwniki organiczne występują w farbach w postaci tak zwanych laków. Są to kompleksy substancji barwiących z metalami osadzone na nośnikach nieorganicznych. W związku z tym, aby je zidentyfikować należy najpierw wyizolować barwnik z laku i ze spoiwa malarskiego. Należy to przeprowadzić w ten sposób, aby nie spowodować zmian w ich pierwotnej strukturze chemicznej. Ze względu na skomplikowaną budowę naturalnych barwników oraz problematykę związaną z ich izolacją, analiza substancji barwiących jest ogromnym wyzwaniem dla badaczy i wymaga często zastosowania zaawansowanych narzędzi analitycznych.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Definicja barwy

Barwa jest wrażeniem zmysłowym wynikającym z wizualnego postrzegania promieniowania o danym składzie widmowym [9]. Proces wykazywania barwy przez daną substancję chemiczną wiąże się ściśle z wybiórczą absorpcją promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła widzialnego (400-780 nm). Jeżeli substancja absorbuje światło niebieskie o długości fali 480 ± 30 nm, które jest barwą zasadniczą, to światło przechodzące przez dany przedmiot będzie dawać dopełniającą barwę żółtą [10, 11]. Wykazywanie barwy przez daną substancję związane jest z absorpcją fotonów promieniowania. W wyniku absorpcji światła następuje zmiana energii konfiguracji elektronowej cząsteczki. Wzbudzenie polega na wzroście energii elektronu przenoszonego z poziomu podstawowego na poziom wzbudzony. Elektron zlokalizowany na orbitalu niewiążącym (elektron wolnej pary elektronowej) czy na orbitalu wiążącym (elektron wiązań π lub σ) znajduje się w stanie podstawowym, z którego zostaje przeniesiony na poziom wzbudzony czyli na orbital antywiążący typu π^* lub σ^* [12]. Wzbudzenie cząsteczek nasyconych, a więc tych zawierających tylko pojedyncze wiązania σ wymaga dużej energii fotonów. Nie jest przy tym wystarczająca energia promieniowania światła widzialnego, ani fioletowego. Wymagane jest zastosowanie promieniowania nadfioletowego o znacznie większej energii. Długość tej fali jest niedostrzegalna dla ludzkiego oka. Substancje, które absorbują promieniowanie nadfioletowe wykazują barwę białą, ponieważ odbijają lub przepuszczają fotony z zakresu promieniowania widzialnego. Barwa związku związana jest z obecnością elektronów sprzężonych wiązań π , które na skutek absorpcji wąskiej wiązki promieniowania widzialnego ulegają wzbudzeniu. Niezaabsorbowana część promieniowania zostaje wówczas odbita bądź przepuszczona przez substancję, tworząc wrażenie barwy [12].

2. Podział barwników

Według normy PN-EN ISO 4618:2007 substancją barwiącą jest „każda substancja nadająca barwę innym materiałom. Substancje barwiące obejmują pigmenty (nierozpuszczalne w stosowanym spoiwie) i barwniki (rozpuszczalne w stosowanym spoiwie)” [13]. Barwnikami określamy związki organiczne, a pigmentami związki nieorganiczne [14]. W literaturze spotkać można różne sposoby klasyfikacji naturalnych substancji barwiących. Do dwóch najważniejszych należy ich podział ze względu na zastosowanie (podział techniczny) oraz ze względu na strukturę chemiczną. Klasyfikacja techniczna obejmuje między innymi barwniki zaprawowe, kadziowe oraz bezpośrednie, które są stosowane zarówno w barwiarstwie tkanin jak i farbach artystycznych [15]. Barwniki zaprawowe stanowią największą grupę wśród

naturalnych barwników. Są to związki rozpuszczalne, które wiążą się z materiałem barwionym dzięki zastosowaniu zapraw barwierskich (soli metali), tworząc tak zwane laki barwne mające właściwości pigmentów. Należą do nich między innymi flawonoidy oraz antrachinony. Kolejna grupa to barwniki kadziowe. Są nimi nierozpuszczalne w wodzie związki, które w środowisku zasadowym ulegają redukcji do pochodnych rozpuszczalnych w wodzie (forma *leuco*). Te zaś są następnie utleniane na włóknie tlenem do pierwotnego nierozpuszczalnego barwnika. Należą do nich barwniki indygooidowe. Barwniki bezpośrednie to substancje rozpuszczalne w wodzie, stosowane głównie do barwienia wełny i jedwabiu. Nie wymagają one użycia zapraw barwierskich w celu związania ich z włóknem. Wiążą się one z podłożem siłami wiązań wodorowych i sił van der Waalsa [16].

Podział chemiczny barwników oparty jest na różnicach struktury chemicznej chromoforu. Zgodnie z Międzynarodowym Indekssem Barw (z *ang.* Colour Index International) substancje barwiące klasyfikuje się ze względu na pochodzenie oraz ich strukturę chemiczną. Każda substancja barwiąca w tej bazie danych posiada indywidualną nazwę generyczną (C.I.) oraz indywidualne oznaczenie jakim jest numer C.I. [6, 17].

Ze względu na strukturę chemiczną barwniki dzieli się na: nitrozowe, nitrowe, azowe, stilbenowe, karotenoidowe, difenylometanowe, triarylometanowe, ksantenowe, akrydynowe, chinolinowe, metinowe, tiazolowe, indaminowe, indofenolowe, azynowe, oksazynowe, tiazynowe, siarkowe, laktonowe, aminoketonowe, hydroksyketonowe, antrachinonowe, indygooidowe i ftalocyjaninowe [18].

Barwniki naturalne występujące w świecie roślinnym lub zwierzęcym, ze względu na charakter układu chromoforowego, dzieli się między innymi na barwniki indygooidowe, karotenoidowe, chinoidowe (antrachinonowe) oraz flawonoidy i ich glikozydy [19]. Ten też podział został zastosowany w niniejszej dysertacji.

2.1. Flawonoidy i ich glikozydy

Flawonoidy to związki chemiczne należące do grupy najbardziej rozpowszechnionych substancji wytwarzanych przez rośliny wyższe [20]. Do roku 2016 ustalone zostały struktury chemiczne niemal 10 000 flawonoidów występujących w różnych gatunkach roślin [21]. Możliwość modyfikacji w obrębie cząsteczki flawonu w wyniku takich procesów, jak na przykład utlenianie, hydroksylacja, metylacja, glikozylacja itp. powodują istnienie szerokiej gamy tego typu związków. Nazwa „flawonoid” wywodzi się od łacińskiego słowa *flavus* oznaczającego kolor żółty, ze względu na barwę jaką one zazwyczaj posiadają. Flawonoidy mogą jednak przyjmować również barwę od słomkowej, aż do pomarańczowo-czerwonej.

Głównym elementem strukturalnym flawonoidów jest układ dwóch pierścieni benzenowych A i B, między którymi wbudowany jest heterocykliczny pierścień C zawierający atom tlenu, tworząc w ten sposób układ pironu (flawonole, flawanony, flawony, izoflawony) lub piranu (flawanole, antocyjanidyny) [22]. Podział flawonoidów ze względu na ich różnice w budowie, wraz z ich wzorami strukturalnymi i nazwami, przedstawiony został na Rysunku 1.

W naturze flawonoidy występują głównie w formie glikozydów, co sprawia, że są one bardziej hydrofilowe i lepiej przepuszczalne przez błony komórkowe [21]. W zależności od atomu, z którym łączy się reszta cukrowa wyróżnia się C-glikozydy oraz O-glikozydy. Liczba przyłączonych jednostek cukrowych może być przy tym różna, w związku z czym wyróżnia się *di-*, *tri-* czy *tetra-*glikozydy. Jednostki cukrowe mogą się ze sobą łączyć szeregowo tworząc łańcuch prosty, bądź być podstawione pojedynczo w różnych pozycjach aglikonu. Aglikony mogą być związane z różnego typu jednostkami cukrowymi, np. heksozami (glukozą, galaktozą i kwasem glukuronowym), deoksyheksozą (ramnozą), czy też pentozami (ksylozą, arabiozą, apiozą) [23]. Glukoza jest przy tym najbardziej rozpowszechnionym cukrem wśród glikozydów flawonoidów [24]. Na Rysunku 1a zaznaczone zostały możliwe pozycje przyłączenia jednostek cukrowych do cząsteczki aglikonu [25].

Do roślin powszechnie uprawianych w Europie, z których pozyskuje się substancje barwiące z grupy flawonoidów należą: rezeda żółtawa (*Reseda luteola* L.), janowiec barwierski (*Genista tinctoria* L.), perukowiec podolski (*Cotinus coggygia* L.), sierpik barwierski (*Serratula tinctoria*), rumian żółty (*Anthemis tinctoria* L.) oraz owoce roślin z rodziny szakłakowatych (*Rhamnus*) [26].

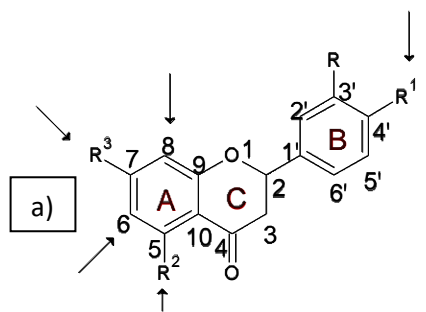
Rezeda żółtawa uważana jest za jeden z najstarszych i najczęściej stosowanych surowców barwierskich [27-31]. Barwnik ten znany był plemionom afrykańskim już w epoce neolitu, z kolei uprawiać rezedę zaczęto w epoce hellenistycznej na obszarze krajów śródziemnomorskich [32]. Obecnie rośnie ona dziko w Europie, ale jest też specjalnie uprawiana. Barwniki uzyskiwane z rezedy charakteryzują się intensywną i mocną żółtą barwą.

Kolejnym surowcem barwierskim znajdującą szerokie zastosowanie w przemyśle barwierskim była jagoda perska zwana też francuską (*Rhamnus* spp.), która jest owocem kruszyny pospolitej (szakłaka). Jagoda ta znana jest z bardzo dużej zawartości różnorodnych flawonoidów. Wymienić tu można kwercetynę, kemferol, ramnetynę, ramnazynę, ramnocytrynę oraz ich glikozydy [26]. W zależności od stopnia dojrzałości jagód oraz od rodzaju użytej zaprawy barwierskiej uzyskuje się żółtą, zieloną lub purpurowo-czerwoną barwę [33]. W malarstwie artystycznym barwnik pozyskiwany z jagód rodzaju *Rhamnus* przyjął zwyczajową nazwę *Still de Grain* [34].

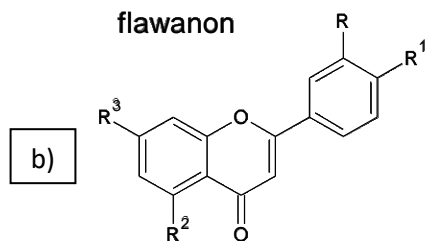
Z krzewu perukowca podolskiego (*Cotinus coggygia* L.) pozyskiwany jest żółty barwnik o angielskiej nazwie *young fustic*. Znany był on już w średniowieczu i stosowany do barwienia

tkanin. W zależności od użytej zaprawy barwierskiej, tkaniny przyjmowały barwę od żółto-pomarańczowej aż do czerwono-brązowej. Głównymi substancjami barwnymi obecnymi w tym barwniku są: fisteina, mirycetyna oraz sulfuretyna.

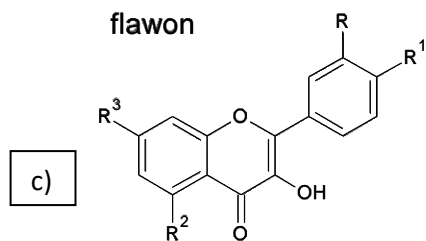
Antocyjanidyny, należące również do flawonoidów, znane są w przemyśle barwierskim od starożytności. Jednym z barwników należących do tej grupy związków jest smocza krew (z *ang.* Dragon's Blood). Ta naturalna żywica pozyskiwana jest z różnych gatunków drzew, w tym: *Dracaena* (Dracaenaceae), *Daemonorops* (Palmae), *Pterocarpus* (Fabaceae) oraz *Croton* (Euphorbiaceae). Substancjami barwiącymi odpowiadającymi za jego głęboki czerwony kolor są związki o łacińskich nazwach: *dracohordin*, *nordracorhodin*, *dracorubin* i *dracoflavylium* [4, 35].



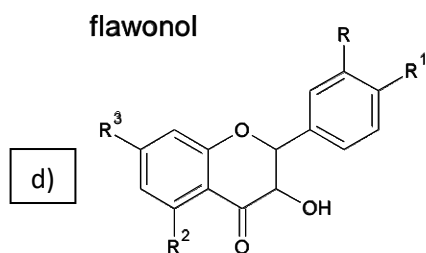
Nazwa związku	R	R ¹	R ²	R ³
naringenina	H	OH	OH	OH
hesperetyna	OH	OMe	OH	OH



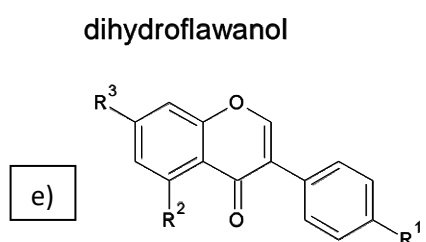
Nazwa związku	R	R ¹	R ²	R ³
luteolina	OH	OH	OH	OH
apigenina	H	OH	OH	OH
chryzoeriol	OCH ₃	H	H	OH



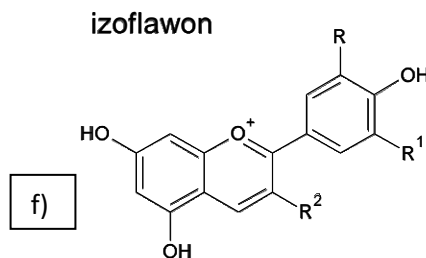
Nazwa związku	R	R ¹	R ²	R ³
fisteina	OH	OH	H	OH
kwercetyna	OH	OH	OH	OH
kemferol	H	OH	OH	OH
ramnetna	OH	OH	OH	OCH ₃



Nazwa związku	R	R ¹	R ²	R ³
2,3-dihydroksyfisteina	OH	OH	H	OH
epikatechina	OH	OH	OH	OH



Nazwa związku	R ¹	R ²	R ³
genisteina	OH	OH	OH
daidzeina	OH	H	OH



Nazwa związku	R	R ¹	R ²
malwidyna	OCH ₃	OCH ₃	OH
pelargonidyna	OH	H	H

Rysunek 1. Podział i struktury chemiczne wybranych flawonoidów: a) flawanony, b) flawony, c) flawonole, d) dihydroflawanole, e) izoflawony, f) antocyjanidyny.

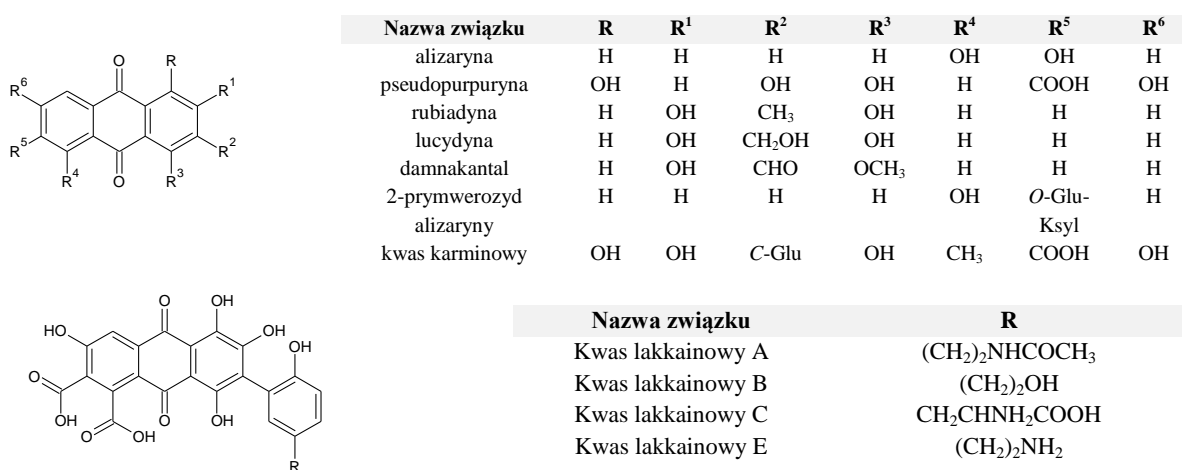
2.2. Barwniki chinoidowe i ich glikozydy

Barwniki chinoidowe, podobnie jak flawonoidy, są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślinnym. Należą one do grupy cyklicznych nienasyconych diketonów. Barwniki chinoidowe podzielić można na trzy zasadnicze grupy. Do pierwszej z nich należą benzochinony, a więc związki zawierające prosty układ chinoidowy. Druga grupa to związki zawierające rdzeń naftochinonu (układ skondensowanych pierścieni chinonu i pierścienia benzenowego). W zależności od budowy chinonu wyróżnia się α - i β -naftochinony. Trzecią grupą barwników chinoidowych stanowią antrachinony składające się z p -chinonu skondensowanego z dwoma pierścieniami benzenowymi [36]. Antrachinony, mimo iż nie wykazują wielkiej różnorodności pod względem budowy chemicznej, występują w środowisku naturalnym znacznie częściej niż pozostałe barwniki chinoidowe. Największą populację stanowią przy tym pochodne zawierające antrachinon podstawiony grupami hydroksylowymi, metylowymi, metoksyłowymi, karboksylowymi, czy też jednostkami cukrowymi [36]. Do najbardziej znanych barwników antrachinonowych należą: alizaryna, purpuryna oraz kwas karminowy. Alizaryna i purpuryna są głównymi substancjami barwiącymi pozyskiwanymi z korzeni marzanny barwierskiej z rodziny *Rubiaceae*. Barwnik ten nazywany jest też kraplakiem (z *ang.* madder lake). Naturalny kraplak znany jest już od ponad 4000 lat i jako barwnik stosowany jest do dziś, choć obecnie częściej w formie syntetycznej [37]. Był on jednym z najbardziej popularnych czerwonych barwników stosowanych w przemyśle barwierskim i malarstwie [38, 39]. Naturalny kraplak uzyskiwany jest z korzeni różnego typu gatunków roślin z rodziny *Rubiaceae*, w tym: marzanny barwierskiej (*Rubia tinctorum* L.), dzięki marzanny (*Rubia peregrina* L.), jak i marzanny indyjskiej (*Rubia cordifolia* L.), marzanki barwierskiej (*Asperula tinctoria* L.), przytulii właściwej (*Galium verum* L.) i kilku innych roślin z gatunku marzanowatych (*Relbunium*) [40]. Barwnik ten pochodzi z Indii, ale rozpowszechniony był również na Bliskim Wschodzie. Substancjami barwiącymi znajdującymi się w tego typu roślinach są głównie pochodne antrachinonu, w tym między innymi: alizaryna, purpuryna, pseudopurpuryna, ksantopurpuryna, rubiadyne, lucydyna, munistyna i ich glikozydy. W zależności od pochodzenia i wieku rośliny uzyskuje się różne odcienie kraplaków, co związane jest odmiennymi proporcjami wyżej wymienionych substancji barwiących [4, 41].

Do ciekawostek należy fakt, iż wojskowe peleryny oraz kurtki stanowiące umundurowanie żołnierzy armii francuskiej i angielskiej farbowane były kraplakiem niemal aż do I Wojny Światowej [42]. Syntetyczną alizarynę po raz pierwszy otrzymano w 1868 roku. Procedurę jej uzyskania opracowali Carl Graebe oraz Carl Liebermann, będący pracownikami niemieckiej firmy chemicznej BASF. Była to pierwsza synteza barwnika, który naturalnie występuje w przyrodzie [43]. Barwniki antrachinonowe izoluje się nie tylko z roślin, ale także z samic i larw owadów z rodziny *Coccidea*. W zależności od gatunku owada, wyróżnić można koszenilę

amerykańską (*Dactylopius coccus* Costa), polską (*Porphyrophora polonica* L.), armeńską (*Porphyrophora hamelli* Brandt), kermes (*Kermes vermilio* Planchon) oraz barwnik z ang. *lac dye* (*Kerria lacca* Kerr) [26]. Koszenilę zaczęto powszechnie stosować do barwienia tkanin już w XVIII wieku, jednakże zapotrzebowanie na nią gwałtownie spadło w drugiej połowie XIX w. [44]. Związane to było z pojawieniem się nowych syntetycznych czerwieni, w tym na przykład czerwieni alizarynowej. W XX w. zaprzestano praktycznie jej pozyskiwania z surowców naturalnych, ale obecnie wznowiono ten proces dla potrzeb przemysłu kosmetycznego i spożywczego. Główną substancją barwiącą obecną w ekstrakcie koszenili jest kwas karminowy. Zawierać on może również niewielkie domieszki kwasu flawokermesowego i kermesowego oraz izomerów kwasu karminowego. W zależności od gatunku owada zawartość tych substancji barwiących może się różnić. Przykładowo, koszenila armeńska zawiera ponad 95% kwasu karminowego, podczas gdy w koszenili polskiej ilość tego kwasu nie przekracza 70%. [26]. Jedną z pierwszych wzmianek o czerwcu polskim zamieścił Maciej Miechowita *Chronicapolonorum* z 1521 r., gdzie podkreślał znaczenie tego owada jako ważnego surowca barwierskiego eksportowanego niemal do całej Europy. Z barwnikiem tym wiąże się również geneza polskiej flagi. Pierwsze polskie chorągwie państwowe barwione były właśnie wyciągiem z czerwca polskiego [45].

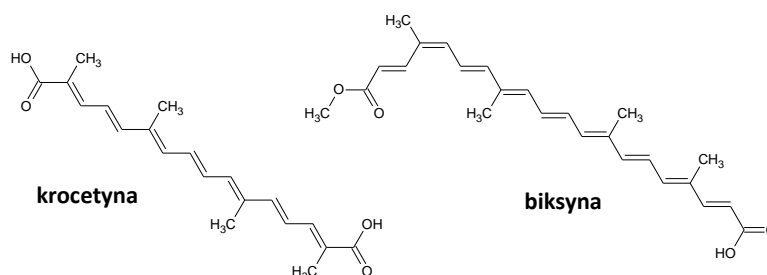
Struktury chemiczne wybranych barwników antrachinonowych przedstawione zostały na Rysunku 2.



Rysunek 2. Struktury chemiczne wybranych barwników antrachinonowych.

2.4. Karotenoidy

Karotenoidy są związkami polienowymi zbudowanymi z jednostek izoprenoidowych należącymi do tetraterpenów. Zbudowane są one zazwyczaj z 40 atomów węgla tworzących długi łańcuch sprzężonych wiązań podwójnych ($C_{40}H_{56}$). Związki te w zależności od ilości wiązań podwójnych w strukturze (przynajmniej siedem) przyjmują barwę od żółtej do czerwonej. Do karotenoidów zaliczane są również związki mające mniej niż 40 atomów węgla, ale posiadające co najmniej cztery podstawniki metylowe w łańcuchu. W literaturze nazywane są one apo-karotenoidami. Ze względu na różnice w obrębie struktury chemicznej, karotenoidy dzieli się na karoteny (zbudowane tylko z atomów węgla i wodoru) oraz ksantofile (związki posiadające w swojej strukturze dodatkowo co najmniej jeden atom tlenu w postaci grupy hydroksylowej, karbonylowej lub epoksydowej) [46, 47]. Dotychczas zidentyfikowanych zostało niemal 750 karotenoidów [48]. W świecie roślinnym do najpowszechniej występujących karotenów zalicza się α -, β - i γ -karoten oraz likopen, z kolei do ksantofili zeaksantynę i luteinę [47]. Najczęściej stosowanym źródłem karotenoidów w przemyśle barwierskim jest krokosz barwierski (*Carthamus tinctorius* L.) i krokosz uprawny (*Crocus sativus* L.) zawierające krocetynę i krocynę, a także annato (*Bixa orellana* L.) bogate w biksynę [26]. Struktury chemiczne wybranych karotenoidów przedstawione zostały na Rysunku 3.



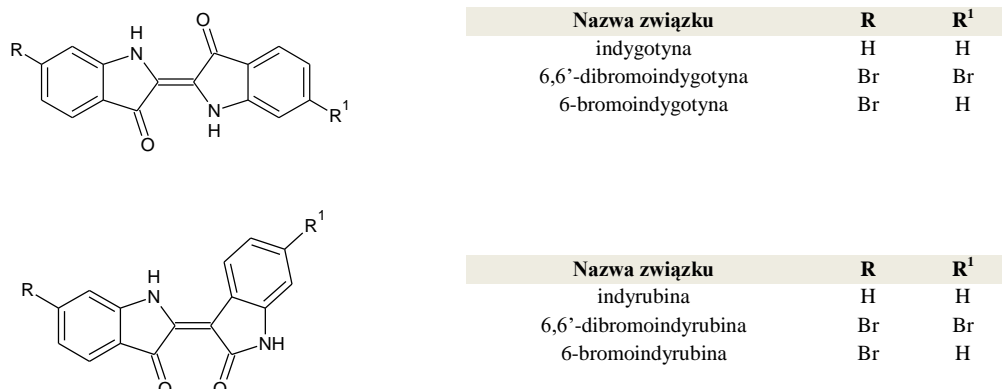
Rysunek 3. Struktury chemiczne krocetyny i biksyny.

2.5. Indygoidy

Barwniki indygoidowe to związki organiczne zbudowane z dwóch jednostek indoksyłu. Należą one do grupy barwników kadziowych, ze względu na sposób ich wytwarzania. W pierwszym etapie, pod wpływem czynnika redukującego w środowisku zasadowym, grupy karbonylowe ulegają redukcji dając formę *leuco*. Stają się one wówczas bezbarwne i rozpuszczalne w wodzie. Barwniki te w formie *leuco* stosowane są w procesie barwienia tkanin, a w kolejnym etapie poddawane procesowi utlenienia na powietrzu [49]. Barwnik indygo w przeszłości produkowało się z urzetu barwierskiego (*Isatis tinctoria* L.) oraz indygowca barwierskiego (*Indigofera tinctoria* L.).

Indygo należy do najstarszych znanych barwników niebieskich. Jego pochodzenia, ze względu na różnorodność form występowania roślin, nie da się jednoznacznie określić. Przypuszczalnie wywodzi się on z obecnych rejonów Egiptu i z Indii [26]. Nazwa „indygo” pochodzi od łacińskiego terminu *indicum*, czyli „pochodzący z Indii”. W rzeczywistości barwnik ten można było otrzymać również z roślin występujących naturalnie w Chinach, Japonii, Indonezji oraz Ameryce Środkowej. Rośliny te bogate są w substancję o nazwie indykan, która po obróbce chemicznej przekształca się w indygotynę. Urzet barwiarski oprócz indykanu zawierać może znaczną ilość izatyny, a ta z kolei po przetworzeniu daje czerwony barwnik indyrubinę [26]. Produkcja naturalnego indygo polegała na chemicznej obróbce ekstraktu z liści indygowca. Bezbarwny wodny roztwór indykanu (glikozydu) poddany fermentacji ulega hydrolizie do glukozy i nietrwałego indoksyłu, ten zaś w kontakcie z powietrzem utlenia się dając końcową formę tego barwnika [50]. Opracowanie w 1878 roku metody otrzymywania syntetycznego odpowiednika spowodowało gwałtowny spadek zainteresowania naturalną formą indygo [51]. Do grupy barwników indygooidowych należą również purpurowe barwniki pozyskiwane z mięczaków należących do rodziny rozkolców żyjących w basenie morza Śródziemnego. Do ich otrzymania również konieczne jest chemiczne przetworzenie surowca. Enzymatyczna hydroliza prekursorów obecnych w ciele mięczaków prowadzi do uzyskania pochodnej indoksyłu, ulega fotochemicznej konwersji do purpurowego produktu. Proces otrzymywania tego barwnika jest wieloetapowy i dość skomplikowany, a co więcej wydajność uzyskania produktu końcowego jest bardzo niska [26]. W literaturze znaleźć można informację, iż z jednego mięczaka otrzymać można zaledwie 1 mg tego barwnika. Miało to w przeszłości odzwierciedlenie w jego ogromnej cenie. Wyróżnia się trzy grupy gatunków mięczaków z rodziny rozkolców, z których uzyskuje się purpurowe barwniki. Do pierwszej grupy należą *Bolinus brandaris* L. (*Murex brandaris*), do drugiej *Thais haemastoma* L. (*Stramonita haemastoma*), a do trzeciej *Hexaplex trunculus* L. (*Murex trunculus*) [52]. Z rozkolców należących do grupy pierwszej i drugiej, dzięki zawartości 6,6'-dibromoindygotyny, otrzymuje się purpurę w odcieniu czerwonym. Z kolei z rozkolców grupy trzeciej uzyskuje się niebieskie odcienie purpury, z powodu obecności bromoindygotyny i indygotyny [26]. Przykładem barwnika uzyskiwanego z mięczaków jest purpura tyryjska. Centrum jej wytwarzania był przede wszystkim Tyr i Sydon, ale z biegiem czasu farbiarnie zaczęły powstawać w całym obszarze morza Śródziemnego. Miejsca produkcji purpury rozpoznać można do dziś po zwałowiskach muszli, tworzących niemal prawdziwe góry [53]. Strukturę chemiczną purpury tyryjskiej po raz pierwszy ustalił Paul Friedlander w 1909 roku. W tym celu użył aż 12 000 rozkolców, z których po złożonym procesie obróbki uzyskał jedynie 1.4 g czystego barwnika. Za to odkrycie Friedlander otrzymał od Austriackiej Akademii Nauk prestiżową Nagrodę Liebena [54]. Purpura tyryjska jest bardzo trwałym barwnikiem i może utrzymać się na włóknie

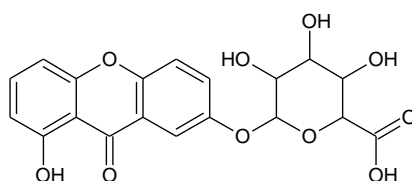
nawet 2000 lat. Świadczą o tym wyniki badań próbek wełnianej tkaniny odkrytej w Iraku [55].
Struktury chemiczne barwników indygowych przedstawione zostały na Rysunku 4.



Rysunek 4. Struktury chemiczne barwników indygowych.

2.6. Inne barwniki z grupy polifenoli

Wśród ważnych barwników stosowanych zarówno w przemyśle barwierskim, jak i do produkcji farb artystycznych wymienić należy żółcień indyjską (z *ang.* Indian Yellow). Głównymi jej składnikami są kwas euksantynowy oraz euksanton, należące do ksantonów. Struktury chemiczne ksantonów przypominają struktury flawonoidów, stąd ich podobne właściwości fizykochemiczne. Flawonoidy są bardzo rozpowszechnione w przyrodzie, podczas gdy ksantony występują w ograniczonej liczbie gatunków roślin [56]. Znanych jest zaledwie około 200 pochodnych należących do tej grupy związków, z czego aż 40 występuje w owocach mangostanu [57]. Struktura kwasu euksantynowego przedstawiona została na Rysunku 5.



Rysunek 5. Struktura chemiczna kwasu euksantynowego.

Żółcień indyjska jest naturalnym barwnikiem otrzymywanym z moczu krów karmionych liśćmi mango [58]. Produkcja tego barwnika polegała na odparowaniu moczu do suchej masy, którą następnie oczyszczano i rafinowano. Największą popularnością wśród malarzy cieszyła się ona w okresie między XVI a XIX wiekiem [58]. Ze względu na łatwą rozpuszczalność żółcień

indyjskiej w ciepłej wodzie, stosowano ją także do farbowania tkanin. Nie trwało to jednak długo ze względu na przykry zapach wydobywający się z fabryk włókienniczych.

Wspomnieć tutaj należy, że krowy żywione wyłącznie liśćmi mango zdychały po pewnym czasie w cierpieniach. Ze względów humanitarnych zakazano produkcji tego barwnika w 1908 roku. Jednakże dopiero w 1921 roku przestał on być dostępny handlowo.

W 1966 roku udało się Gettensowi i Soutowi ustalić wzór empiryczny żółci indyjskiej, jako pięciowodnej soli magnezowej kwasu euksantynowego [58]. Barwnik ten wykazuje intensywną i czystą barwę, a jego tekstura określana jest przez znawców jako lśniąca i pyłowata. Żółcień indyjską łączono z bielą ołowianą w celu uzyskania jaśniejszych odcieni; z indygo, by uzyskać zieleń; z cynobrem lub hematytem oraz domieszkami bieli ołowianej, by uzyskać pożądaną barwę od ciemnego brązu do różowawej żółci; jak i z minią ołowianą, by otrzymać kolor pomarańczowo-żółty [58].

Barwniki pozyskiwane z drzew dzieli się powszechnie na dwie grupy: rozpuszczalne w wodzie (głównie neoflawonoidy) oraz w niej nierozpuszczalne (skondensowane biflawonoidy). Pozyskiwane są one głównie z drewna, kory oraz korzeni drzew z rodziny brzytkowatych (*Caesalpinia* L.). Najważniejszymi odmianami tego gatunku drzew są: drzewo brazylijskie (*Caesalpinia echinata*, z ang. brazilwood) oraz brzytka sappan (*Caesalpinia sappan*, z ang. sappanwood). W celu uzyskania czerwonego barwnika brazilwood należy najpierw wyizolować brazylinę, którą poddaje się następnie procesowi utlenienia do brazyleiny. Ze względu na niską trwałość tego barwnika i jego tendencję do szybkiego blaknięcia, w porównaniu do kraplaku czy koszenili powodowało, iż często stosowano go w mieszaninie z innymi, trwalszymi substancjami barwiącymi [4, 26].

Ważnym źródłem brązowych i czarnych barwników są tak zwane galasówki, czyli patologiczne narośla roślin tworzące się w wyniku rozrostu tkanki roślinnej na liściach, łodydze lub korzeniach. Szczególnym utworem są galasy wytwarzane u roślin zaatakowanych przez owady. Substancjami barwiącymi obecnymi w galasówkach są pochodne zhydrolizowanych tanin, np. kwas galusowy czy elagowy, a także polimery katechiny i epikatechiny. Barwniki te znano już w czasie Imperium Rzymskiego i stosowano głównie w przemyśle garbarskim [26].

Kurkumę czyli ekstrakt kłaczy i korzeni ostryżu pozyskuje się z wielu gatunków roślin z rodziny *Curcuma*. Do Europy trafiła ona jako cenna przyprawa, a jej głównym eksporterem były Indie, Chiny, Bangladesz oraz Ameryka Południowa. Jako barwnik kurkuma nadaje tkaninom ciepłą żółto-pomarańczową barwę. Barwnik ten choć odporny na pranie, jest niestety wrażliwy na słońce pod wpływem, którego dość szybko blaknie [59]. Głównym składnikiem kurkumy jest kurkumina, zbudowana z dwóch reszt feruloilowych połączonych atomem węgla. Struktura chemiczna kurkuminy określona została przez Stanisława Kostaneckiego i Wiktora Lampe w 1910 roku [60]. Kurkuma jako barwnik bezpośredni stosowana była do barwienia

bawełny, wełny oraz jedwabiu. W starożytnych Indiach i innych krajach Azjatyckich używano ją również podczas różnych rytualnych ceremonii [26].

3. Fotodegradacja barwników

Wiele dzieł sztuki narażonych jest na niekorzystne działanie promieni słonecznych. Warunki te sprzyjają procesom fotodegradacji organicznych substancji barwiących, które należą do jednych z najbardziej nietrwałych materiałów malarskich. Określenie dróg rozkładu substancji barwiących jest niezbędne w prawidłowym zrozumieniu procesu ich starzenia się powodującego zmianę wyjściowej barwy. Proces starzenia się barwników organicznych polega na rozkładzie chromoforów substancji barwiących, co objawia się utratą bądź zmianą pierwotnej barwy.

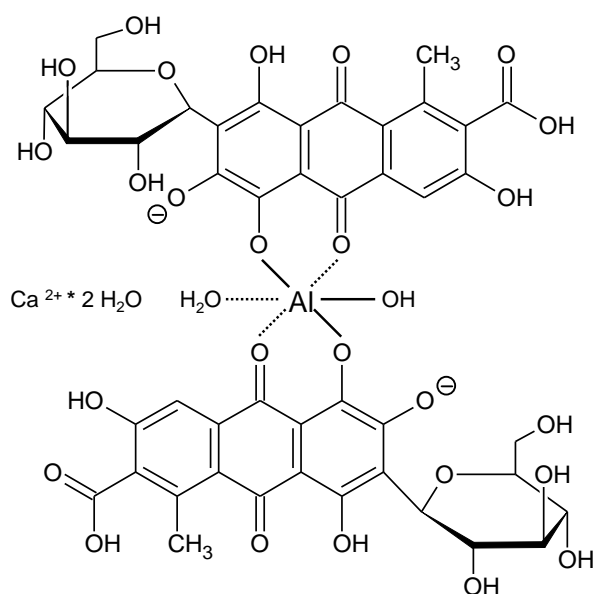
Proces fotodegradacji polega na przemianie chemicznej związków pod wpływem fotonów lub światła. Fotochemiczny rozpad substancji organicznych dzieli się na procesy fotolizy pośredniej i bezpośredniej. Fotoliza bezpośrednia polega na wzbudzeniu cząsteczki przez absorpcję fotonu, w wyniku czego zachodzi reakcja chemiczna, najczęściej utlenianie. Bezpośrednimi efektami ekspozycji na promieniowanie UV może być tworzenie się nowych związków chemicznych, zrywanie wiązań chemicznych i w rezultacie całkowita degradacja substancji organicznej. Fotoliza pośrednia z kolei przebiega pod wpływem reakcji z rodnikami hydroksylowymi OH^{\bullet} lub ozonem czy NO_3 [61]. Liczba oraz reaktywność rodników OH^{\bullet} zależy od intensywności promieniowania UV oraz ich koncentracji w ozonie i wodzie. W środowisku wodnym zarówno fotoliza pośrednia jak i bezpośrednia przebiegają jednocześnie. Wspomnieć przy tym należy, że obecność mikroorganizmów i substancji humusowych przyspiesza procesy fotochemiczne, ze względu na ich zdolność do pochłaniania promieniowania słonecznego [61, 62].

Wśród metod postarzania barwników naturalnych wyróżnia się takie, które pozwalają odwzorowywać degradację zachodzącą w środowisku naturalnym. Do technik tych zaliczyć można degradację pod wpływem promieniowania UV. Przyspieszone starzenie w komorze emitującej promieniowanie, którego zakres pokrywa się z zakresem promieniowania słonecznego jest powszechną metodą stosowaną do badania stanu zachowania materiałów przy ich długotrwałej ekspozycji na światło słoneczne [63, 64]. Postarzane mogą być zarówno roztwory substancji barwiących, jak i barwione nici czy też farby malarskie [65-67]. Identyfikacja produktów fotodegradacji substancji barwiących pozwala zrozumieć reakcje chemiczne zachodzące w wyniku działania promieniowania słonecznego. Wiedza na temat tych zmian zebrana w stosunkowo krótkim czasie, które w rzeczywistości zachodzą na przestrzeni lat lub wieków, pozwoli określić optymalne warunki przechowywania i ekspozycji obiektów należących do kolekcji dziedzictwa narodowego. Znajomość procesów fotodegradacji substancji barwiących i określenie budowy strukturalnej tworzących się z nich produktów rozkładu znacznie ułatwi ich identyfikację w próbkach o nieznanym pochodzeniu.

Identyfikacja produktów degradacji naturalnych substancji barwiących jest zadaniem trudnym i skomplikowanym. Spowodowane jest to brakiem informacji na temat struktury chemicznej analizowanych związków. Najczęstszym sposobem prowadzenia badań jest przyspieszone postarzanie, a następnie identyfikacja nowopowstałych związków za pomocą zaawansowanych technik analitycznych umożliwiających ustalenie ich struktury chemicznej. Do najszerzej stosowanych technik należy wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, przy czym tandemowy spektrometr mas pozwala na identyfikację nieznanymi substancji bez konieczności użycia wzorców [68, 69]. Mając informacje w postaci widm UV-Vis i widm mas powstających produktów fotodegradacji możliwe będzie określenie substratu, z którego one powstały. Znacznie ułatwi to identyfikację barwników pierwotnie użytych do tworzenia dzieła, których kolor wyblakł pod wpływem czasu.

4. Laki barwne i zaprawy barwierskie

Laki barwne są materiałem wykazującym właściwości pigmentów. Otrzymywane są one w wyniku działania soli metali na barwniki rozpuszczalne w wodzie [4, 6, 70]. Do tworzenia laków stosowane są barwniki należące do klasy barwników zaprawowych. Proces tworzenia laków polega na strącaniu rozpuszczalnego w wodzie barwnika zaprawami, w wyniku czego tworzy się kompleks typu barwnik-metal. Kompleks ten jest następnie wytrącany na tlenku glinu, bądź węglanie wapnia [71]. Zaprawami najczęściej stosowanymi do wytwarzania laków są ałun potasowo-glinowy ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$), uwodniony siarczan żelaza ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) oraz chlorek cyny ($SnCl_2$). W zależności od metalu tworzącego kompleks otrzymuje się laki o różnych barwach. Struktura chemiczna laków jest dość złożona. Jako przykład przedstawić można chemiczną strukturę laku wapniowo-glinowego z kwasem karminowym (Rys. 6) uzyskany poprzez strącanie tego barwnika ałunem potasowo-glinowym w obecności węglanu wapnia [4, 33, 72].



Rysunek 6. Struktura chemiczna laku wapniowo-glinowego z kwasem karminowym.

5. Metody izolacji i identyfikacji substancji barwiących z różnego typu matryc

Pierwsze udokumentowane badania analizy składu pigmentów w obiektach historycznych opisane zostały już w 1807 roku i dotyczyły średniowiecznych malunków ściennych na budynkach stojących w dzielnicy Westminster w Londynie [73, 74]. Historia analizy składu organicznych substancji barwiących jest znacznie młodsza. Za pioniera tego typu badań uważa się Jana Woutersa, który jako pierwszy wykorzystał chromatografię cieczową do identyfikacji substancji barwiących obecnych w historycznych tekstyliach [75]. Szybki rozwój technik analitycznych oraz wzrastająca dostępność specjalistycznej aparatury analitycznej przyczyniły się do dużego zainteresowania naukowców tego typu badaniami, wspomagającymi w rezultacie prace środowisk zajmujących się historycznymi obiektami. W identyfikacji barwników organicznych chromatografia cieczowa sprzężona z technikami spektroskopowymi i spektrometrycznymi wciąż wiodzie prym. W ostatnich dwóch latach ukazało się kilkadziesiąt prac dotyczących izolacji i identyfikacji substancji barwiących obecnych zarówno w surowcach barwierskich [76], tkaninach [77-84], farbach artystycznych i lakach [85, 86], jak i tapetach ściennych [87], czy też oprawach książek [88]. W przypadku badań historycznych farb artystycznych piśmiennictwo nie jest jednak zbyt bogate. Spowodowane jest to zapewne ograniczoną dostępnością próbek farb oraz problematyką badawczą wynikającą z ich złożonego składu. Farby malarskie, a w szczególności olejne, zawierają bowiem w swym składzie nie tylko barwniki organiczne, ale i różnego typu spoiwa malarskie, czy wypełniacze. Kwestia

dostępności próbek związana jest z inwazyjnym charakterem badań, do przeprowadzenia których niezbędne jest pobranie próbek farb z danego obiektu, np. z obrazu, w celu identyfikacji poszczególnych substancji barwiących. Z tego też względu zaczęto poszukiwać nowych metod analizy nie wymagających pobierania próbek z badanych obiektów. Jedną z technik nieinwazyjnych jest spektroskopia fourierowska w podczerwieni (FT-IR). Metoda ta pozwala wprowadzić na identyfikację rodzaju barwnika i jego grup funkcyjnych, jednakże nie umożliwia określenia jego dokładnej struktury chemicznej [89]. Jak dotąd nie ma takich technik analitycznych, które pozwoliłyby na pełną i dokładną identyfikację barwników organicznych, nie ingerując przy tym w strukturę samego obiektu. Co więcej, przed etapem identyfikacji substancji barwiących konieczny jest proces ich izolacji ze spoiwa malarskiego, a dopiero potem proces rozdzielenia na poszczególne składniki i końcowej ich identyfikacji.

Przegląd literaturowy dotyczący metod izolacji substancji barwiących z różnego typu matryc oraz technik chromatograficznych i spektralnych stosowanych w analizie barwników został szczegółowo opisany w artykule przeglądowym pod tytułem „**IZOLACJA I IDENTYFIKACJA NATURALNYCH SUBSTANCJI BARWIĄCYCH OBECNYCH W PRÓBKACH FARB ARTYSTYCZNYCH I TKANINACH POCHODZENIA HISTORYCZNEGO**”, mojego współautorstwa, Wiadomości Chemiczne, 70, 2016, 163-187 (ZAŁĄCZNIK I)

ZAŁĄCZNIK I

II. CEL I ZAKRES PRACY

Identyfikacja substancji barwiących obecnych w farbach historycznych dostarcza cennych informacji dla szerokiego grona specjalistów zajmujących się dziełami sztuki. Znajomość dokładnego składu substancji barwiących pozwala na rozpoznanie rodzaju surowca barwierskiego, z którego otrzymano dany barwnik. Wiedza ta pomaga nie tylko oszacować okres powstania dzieła czy też jego pochodzenie, ale także opracować odpowiednią i efektywną procedurę konserwatorską.

Celem niniejszej Pracy Doktorskiej jest identyfikacja organicznych substancji barwiących pochodzenia naturalnego oraz produktów ich degradacji obecnych w historycznych farbach artystycznych, jak i tekstyliach stanowiących polskie dziedzictwo kulturowe. Do realizacji tego celu zastosowana została wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem diodowym i spektrometrem mas (HPLC-DAD-MS).

Realizując Pracę Dokorską pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Śliwka-Kaszyńskiej postanowiłam:

- opracować uniwersalną metodę izolacji substancji barwiących z różnego typu matrycy (tkanin, farb artystycznych oraz surowców barwierskich);
- zoptymalizować warunki prowadzenia procesu ekstrakcji, w tym określić wpływ rodzaju i ilości stosowanego ekstrahenta, czasu pracy łaźni ultradźwiękowej oraz temperatury na wydajność procesu ekstrakcji barwników;
- zoptymalizować chromatograficzne warunki procesu rozdzielania i detekcji substancji barwiących, umożliwiające prawidłową ich identyfikację;
- sporządzić laki barwne i modelowe farby artystyczne na bazie starych receptur oraz poddać je procesowi fotodegradacji;
- podjąć próbę identyfikacji produktów degradacji barwników oraz określić przypuszczalne drogi ich rozkładu;
- utworzyć szczegółową bazę danych naturalnych substancji barwiących oraz produktów ich fotodegradacji zawierającą bibliotekę spektrochromatogramów, widm mas oraz widm UV-Vis zidentyfikowanych związków.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki

W trakcie realizacji części doświadczalnej stosowano następujące odczynniki:

- kwas fluorowodorowy, Sigma Aldrich, USA
- kwas solny, POCH, Polska
- metanol do HPLC, LiChrosolv, Merck, Niemcy
- acetonitryl do HPLC, LiChrosolv, Merck, Niemcy
- woda dejonizowana, system do uzyskania wody dejonizowanej HLP5, HYDROLAB, Polska
- dimetylosulfotlenek, Merck KGaA, Niemcy
- chlorek metylenu (cz.d.a), P.P.H. Stanlab Sp.J., Polska
- kwas mrówkowy, Sigma Aldrich, Szwajcaria
- kwas trifluorooctowy, Sigma Aldrich, USA
- azot techniczny do odparowania nadmiaru rozpuszczalnika
- węgiel wapnia (cz.d.a.), Chempur, Polska
- alun potasowo glinowy, (cz.d.a.), Chempur, Polska
- olej lniany, Roman Szmaj ART, Polska
- alizaryna, apigenina, chinizaryna, diosmetyna, fisteina, genisteina, kemferol, kwercetyna, kwas galusowy, kwas karminowy, moryna, ramnetyny, emodyna, purpuryna, 7-O-glukuronid luteoliny, 3-O-rutynozyd kemferolu, 3-O-rutynozyd-4-O-glukozyd kemferolu, 3-O-ramnozyd kwercetyny, Sigma Aldrich, USA
- surowce barwierskie: indygo indyjskie *Indigoferia tinctoria* L., indygo europejskie *Isatis tinctoria* L. (urzet barwierski), *lac dye*, koszenila, drewno kampszowe, drewno brazylijskie, rezeda żółtawa, janowiec barwierski, lazur krapowy, kraplak o odcieniu żółtawym, krokosz barwierski, kraplak Perego, dojrzała francuska jagoda, galasówki, kurkuma indyjska, Kremer Pigmente, Niemcy

- marzanna barwierska (*Rubia tinctoria* L.) i marzanka barwierska (*Asperula tinctoria* L.), ogród botaniczny Arboretum, Bolestraszyce, Polska

2. Materiał badawczy

W ramach współpracy z Muzeum Łazienki Królewskie w Warszawie, Muzeum Narodowym w Krakowie oraz Zakładem Konserwacji i Restauracji UMK w Toruniu przekazane nam zostały:

- próbki farb pobrane z tubek należących do Jana Matejki:
 - Czerwień, oznaczona jako: *Laque de Garance*,
 - Żółcienie, oznaczone jako: *Jaune de Indien*, *Laque de Robert 5*, *Laque de Robert 6*, *Still de Grain*
- próbki farb pobrane z palet należących do Jana Matejki, Jacka Malczewskiego i Leona Wyczółkowskiego
- próbki farb pobrane z obrazów:
 - Marcello Bacciarellego
Portret Stanisława Augusta Poniatowskiego w stroju koronacyjnym
 - Józefa Pankiewicza
Targ na kwiaty przed kościołem Św. Magdaleny w Paryżu, *Lato*, *Wóz z sianem*
 - Henryka Siemiradzkiego
Pochodnie Nerona, *Przyszłe ofiary Koloseum*, *U źródła*, *Odpoczynek*, *Chrystus i Samarytanka*, *Cyganka*, *Z wiatykiem*, *Pólakt kobiety*
 - Maksymiliana Gierymskiego
Studium konia kasztana
- próbki włókien:
 - jednaście próbek pobranych z XVI-wiecznego kobierca z motywami czintamani
 - dwie próbki pobrane ze średniowiecznego arrasu

3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Automatyczne pipety (20, 200, 1000 μ l), Eppendorf, Niemcy
- Chromatograf cieczowy (seria 1290) wyposażony w pompę binarną (G4220A), automatyczny podajnik próbek (G4226A), termostat (G1316C) połączony z detektorem z matrycą diodową (G1315C) oraz spektrometrem mas (seria G6460A) z analizatorem kwadrupolowym, Agilent Technologies, USA
- Chromatograf cieczowy Infinity (seria 1290) wyposażony w pompę (G1316C), termostat kolumny (G4220A), automatyczny podajnik próbek (G4226A) połączony ze spektrometrem mas z kwadrupolowym analizatorem czasu przelotu QTOF-MS (6540 UHD Accurate Mass QTOF), Agilent Technologies, USA
- Dejonizator wody HLPS, Hydrolab, USA
- Fotoreaktor wyposażony w lampę ksenonową, filtr wodny, kriostat, filtr optyczny, mieszałdo magnetyczne oraz reaktor kwarcowy (25 mL). Temperatura pracy aparatu 20°C, moc lampy ksenonowej 300 W, natężenie promieniowania 5000 V/m², LOT-Quantum Design, Niemcy
- Komora starzeniowa SUNTEST XLS+. Temperatura pracy aparatu 20°C, moc lampy ksenonowej 550 W, promieniowanie w zakresie 290-900 nm, Atlas, USA
- Kolumienki do SPE-C18 500 mg, 3 mL, UCT, UK
- Kolumny chromatograficzne: Poroshell EC-C18 (150 x 3mm, 2.7 μ m), ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 x 3mm, 1.8 μ m), Agilent Technologies, USA
- Komora do wykonywania ekstrakcji za pomocą techniki SPE, Grace, USA
- Łaźnia ultradźwiękowa, Bandelin Sonorex, Niemcy
- Skaningowy mikroskop elektronowy SEM typ 1430 VP (LEO Electron Microscopy Ltd., England), wyposażony w detektor elektronów wtórnych (SE), detektor elektronów wstecznie rozproszonych (BSE) i spektrometr dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDX) Quantax 200, XFlash 4010 firmy Bruker AXS Microanalysis GmbH, Niemcy
- Spektrometr IR z transformacją Fouriera (FTIR), Nicolet iS50, USA
- Urządzenie z płytą grzewczą, do odparowania próbek w strumieniu azotu, TurboVap LV, Caliper Life Sciences, USA
- Waga analityczna XP50H, Mettler Toledo, Szwajcaria
- Wirówka (seria CM 70M-09), ELMI, Łotwa



4. Laki barwne i farby artystyczne

Na podstawie starych receptur i przepisów odnalezionych w źródłach historycznych sporządzone zostały laki barwne [90]. Do ich wykonania użyte zostały ekstrakty z wybranych surowców barwierskich, w tym koszenili, rezedy żółtawej, drewna brazylijskiego, janowca barwierskiego. Uzyskane laki utarto z olejem lnianym w celu otrzymania farby olejnej. Wybrane farby poddane zostały procesom fotodegradacji w celu określenia przypuszczalnych dróg rozkładu zawartych w nich substancji barwiących, jak i określeniu produktów ich fotodegradacji. Wykorzystane zostały one również podczas badań nad optymalizacją procesu izolacji substancji barwiących z farb artystycznych.

Metoda przygotowania laków z rezedy żółtawej, janowca barwierskiego i jagody perskiej, marzanny barwierskiej

10 g zmielonego surowca barwierskiego namoczono w 600 mL wody demineralizowanej na 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę ogrzewano przez 30 minut w temperaturze wrzenia. Następnie roztwór odsączono na gorąco, a do przesączu dodano 10 g ałunu potasowo glinowego $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$. Całość ogrzewano w temperaturze 80°C przez 30 min. Do ciepłego roztworu (50°C) dodawano porcjami 30 g $CaCO_3$. Mieszaninę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny, a następnie odsączono wytrącony osad. Osad przemyto kilkakrotnie wodą i pozostawiono do wyschnięcia.

Metoda przygotowania laków z koszenili i lac dye

Do 1 g zmielonego surowca barwierskiego dodano 300 mL 0.1 M wodnego roztworu K_2CO_3 i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 20 minut. Zawiesinę odsączono na gorąco, a do ciepłego przesączu dodawano porcjami 60% wodnego roztworu ałunu potasowo glinowego do ustalenia się odczynu obojętnego (pH 6-7). Roztwór pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Wytrącony lak odsączono, przemyto wodą i pozostawiono do wyschnięcia.

Metoda przygotowania laku z twardzicy drzewa brazylijskiego

Do 10 g zmielonej twardzicy dodano 200 mL octu winnego i 5 g ałunu potasowo glinowego. Całość pozostawiono na 60 min w celu rozpułchniania, a następnie ogrzewano do wrzenia przez 30 min. Mieszaninę odsączono na gorąco, a do ciepłego przesączu dodano 20 g $CaCO_3$. Mieszaninę pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie odsączono wytrącony osad. Osad przemyto kilkakrotnie wodą i pozostawiono do wyschnięcia.

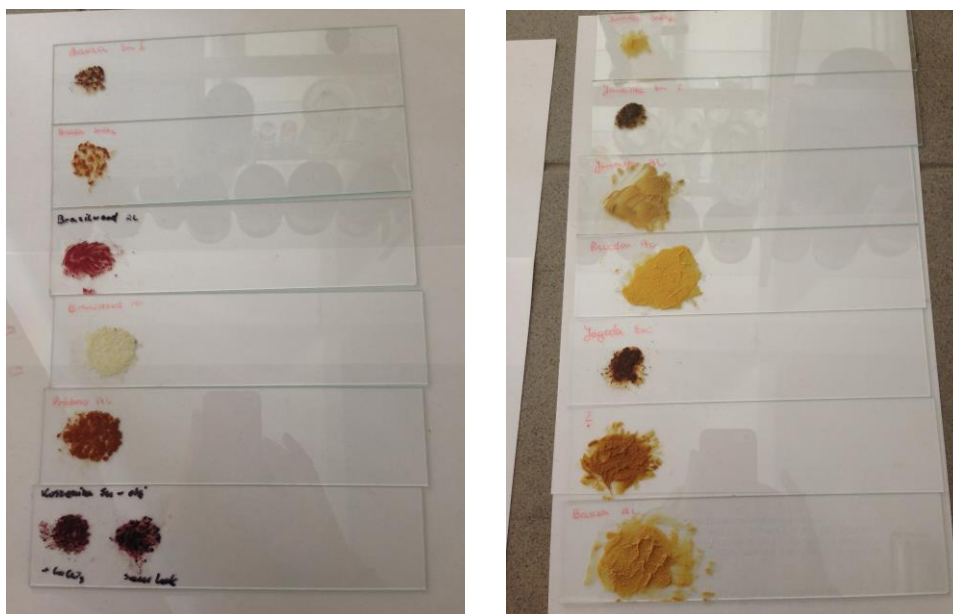
Zdjęcia wykonane w trakcie procesu wykonywania laków barwnych przedstawiono na Rysunku 7.



Rysunek 7. Zdjęcie laków barwnych w trakcie ich wytwarzania (po lewej stronie lak z drzewa brazylijskiego, po prawej stronie lak z koszenili).

Przygotowanie farb olejnych z otrzymanych laków

Farby olejne przygotowane zostały poprzez utarcie otrzymanych laków z olejem lnianym w proporcji 4:1. Gotowe farby rozprowadzono na szklanych płytkach i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Zdjęcia wykonanych farb przedstawiono na Rysunku 8.



Rysunek 8. Zdjęcia farb modelowych wykonanych według archiwalnych przepisów.

5. Optymalizacja metody izolacji substancji barwiących

Problematyka izolacji barwników z próbek farb jest bardzo rozległa. Zasadnym wydaje się więc konieczność opracowania optymalnej i uniwersalnej metodyki ich izolacji. Naturalne barwniki organiczne stosowane w malarstwie oraz przemyśle barwierskim tkanin należą w większości do barwników zaprawowych. W farbach i tkaninach istnieją one w postaci laków barwnych, mających właściwości pigmentów, co sprawia, że są one nierozpuszczalne w wodzie i większości rozpuszczalnikach organicznych. W celu identyfikacji substancji barwiących, konieczna jest ich izolacja z danej matrycy tak, aby nie spowodować zmian w obrębie ich struktury chemicznej. Zwyczajowe metody ekstrakcji substancji barwiących z farb i tkanin opierają się na zastosowaniu mieszaniny metanolu z wodnymi roztworami kwasów siarkowego lub solnego w temperaturze wrzenia rozpuszczalników. Warunki te sprzyjają wprawdzie hydrolizie kompleksu typu metal-barwnik, niestety powodują również hydrolizę glikozydowych fragmentów cząsteczki barwnika. Pozwala to na identyfikację jedynie samego aglikonu, w związku z tym identyfikacja rzeczywistego składu staje się niemożliwa. Celem przeprowadzonych badań było podjęcie próby zastosowania łagodniejszych odczynników umożliwiających izolację substancji barwnych w niezmienionej formie. Przebadany został wpływ stężenia wybranego ekstrahenta, czasu zastosowania fal ultradźwiękowych oraz temperatury na wydajność ekstrakcji i stan zachowania substancji barwiących.

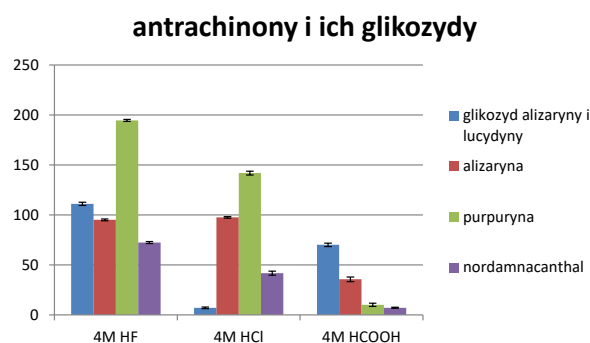
5.1. Wpływ rodzaju ekstrahenta

5.1.1. Farby modelowe

W celu opracowania optymalnej metodyki izolacji substancji barwiących z farb artystycznych zbadany został wpływ różnego typu ekstrahentów na sprawność tego procesu. Do badań wykorzystano farby modelowe sporządzone z surowców barwierskich zawierających substancje należące do różnych klas związków: flawonoidów (jagoda francuska), antrachinonów (marzanna barwierska), indygooidów (urzet barwierski). Każdą z farb modelowych poddano procesom ekstrakcji z zastosowaniem 500 μL mieszaniny rozpuszczalników (ACN/MeOH/DMSO, 1:1:1, v/v/v) z dodatkiem (50 μL) 4M wodnych roztworów kwasów: mrówkowego (HCOOH), solnego (HCl) i fluorowodorowego (HF). Proces ekstrakcji każdej z wymienionych rodzajów farb wykonano trzykrotnie i poddano analizie chromatograficznej w trzech powtórzeniach. Wpływ zastosowania każdego z kwasów na efektywność ekstrakcji poszczególnych substancji barwiących przedstawiony został w postaci diagramów słupkowych. Ilość wyekstrahowanych substancji barwiących wyznaczona została na podstawie pola powierzchni piku i przeliczona na 1 mg farby.

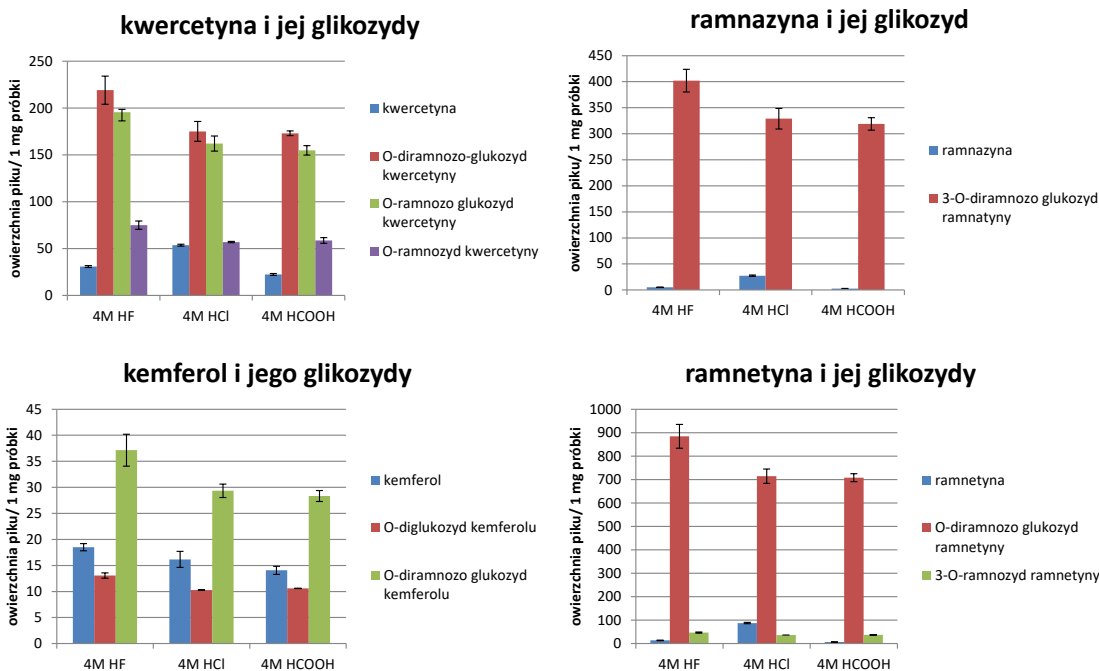


Diagramy słupkowe na Rysunku 9 przedstawiają ilości wyekstrahowanych substancji barwiących (alizaryny i jej prymwerozydu, hystazaryny, purpuryny oraz nordamnakanthalu (z *ang.* nordamnacanthal) z farby na bazie ekstraktu z marzanny barwierskiej. Najbardziej efektywnym ekstrahentem w izolacji glikozydów okazał się być kwas mrówkowy, jednakże ilości pozostałych antrachinonów były niezadawalające. Zastosowanie kwasów HCl i HF umożliwiło wyizolowanie wszystkich antrachinonów obecnych w tej farbie. Podczas ekstrakcji z zastosowaniem kwasu fluorowodorowego hystazarynę i purpurynę udało się wyizolować w największych ilościach. Kwas solny okazał się być efektywniejszym ekstrahentem w przypadku izolacji alizaryny oraz nordamnakanthalu. Umożliwił on izolację zarówno glikozydu alizaryny, jak i pozostałych aglikonów. Ilość wyizolowanego glikozydu alizaryny w porównaniu do samej alizaryny była jednak zdecydowanie mniejsza. Spowodowane jest to najprawdopodobniej częściową hydrolizą wiązań glikozydowych w trakcie ekstrakcji kwasem solnym. Użycie kwasu fluorowodorowego, w przeciwieństwie do HCl umożliwiło izolację glikozydu alizaryny w większej ilości.



Rysunek 9. Wpływ różnego typu kwasów na wydajność ekstrakcji antrachinonów i ich glikozydów z farby na bazie marzanny barwierskiej.

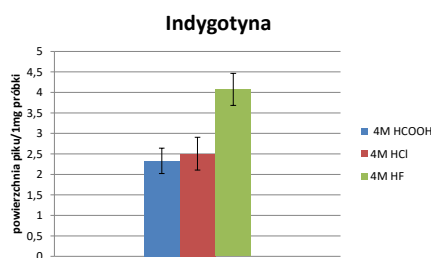
Diagramy słupkowe na Rysunku 9 obrazują ilości wyekstrahowanych substancji barwiących (kwercetyny, ramnetyny, ramnazyny, kemferolu oraz ich glikozydów) obecnych w farbie wykonanej z jagody perskiej. Analizując wykresy słupkowe zauważyć można, iż kwas fluorowodorowy okazał się najbardziej efektywnym ekstrahentem do izolacji wszystkich glikozydów obecnych w tej farbie. Największe ilości kwercetyny, ramnetyny oraz ramnazyny wyizolowane zostały z użyciem kwasu solnego. Ilości wyizolowanych glikozydów tych związków były niemniej jednak mniejsze niż w przypadku ekstrakcji kwasem fluorowodorowym. Ulegały one częściowej hydrolizie, tak jak w przypadku prymwerozydu alizaryny. Zastosowanie kwasu mrówkowego pozwoliło wyizolować wszystkie substancje barwiące obecne w próbce, jednak wydajność ekstrakcji była niższa niż dla HCl i HF.



Rysunek 10. Wpływ różnego typu kwasów na wydajność ekstrakcji flawonoidów i ich glikozydów z farby na bazie jagody perskiej.

Według doniesień literaturowych do izolacji barwników indygooidowych z różnego typu matrycy nie ma konieczności stosowania kwasów [91-93]. Barwniki indygooidowe należą bowiem do grupy barwników kadziowych i ich właściwości fizykochemiczne różnią się od barwników zaprawowych. W celu uzyskania barwy zielonej w przeszłości indygo mieszano często z różnego typu żółcieniami, w tym barwnikami zaprawowymi np. z rezedy żółtawej [33]. W związku z tym, aby mieć pewność, że wszystkie substancje barwiące zostaną wyizolowane z próbek o barwie zielonej, zastosować należy taki ekstrahent, który byłby efektywny w stosunku do obu klas barwników. Z tego też względu przebadany został wpływ wyżej wymienionych kwasów na efektywność ekstrakcji indygooidów.

Jak widać na Rysunku 11, indygotynę udało się wyizolować z próbek farb przy użyciu każdego z testowanych kwasów, jednakże w bardzo małych ilościach. Największą ilość indygotyny wyekstrahowano przy zastosowaniu kwasu fluorowodorowego.



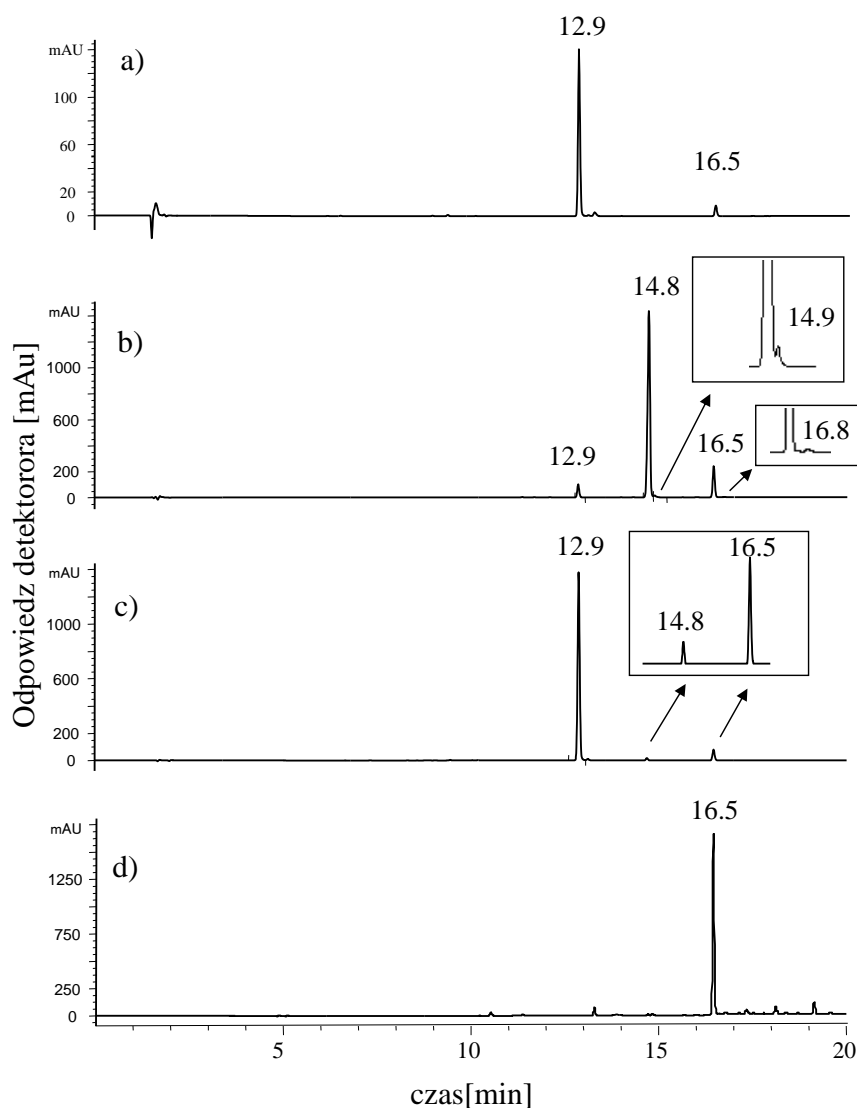
Rysunek 11. Wpływ różnego typu kwasów na sprawność ekstrakcji indygotyny z farby na bazie indygo.

5.1.2. Historyczna farba *Jaune de Indien*

Wpływ różnego typu ekstrahentów na sprawność ekstrakcji barwników przebadany został również z wykorzystaniem historycznej farby olejnej na bazie żółceni indyjskiej (*Jaune de Indien*) zawierającej substancje barwiące z grupy ksantonów [94].

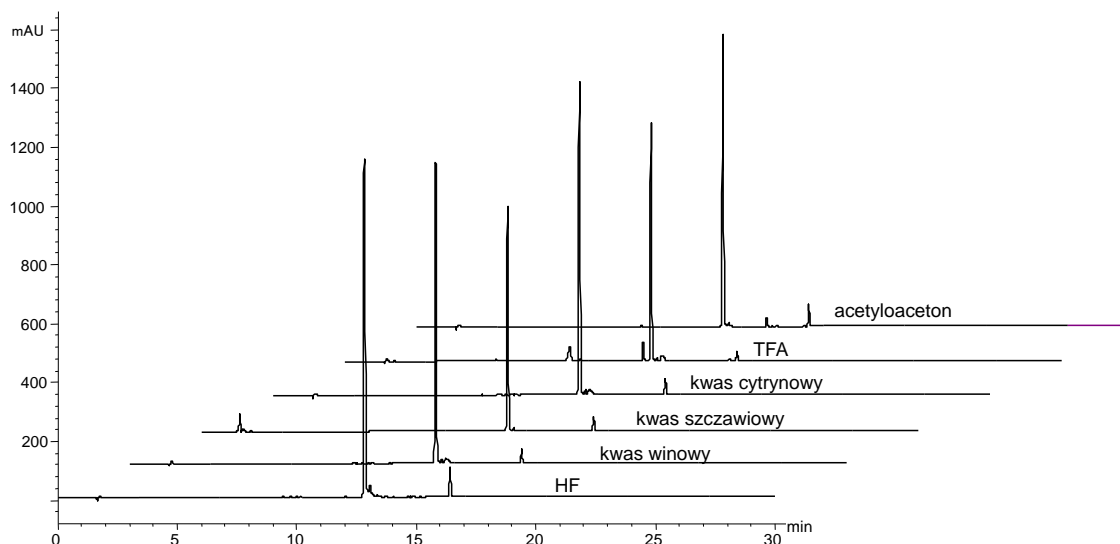
Próbki farby (0.2 mg) poddane zostały procesom ekstrakcji z zastosowaniem 500 μL mieszaniny rozpuszczalników ACN/MeOH/DMSO (1:1:1, v/v/v) z dodatkiem 50 μL dziewięciu różnego typu reagentów: kwasu solnego, fluorowodorowego, trifluoroctowego, mrówkowego, szczawiowego, winowego i cytrynowego, acetyloacetonu, a także samych rozpuszczalników organicznych (ACN/MeOH/DMSO). Wszystkie uzyskane ekstrakty poddane zostały analizie HPLC-DAD-MS. Celem eksperymentu było wybranie nie tylko najbardziej efektywnej metody ekstrakcji, ale również określenie wpływu tych reagentów na stan zachowania substancji barwiących obecnych w tej farbie.

Pierwsza metoda ekstrakcji polegała na zastosowaniu jedynie rozpuszczalników organicznych (ACN/MeOH/DMSO), bez dodatku kwasów. W jasnożółtym ekstrakcie zidentyfikowane zostały dwie substancje barwiące, kwas euksantynowy (12.9 min.) i euksanton (16.5 min.) będących głównymi składnikami żółceni indyjskiej (Rys. 12a). W drugiej metodzie, oprócz mieszaniny rozpuszczalników, dodany został kwas solny. Na chromatogramie otrzymanym w trakcie analizy tego ekstraktu widoczne są 4 piki chromatograficzne (Rys. 12b). Intensywność piku elującego w czasie retencji 14.8 min. jest kilkakrotnie wyższa od pozostałych. Nie jest on obecny na chromatogramie próbki przygotowanej metodą z zastosowaniem samych rozpuszczalników organicznych. Na podstawie widma mas związek ten zidentyfikowany został jako ester metylowy kwasu euksantynowego (opisany w dalszej części tego rozdziału). W trzeciej metodzie ekstrakcji użyto z kolei dodatku kwasu fluorowodorowego. Na chromatogramie obecne są dwa piki o czasach retencji 12.9 i 16.5 min. (Rys. 12c) oraz pik o bardzo małej intensywności elujący w czasie 14.8 min. Był on także obecny w ekstrakcie uzyskanym metodą z zastosowaniem kwasu solnego.



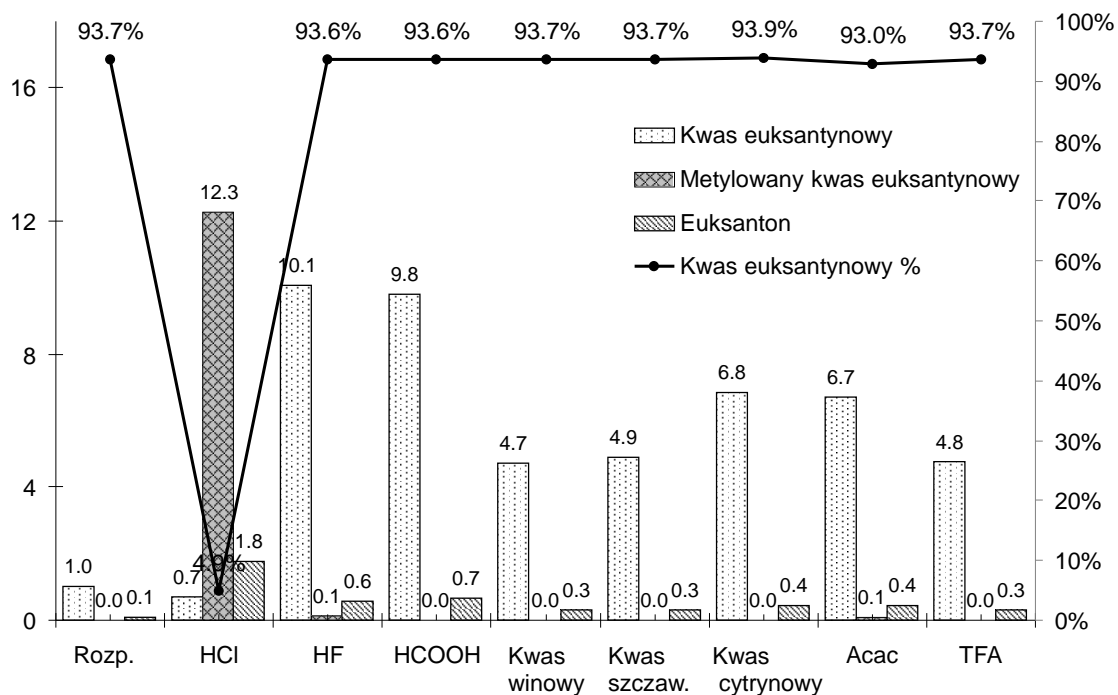
Rysunek 12. Spektrochromatogramy ekstraktów farby *Jaune de Indien* z użyciem: a) samych rozpuszczalników organicznych, b) kwasu solnego, c) kwasu fluorowodorowego, a także d) syntetycznego euksantonu [94].

W kolejnych sześciu metodach do ekstrakcji użyta została mieszanina ACN/MeOH/DMSO z dodatkiem acetyloacetonu, lub kwasów: mrówkowego, winowego, szczawiowego, cytrynowego i trifluorooctowego. Na wszystkich uzyskanych chromatogramach widoczne są dwa główne piki pochodzące od kwasu euksantynowego oraz euksantonu (Rys. 13). W zależności od zastosowanej metody związki te izolowane były w różnych ilościach.



Rysunek 13. Spektrochromatogramy ekstraktów farby *Jaune de Indien* przygotowanych z użyciem: acetyloacetonu, kwasu trifluorooctowego (TFA), cytrynowego, szczawiowego, winowego i fluorowodorowego (HF) [94].

W celu porównania sprawności wyżej wymienionych metod ekstrakcji, wyliczony został poziom odzysku euksantonu, kwasu euksantynowego oraz estru metylowego kwasu euksantynowego. Poziom odzysku wyliczony został na podstawie znormalizowanej powierzchni pików kwasu euksantynowego zarejestrowanego w analizie chromatograficznej próbki przygotowanej metodą z użyciem samych rozpuszczalników organicznych (ACN/MeOH/DMSO). Rysunek 14 przedstawia wpływ rodzaju użytego ekstrahenta na wydajność metody ekstrakcji. Sprawność ekstrakcji z zastosowaniem kwasu solnego była wprawdzie znacznie wyższa od tej z użyciem samych rozpuszczalników organicznych, jednakże kwas euksantynowy ulegał estryfikacji w bardzo dużej ilości, a także był hydrolizowany do samego euksantonu. Pozostałe metody ekstrakcji z dodatkiem acetyloacetonu lub kwasów: fluorowodorowego, mrówkowego, trifluorooctowego, cytrynowego, winowego oraz szczawiowego nie powodowały hydrolizy wiązań glikozydowych ani żadnych innych zmian w obrębie cząsteczki kwasu euksantynowego. Procentowe zawartości kwasu euksantynowego we wszystkich otrzymanych ekstraktach (oprócz ekstraktu otrzymanego metodą z HCl) były bardzo zbliżone. Można więc postawić hipotezę, że w próbce historycznej farby zawartość kwasu euksantynowego stanowi około $93,6 \pm 0,3$ % zawartych substancji barwiących. Przeprowadzone badania potwierdziły, że metoda z użyciem silnego mineralnego kwasu solnego pozwala wprawdzie na izolację substancji barwiących z próbki farby, ale powoduje przy tym hydrolizę wiązań glikozydowych oraz metylację ksantonów. Metody ekstrakcji z użyciem łagodniejszych odczynników okazały się bardziej efektywne niż metoda z kwasem solnym i umożliwiają izolację substancji barwiących w niezmienionej formie.



Rysunek 14. Wykres przedstawiający znormalizowaną sprawność ekstrakcji w zależności od rodzaju ekstrahenta. Linia ciągła obrazuje względną zawartości kwasu euksantynowego w każdym z uzyskanych ekstraktów [94].

W przypadku zastosowania kwasów fluorowodorowego i mrówkowego poziomy odzysku kwasu euksantynowego okazały się około dziesięciokrotnie wyższe niż w przypadku ekstrakcji z samymi rozpuszczalnikami organicznymi (Rys. 14). Pozostałe metody ekstrakcji były również efektywne, nie mniej jednak poziomy odzysku kwasu euksantynowego były znacznie niższe.

Badania HPLC-DAD-MS pozwoliły zidentyfikować związki tworzące się w trakcie ekstrakcji z zastosowaniem kwasu solnego. Na spektrochromatogramie (Rys. 12b) oprócz kwasu euksantynowego i euksantonu widoczne są dodatkowe piki o czasach retencji 14.8, 14.9 i 16.8 min.

Pik o czasie retencji 14.8 min. zidentyfikowany został jako ester metylowy kwasu euksantynowego. Związek ten występuje również w śladowej ilości w próbce ekstraktu uzyskanego z użyciem kwasu fluorowodorowego. W zarejestrowanym widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 417 oraz jon fragmentacyjny m/z 227. Jon m/z 227 pochodzi od euksantonu, z kolei jon m/z 417 różni się o 15 Da od anionu kwasu euksantynowego, co sugeruje, że podczas procesu ekstrakcji z użyciem kwasu solnego dochodzi do metylacji kwasu glukuronowego. Hipoteza ta podparta jest faktem, że w widmie mas brak jest sygnału pochodzącego od dimeru kwasu euksantynowego m/z 807, widocznego w widmie mas tegoż kwasu. Intensywność piku o czasie retencji 14.8 min. jest kilkakrotnie większa od

pików pochodzących od kwasu euksantynowego oraz euksantonu (Rys. 12b), co również potwierdza hipotezę o reakcji estryfikacji.

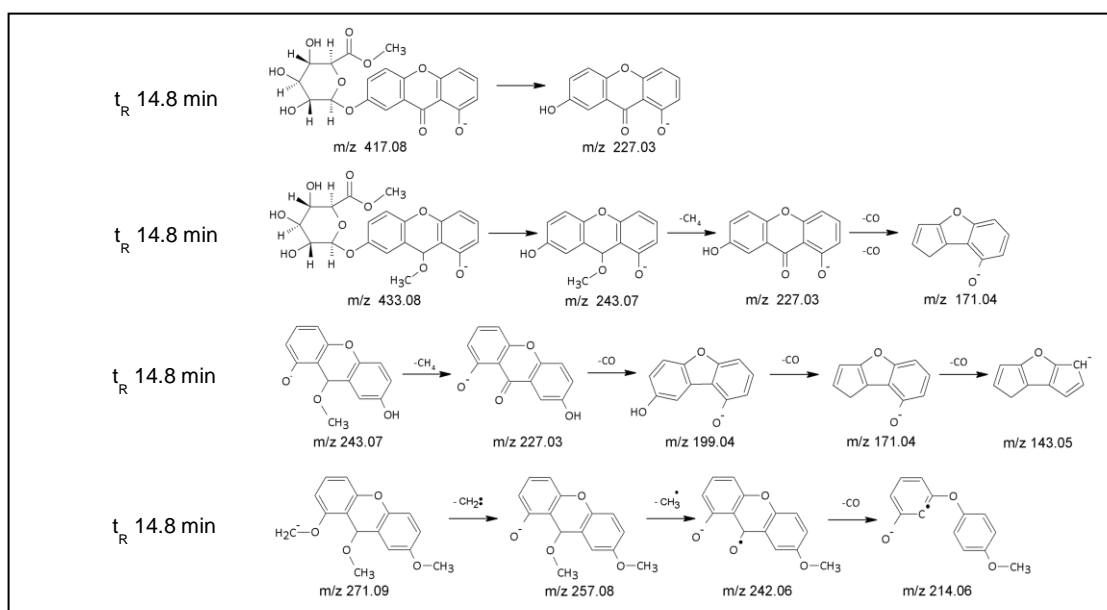
Kolejny związek widoczny na spektrochromatogramie (Rys. 12b) w postaci pików o bardzo małej intensywności eluował w czasie 14.9 min. W widmie mas tego związku widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 433 oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z : 243, 227, 171. Sygnał m/z 243, świadczy o utracie fragmentu odpowiadającego cząsteczce glukurany metylu. Jon m/z 227 przypisany jest anionowi euksantonu po utracie neutralnej cząsteczki metanu (16 Da). Natomiast sygnał o wartości m/z 171 powstaje w wyniku podwójnej dekarbonylacji euksantonu (utrata 56 Da). Ścieżka fragmentacji odpowiada cząsteczce euksantynianu metylu dodatkowo *O*-metylowanej w obrębie aglikonu. Pik o bardzo małej intensywności elujący w czasie 16.8 min. również został poddany szczegółowej analizie. Występował on tylko na spektrochromatogramie uzyskanym po ekstrakcji HCl. Algorytm dekonwolucji chromatogramu w oprogramowaniu MassHunter wykazał obecność dwóch koeluujących substancji. W widmie mas jednego ze związków widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 243 oraz jony fragmentacyjne m/z 227, 171 i 143. Z kolei w widmie mas drugiego związku obecny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 271 oraz jony fragmentacyjne m/z 257, 242, 214 i 170. Pierwszy związek zidentyfikowany został jako mono-*O*-metylowany euksanton, na podstawie jonów fragmentacyjnych: m/z 227 [M-H-CH₄]⁻, 199 [M-H-CH₄-CO]⁻, 171 [M-H-CH₄-2CO]⁻ i 143 [M-H-CH₄-3CO]⁻. Drugiemu związkowi przypisano strukturę tri-*O*-metylowanego euksantonu o jonie pseudocząsteczkowym o wartości m/z 271. Jon fragmentacyjny m/z 257 świadczy o utracie karbenu :CH₂ (-14 Da), natomiast sygnały o wartości m/z 242 i 214 przypisane zostały odpowiednio anionorodnikowi powstałemu w wyniku utraty rodnika metylowego i następnie dekarbonylacji.

Struktury chemiczne zidentyfikowanych związków potwierdzone zostały na podstawie analizy LC-QTOF-MS. Uzyskane dane spektrochromatograficzne (czasy retencji, maksima absorpcji (λ_{\max}), wzory sumaryczne, wartości m/z jonów pseudocząsteczkowych wraz z błędem pomiaru ich masy, wartości m/z jonów fragmentacyjnych) oraz nazwy zidentyfikowanych związków przedstawione zostały w Tabeli 1.

Tabela 1. Dane spektrochromatograficzne związków tworzących się podczas ekstrakcji farby *Jaune de Indien* kwasem solnym [94].

Związek	t_R (min)	Wzór sumaryczny	[M-H] ⁻	Błąd (ppm)	Jony fragmentacyjne (m/z)	λ_{\max} (nm)
ester metylowy kwasu euksantynowego	14.8	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.0844	-4.0	263, 227	286, 376
metylowany kwas euksantynowy	14.9	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1154	-3.2	243, 227, 171	332, 388
metylowany euksanton	16.8	C ₁₄ H ₁₁ O ₄	243.0668	-2.1	227, 199, 171, 143	-
trimetylowany euksanton	16.8	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	271.0973	1.1	271, 257, 214	-

Na podstawie wnikliwej analizy otrzymanych wyników zaproponowane zostały ścieżki fragmentacji zidentyfikowanych związków (Rys. 15).



Rysunek 15. Zaproponowane struktury chemiczne i ścieżki fragmentacji związków tworzących się w trakcie ekstrakcji farby *Jaune de Indien* kwasem solnym [94].

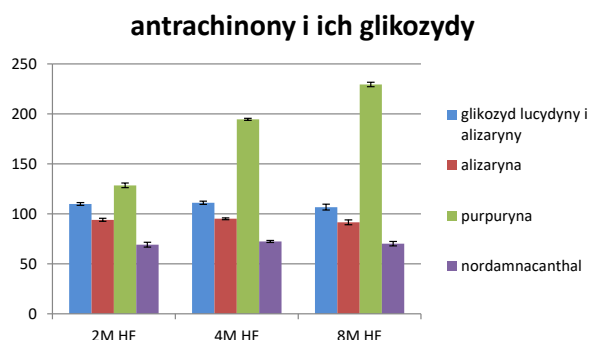
Na podstawie wszystkich przeprowadzonych eksperymentów potwierdzić można, iż metoda ekstrakcji z użyciem kwasu solnego powoduje zmiany strukturalne izolowanych substancji barwiących, uniemożliwiając prawidłową identyfikację surowca barwierskiego. Zastosowanie HF podczas ekstrakcji jest najbardziej efektywną metodą izolacji substancji barwiących należących do różnych klas związków. Kwas fluorowodorowy nie powoduje również zmian w obrębie struktury chemicznej barwników i z tego też względu, metoda ta została poddana dalszym etapom optymalizacji.

5.2. Wpływ stężenia ekstrahenta

Kolejnym etapem optymalizacji metody izolacji substancji barwiących z różnego typu matrycy było dobranie odpowiedniego stężenia kwasu fluorowodorowego. W tym też celu przebadany został wpływ trzech wartości stężeń molowych (2, 4 i 8M) na efektywność procesu izolacji flawonoidów, antrachinonów obecnych w próbkach przygotowanych farb modelowych.

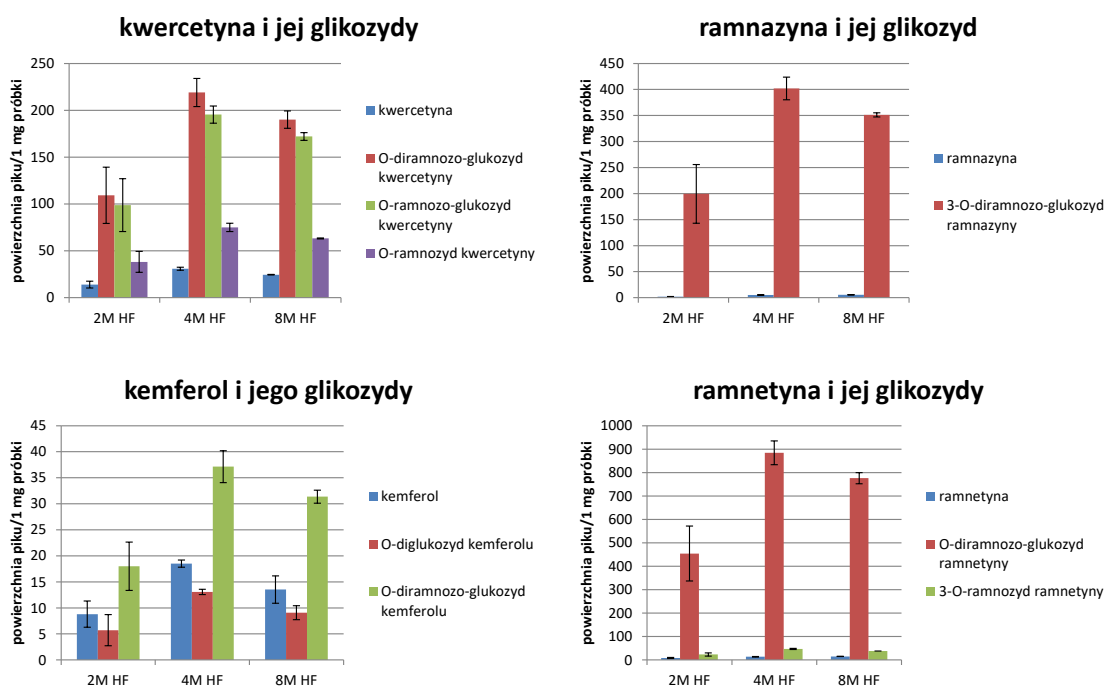
Wśród badanych związków należących do grupy antrachinonów znajdowały się: prymwerozyd alizaryny i lucydyny, alizaryna, purpuryna, hystazaryna oraz nordamnakantal. Użycie 4M roztworu kwasu fluorowodorowego okazało się być najbardziej optymalne w trakcie izolacji

większości antrachinonów. Jedynie w przypadku ekstrakcji purpuryny zastosowanie 8M roztworu kwasu HF zwiększało sprawność izolacji.



Rysunek 16. Wpływ stężenia kwasu fluorowodorowego na ilość wyizolowanych barwników z grupy antrachinonów.

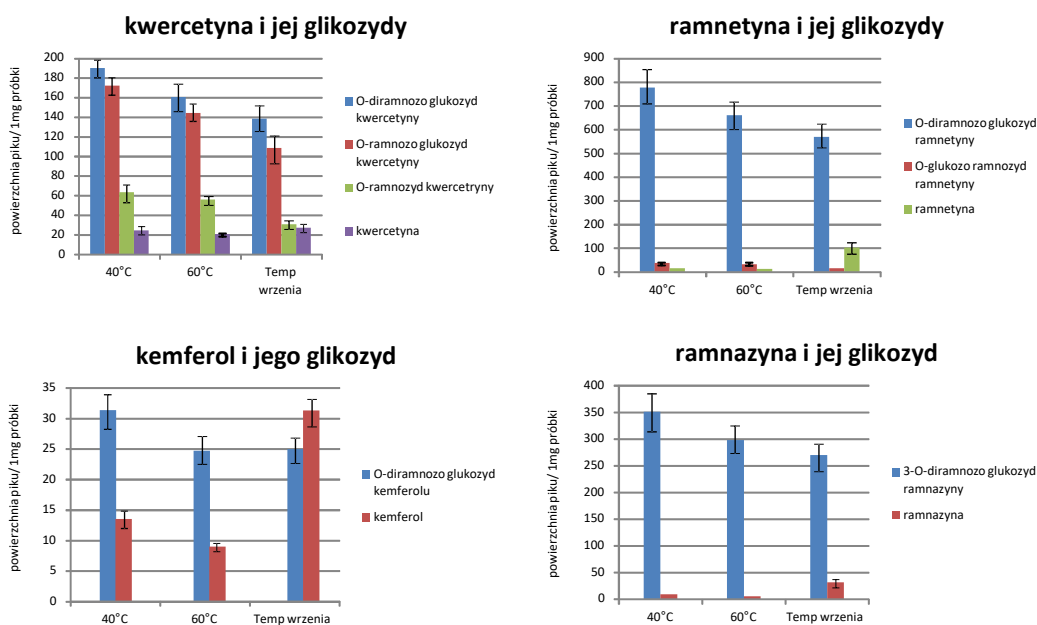
Podobne rezultaty uzyskano w trakcie izolacji barwników należących do grupy flawonoidów. Użycie 4M roztworu kwasu fluorowodorowego okazało się być najbardziej odpowiednim. Zastosowanie roztworu kwasu o niższym stężeniu (2M) było niewystarczające do izolacji wszystkich substancji barwiących z farby na bazie jagody francuskiej, natomiast zastosowanie kwasu o wyższym stężeniu (8M) powodowało zmniejszenie efektywności ekstrakcji glikozydów flawonoidów.



Rysunek 17. Wpływ stężenia kwasu fluorowodorowego na ilości wyizolowanych flawonoidów.

5.3. Wpływ temperatury

Barwniki świata roślinnego, podobnie jak i zwierzęcego, należą pod względem swej budowy chemicznej do połączeń bardzo zróżnicowanych. Zazwyczaj nie występują one w formie wolnej, ale w połączeniu z jednostkami cukrowymi. Wiązania glikozydowe ulegać mogą hydrolizie pod wpływem silnych kwasów, enzymów, czy też pod wpływem wysokiej temperatury. Jako, że celem niniejszej pracy doktorskiej jest opracowanie uniwersalnej metody izolacji substancji barwiących, nie powodując przy tym zmian w ich strukturze chemicznej, postanowiono zbadać wpływ temperatury na ewentualny rozkład wiązań glikozydowych. Do eksperymentu użyto ekstrakt z jagody perskiej bogatej w *O*-glikozydy kwercetyny, ramnetyny, ramnazyny oraz kemferolu. Ekstrakt ten ogrzewano w temperaturach 40°C, 60°C oraz 80°C przez 15 minut. Proces przeprowadzono trzykrotnie, a uzyskane ekstrakty poddane zostały analizie chromatograficznej w trzech powtórzeniach. Ilości wyizolowanych substancji barwiących wyrażone za pomocą diagramów słupkowych przedstawione zostały na Rysunku 18.



Rysunek 18. Wpływ temperatury prowadzenia procesu ekstrakcji na ilość wyizolowanych flawonoidów i ich glikozydów.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że prowadząc ekstrakcję w 60°C i 80°C (temperatura wrzenia rozpuszczalników) glikozydy kwercetyny, ramnetyny, ramnazyny oraz kemferolu ulegają sukcesywnej hydrolizie do swoich aglikonów, przy czym *O*-diramnozo-glikozyd kemferolu w stopniu największym. Proces ekstrakcji przeprowadzony w temperaturze 40°C umożliwił izolację glikozydów w największej ilości.

Powyższe wyniki wskazują na zasadność prowadzenia procesu izolacji substancji barwiących w warunkach łagodnych (40°C), które umożliwiają ekstrakcję barwników w niezmienionej formie zapewniając jednocześnie wystarczającą efektywność tego procesu.

5.4. Oczyszczanie ekstraktów techniką ekstrakcji do fazy stałej

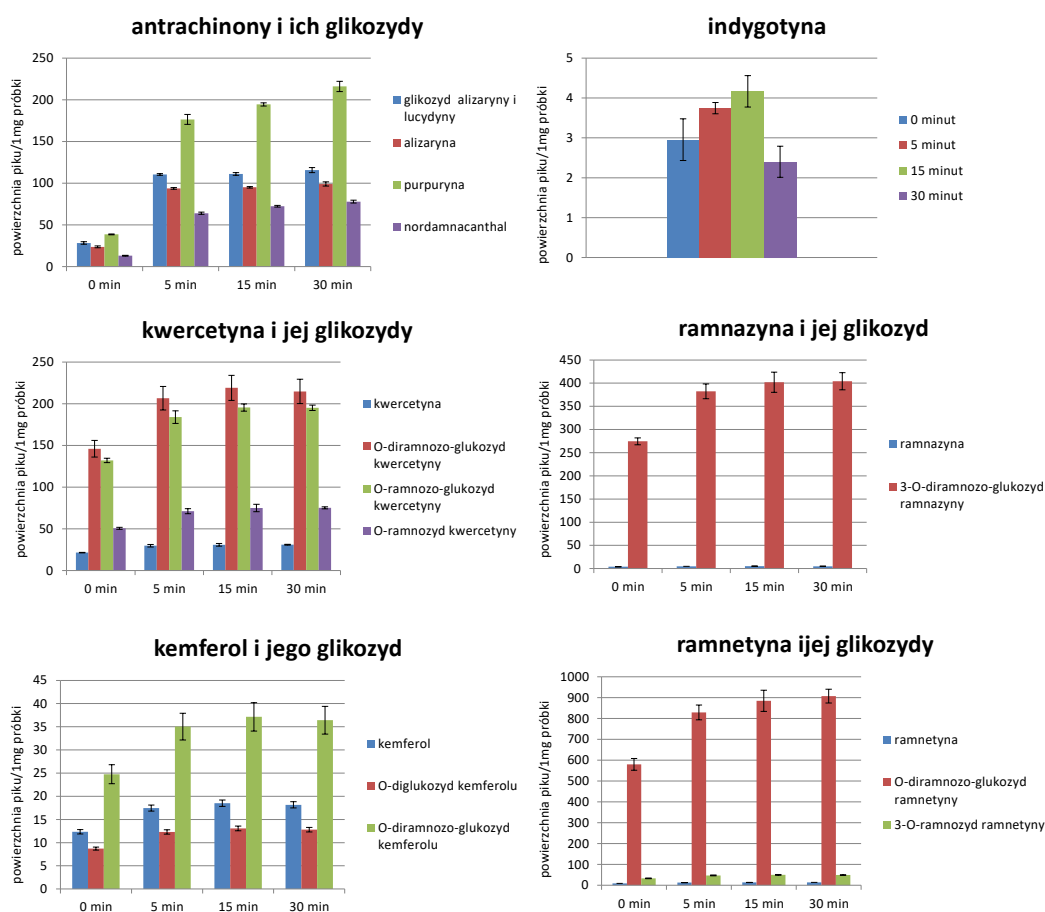
Ekstrakty substancji barwiących ze względu na obecność pozostałości nieprzereagowanego kwasu fluorowodorowego oraz powstających w trakcie ekstrakcji jonów fluorkowych poddane zostały procesowi oczyszczania. W tym celu zastosowano technikę ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Do oczyszczania użyto kolumnienek ze złożem oktadecylowym (C18), które kondycjonowano początkowo 5 mL mieszaniny ACN/MeOH (1:1, v/v), a następnie 5 mL wody. Na tak przygotowane kolumnienki naniesione zostały wcześniej uzyskane ekstrakty substancji barwiących. Jony fluorkowe oraz substancje jonowe i polarne wyeluowano 3 mL 0,01% wodnego roztworu TFA, a substancje barwiące wymyło 1 mL 0,01 % roztworu TFA w ACN/MeOH (1:1, v/v) [95]. Oczyszczony ekstrakt odparowano w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie DMSO/ACN/MeOH (1:1:1, v/v/v) i poddano analizie chromatograficznej.

Zastosowanie techniki SPE do oczyszczania i wzbogacania próbek ekstraktów zawierających substancje barwiące okazało się być etapem zbędnym, a w przypadku ekstraktów zawierających silnie polarne substancje barwiące wręcz niekorzystnym. Oczyszczanie ekstraktów na kolumnienkach SPE powodowało bowiem ich utratę, a tym samym zmniejszało efektywność ekstrakcji. Przykładowo, w tym samym ekstrakcie z koszenili po oczyszczeniu zgodnie z powyżej opisaną procedurą, odzysk kwasu karminowego był mniejszy o 30%, niż w ekstrakcie, który poddano analizie chromatograficznej bez dodatkowego oczyszczania.

5.5. Wpływ czasu pracy łaźni ultradźwiękowej

Farby olejne zawierają w swoim składzie nie tylko laki barwne, ale i spoiwa oraz inne dodatki, które utrudniają ekstrakcję substancji barwiących. Spoiwa malarskie są bardzo często silnie spolimeryzowane. Ekstrakcja wspomagana falami ultradźwiękowymi jest techniką umożliwiającą szybszą homogenizację wieloskładnikowych próbek, co znacznie skraca proces ekstrakcji, w porównaniu do metod klasycznych polegających na mechanicznym rozdrabnianiu próbki. Nieodzownym wydawało się zatem określenie optymalnego czasu pracy łaźni ultradźwiękowej, niezbędnego do efektywnej izolacji substancji barwiących z farb. W tym też celu analizie poddane zostały farby modelowe wykonane na bazie laków barwnych z marzanny barwierskiej (antrachinony), jagody perskiej (flawonoidy) oraz indygo (indygoidy).

Przygotowane próbki farb poddane zostały działaniu fal ultradźwiękowych odpowiednio przez 5, 15 i 30 minut. Proces ekstrakcji przeprowadzony został w trzech powtórzeniach. Do ekstrakcji użyto 4M wodny roztwór kwasu fluorowodorowego z mieszaniną ACN/MeOH/DMSO. W celu sprawdzenia zasadności zastosowania łaźni ultradźwiękowej przygotowano również próbki odniesienia, które nie poddane zostały działaniu fal ultradźwiękowych. Wszystkie w ten sposób przygotowane ekstrakty analizowano chromatograficznie w trzech powtórzeniach.



Rysunek 19. Wpływ czasu pracy łaźni ultradźwiękowej na efektywność ekstrakcji antrachinonów, flawonoidów i indygotyn.

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie fal ultradźwiękowych w procesie izolacji pozwala zasadniczo zwiększyć jej sprawność w porównaniu do ekstrakcji bez zastosowania łaźni ultradźwiękowej. Zaobserwowano, że pięciominutowy czas pracy łaźni ultradźwiękowej jest niewystarczający do całkowitej izolacji wszystkich substancji barwiących z farb (Rys. 19). Wydłużenie czasu pracy łaźni ultradźwiękowej o 10 minut pozwala na izolację większej ilości barwników, w szczególności aglikonów. Dalsze wydłużenie czasu pracy łaźni ultradźwiękowej (30 min.) nie powodowało zauważalnego zwiększenia ilości wyekstrahowanych związków.

Piętnastominutowy czas pracy łaźni ultradźwiękowej uznano za najbardziej optymalny i zarazem ekonomiczny w procesie ekstrakcji wszystkich analizowanych substancji barwiących.

5.6. Metody izolacji substancji barwiących z różnego typu matryc

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów do izolacji substancji barwiących z surowców barwierskich oraz historycznych farb i nici zastosowane zostały poniżej opisane procedury.

- Procedura izolacji substancji barwiących z tkanin i surowców barwierskich.

Do próbek nici (~1 cm długości) lub surowca barwierskiego (~10 mg) dodano 500 μL mieszaniny zawierającej ACN/MeOH/DMSO (1:1:1, v/v/v) oraz 50 μL 4M HF. Całość poddano działaniu fal ultradźwiękowych przez 15 min., kontrolując jednocześnie temperaturę, by nie przekroczyła 40°C. W celu oddzielenia ekstraktu od stałych pozostałości, próbkę odwirowano (9000 rpm, 5 min), a roztwór nad osadu zdekantowano. Ekstrakt odparowano w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w mieszaninie zawierającej 300 μL DMSO/ACN/MeOH (1:1:1, v/v/v) i poddano analizie chromatograficznej.

- Procedura izolacji substancji barwiących z farb.

W celu rozpulchnienia spoiwa malarskiego, do rozdrobnionych mechanicznie próbek farb (~2 mg) dodano 300 μL chlorku metylenu i poddawano działaniu fal ultradźwiękowych przez 15 min. Następnie rozpuszczalnik odparowano w atmosferze azotu w temperaturze 40°C. Do suchej pozostałości dodano 500 μL mieszaniny zawierającej ACN/MeOH/DMSO (1:1:1, v/v/v) oraz 50 μL 4M kwasu fluorowodorowego. Przygotowaną mieszaninę ponownie poddano działaniu fal ultradźwiękowych przez 15 min, kontrolując przy tym temperaturę łaźni, by nie przekroczyła 40°C. Całość odwirowano (9000 rpm, 5 min), a roztwór nad osadu zdekantowano. Otrzymany ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w mieszaninie zawierającej 300 μL DMSO/ACN/MeOH (1:1:1, v/v/v) i poddano analizie chromatograficznej.

6. Optymalizacja warunków pracy chromatografu cieczowego i spektrometru mas

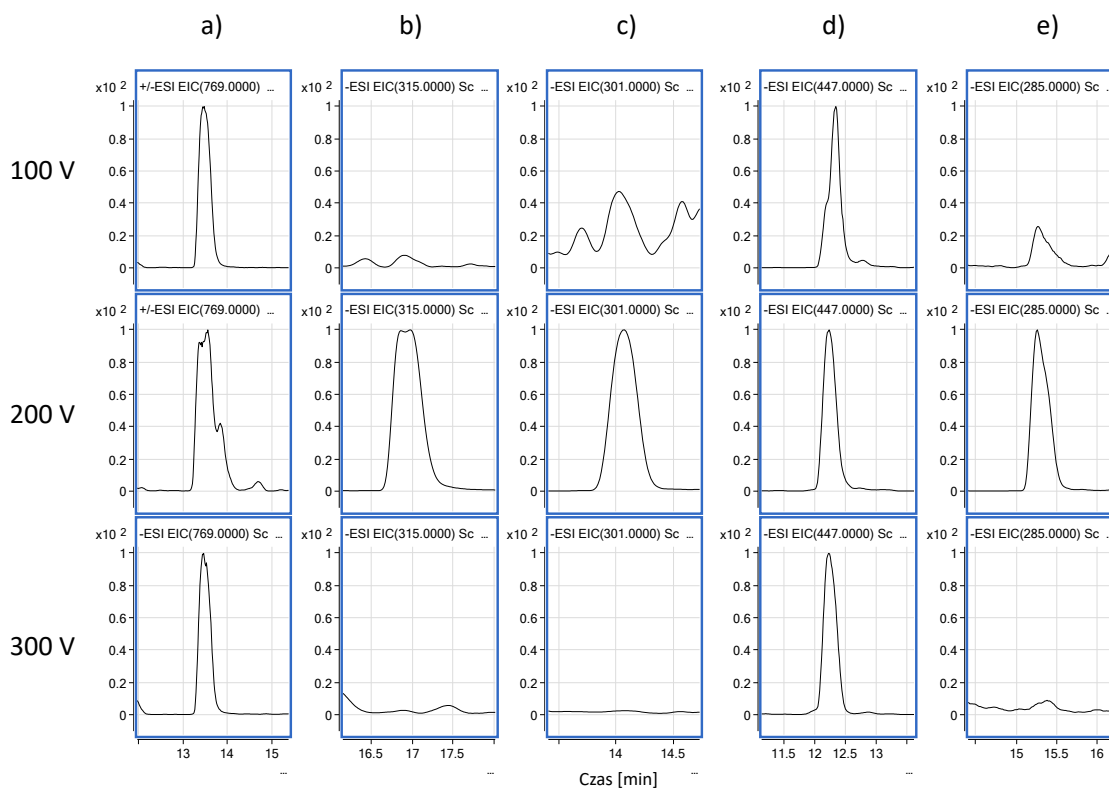
Trudności z opracowaniem uniwersalnych metodyk analitycznych związane są z różnymi właściwościami fizykochemicznymi związków, ich różną stabilnością, polarnością czy rozpuszczalnością, a tym samym wytrzymałością na warunki ekstrakcji, oczyszczania i analizy. Problematiczny jest również etap przygotowania próbek ze względu na złożoność matrycy.

Naturalne barwniki organiczne pozyskiwane z surowców barwierskich w swoim składzie zawierają od kilku do kilkunastu substancji barwiących, o bardzo zbliżonych lub znacznie różniących się właściwościach fizykochemicznych, które w pierwszym etapie należy rozdzielić na pojedyncze składniki w celu ich dalszej identyfikacji. W ramach pracy doktorskiej zoptymalizowane zostały warunki pracy zarówno układu chromatograficznego, jak i spektrometru mas. Biorąc pod uwagę właściwości fizykochemiczne analizowanych substancji barwiących zastosowano chromatografię cieczową w układzie faz odwróconych (RP) z programem elucji gradientowej. Optymalizacji poddano takie parametry, jak skład fazy ruchomej, program elucji, typ kolumny chromatograficznej, objętość dozowanej próbki, temperaturę kolumny chromatograficznej oraz napięcie fragmentacji. Istotny wpływ na rozdzielanie analitów ma rodzaj zastosowanej kolumny chromatograficznej. Ze względu na fakt, iż celem jest opracowanie szybkiej, prostej i czułej metodyki do identyfikacji substancji barwiących należących do różnych klas związków, bardzo trudne jest uzyskanie całkowitego rozdzielania chromatograficznego. W ramach optymalizacji procedury analitycznej zastosowane i porównane zostały dwie kolumny chromatograficzne: Poroshell EC-C18 o wymiarach 150 mm x 3 mm, 2.7 μm oraz ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 x 3 mm, 1.8 μm). Obie kolumny zawierają wypełnienie w postaci żelu krzemionkowego wysokiej czystości modyfikowanego grupami oktadecylowymi. Wstępne analizy chromatograficzne z zastosowaniem obu typu kolumn wykazały, iż obie są wystarczająco efektywne i umożliwiają pełne rozdzielanie analizowanych mieszanin substancji barwiących w czasie nie dłuższym, niż 30 minut. Obie kolumny charakteryzowały się również niskim zużyciem rozpuszczalników w trakcie jednej analizy (jedynie 12 mL). Jednakże z uwagi na fakt, iż kolumna Poroshell EC-C18 generowała niższe ciśnienie zwrotne oraz można ją stosować w szerokim zakresie pH fazy ruchomej (2-9), to ona w rezultacie została wybrana do dalszych analiz. Jako fazy ruchome testowano mieszaniny wody, acetonitrylu i metanolu z dodatkiem 1 mM wodnego roztworu octanu amonu lub 0.1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego. Zastosowanie lotnego buforu lub kwasu organicznego, jako dodatku do fazy ruchomej polepsza symetrię pików analizowanych związków, a także ich jonizację i to zarówno w trybie rejestracji jonów dodatnich, jak i ujemnych. Ze względu na zróżnicowaną hydrofobowość analizowanych substancji barwiących zastosowany został szeroki program elucji gradientowej umożliwiający pełne ich rozdzielanie.

Analizy chromatograficzne prowadzono z użyciem detektora spektrofotometrycznego UV-Vis z matrycą diodową sprzężonego ze spektrometrem mas. Do identyfikacji związków o nieznannej masie zasadne jest zastosowanie spektrometru mas pracującego w trybie przemieszczania widma (z ang. Full SCAN). Typowym zakresem przemieszczania widma dla tego rodzaju analizatorów wynosi 50 do 2000 Da (m/z). Do analizy substancji barwiących wybrany został zakres od 50 do 1000 Da, ponieważ masy cząsteczkowe naturalnych organicznych substancji barwiących

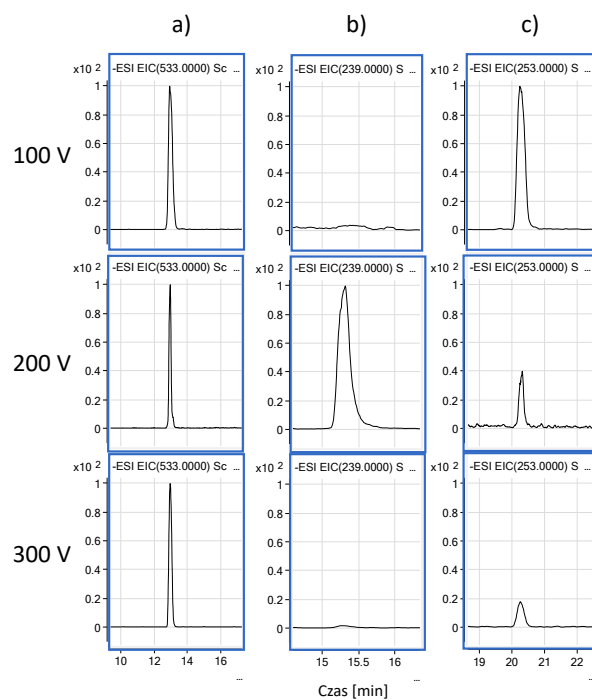
mieszczą się w tym właśnie przedziale. Analizator kwadrupolowy charakteryzuje się relatywnie niską rozdzielczością, co nie pozwala na oznaczenie dokładnych mas cząsteczkowych (monoizotopowych). W związku z tym konieczne było wykonanie dodatkowych analiz z zastosowaniem techniki o większej rozdzielczości mas, z użyciem analizatora czasu przelotu (TOF). Równie ważnym etapem optymalizacji metody identyfikacji substancji barwiących był dobór odpowiedniej techniki jonizacji. Biorąc pod uwagę fakt, iż analizie jakościowej poddawane są ekstrakty o nieznanym składzie zdecydowano się na jonizację poprzez elektrorozpylanie (ESI). Technika ta należy do „miękkich” technik jonizacji i tylko w niewielkim stopniu powoduje fragmentację analizowanych związków [96]. Umożliwia to obserwowanie jonów pseudocząsteczkowych w zarejestrowanych widmach mas, a tym samym na określenie mas cząsteczkowych wykrytych substancji. Technika ESI odpowiednia jest również do jonizacji związków termicznie niestabilnych np. glikozydów [97]. Widma zbierano w trybie rejestracji jonów dodatnich oraz ujemnych. Tryb rejestracji jonów ujemnych wybrany został, jako optymalny do identyfikacji zarówno flawonoidów i antrachinonów, jak i związków indygooidowych, ponieważ generował większą intensywność jonów pseudocząsteczkowych i fragmentacyjnych tworzących się w wyniku rozpadu wiązań glikozydowych, reakcjach *retro* Dielsa-Aldera oraz odszczepienia neutralnych cząsteczek w obrębie aglikonu (CO, CO₂, H₂O, CH₂O), jak i anionorodników np. CH₃⁻. Istotnym parametrem analizy HPLC-MS jest potencjał fragmentacyjny (napięcie fragmentacji). Dobór jego wartości ściśle związany jest z właściwościami fizykochemicznymi analizowanych substancji [98]. Z tego więc względu kolejnym optymalizowanym parametrem był dobór odpowiedniego napięcia fragmentacji. Jest to parametr niezmiernie ważny, gdyż to on warunkuje prawidłową identyfikację związku. W tym celu testowano kilka różnych wartości napięcia: 100, 200 i 300 V. Do badań użyte zostały ekstrakty surowców barwierskich zawierające substancje barwiące z grupy flawonoidów, antrachinonów oraz indygooidów. Pierwszy ekstrakt sporządzony z jagody perskiej zawiera flawonoidy, w tym *O*-diramnozo-glukozyd ramnetyny, glukozyd kwercetyny, ramnetynę, kwercetynę i kemferol. Drugi uzyskany z marzanny barwierskiej bogaty jest w antrachinony, np. prymwerozyd alizaryny, hystazarynę czy rubiadynę. W trzecim ekstrakcie z urzetu barwierskiego (indygo) obecne są indygotyna i indyrubina. W przypadku identyfikacji flawonoidów zastosowanie napięcia fragmentacji o wartościach 100 V było zbyt niskie, ponieważ umożliwiło wykrycie jedynie glikozydów flawonoidów i kemferolu. Pozostałe aglikony nie ulegały jonizacji. Zastosowanie napięcia o wartości 300 V okazało się z kolei zbyt wysokie, gdyż powodowało rozpad niektórych z analizowanych związków (kemferolu, ramnetyny i kwercetyny), co uniemożliwiło detekcję ich jonów pseudocząsteczkowych. Detekcja glikozydów takich, jak *O*-diramnozo-glukozydu ramnetyny i *O*-ramnozydu kwercetyny była możliwa przy zastosowaniu napięcia zarówno o wartościach 100, 200 jak

i 300V. Przykładowe chromatogramy jonowe EIC ekstraktu z jagody perskiej, z zastosowaniem różnych wartości potencjału fragmentacji przedstawione zostały na Rysunku 20.



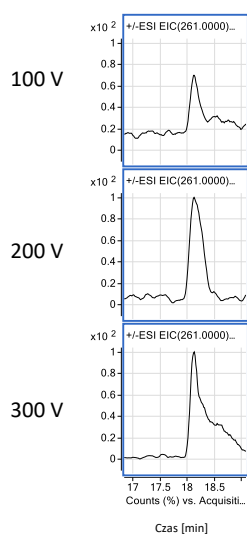
Rysunek 20. Chromatogramy EIC: a) *O*-diramnozo-glukozydu ramnetyny, b) ramnetyny, c) kwercetyny, d) glukozydu kwercetyny i e) kemferolu uzyskane przy różnych napięciach fragmentacji.

W przypadku antrachinonów zastosowanie napięcia fragmentacji 100 i 300 V również nie przyniosło zadowalających rezultatów. Po przyłożeniu napięcia do fragmentatora o wartości 100 V zarówno hystazaryna, jak i prymwerozyd alizaryny nie zostały wykryte. Widoczny był jedynie pik pochodzący od rubiadyny. Zastosowanie z kolei potencjału o wartości 300 V pozwoliło obserwować piki pochodzące od prymwerozydu alizaryny i rubiadyny, podczas gdy hystazaryny nie udało się wykryć. Zastosowanie napięcia 200 V umożliwiło natomiast detekcję wszystkich analizowanych antrachinonów. Przykładowe chromatogramy EIC antrachinonów uzyskane w trakcie analizy ekstraktu z marzanny barwierskiej z zastosowaniem różnych napięć fragmentacji (100, 200 i 300 V) przedstawiono na Rysunku 21.



Rysunek 21. Chromatogramy EIC: a) prymwerozydu alizaryny, b) hystazaryny, c) rubiadyny przy zastosowaniu różnych napięć fragmentacji.

W przypadku indygotyny zastosowanie napięć fragmentacji o wartościach 100, 200 i 300 V umożliwiło detekcję tego związku. Niemniej jednak najwyższą intensywność pików uzyskano przy zastosowaniu potencjału o wartości 200 V. Przykładowe chromatogramy EIC indygotyny uzyskane w trakcie analizy ekstraktu indygo, z zastosowaniem różnych napięć fragmentacji przedstawiono na Rysunku 22.



Rysunek 22. Chromatogramy EIC indygotyny przy zastosowaniu różnych napięć fragmentacji.

Napięcie fragmentacji o wartości 200 V wybrano, jako optymalne w detekcji substancji barwiących należących zarówno do grupy antrachinonów, flawonoidów, jak i indygooidów.

W Tabeli 2 przedstawione zostały zoptymalizowane warunki pracy układu HPLC-DAD-MS stosowane podczas rozdzielania i detekcji substancji barwiących obecnych w surowcach barwierskich, historycznych farbach i tekstyliach.

Tabela 2. Parametry pracy układu HPLC-DAD-MS.

Warunki chromatograficzne			
Kolumna chromatograficzna	długość	150 mm	
Poroshell EC-C18, Agilent Technologies	średnica wewnętrzna	3 mm	
	wielkość cząstek wypełnienia	2.7 µm	
Temperatura kolumny	40°C		
Objętość dozowanej próbki	2 µL		
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	0.4 mL/min		
Skład fazy ruchomej			
Faza ruchoma		(A) H ₂ O z 0.1% HCOOH	
		(B) ACN/MeOH (1/1 v/v) z 0.1% HCOOH	
Program elucji			
Gradient	Czas (min)	% A	% B
	0	90	10
	20	0	100
	30	0	100
Czas trwania analizy	30 min		
Warunki pracy spektrometru mas			
		QQQ	QTOF
Jonizacja ESI		Tryb tworzenia jonów dodatnich	
		Tryb tworzenia jonów ujemnych	
Tryb pracy		Przemiatanie widma 50-1000 m/z	
Napięcie fragmentacji [V]		200	200
Temperatura gazu osłonowego [°C]		250	350
Natężenie przepływu strumienia gazu osłonowego [L/min]		11	10
Temperatura gazu suszącego [°C]		300	325
Natężenie przepływu strumienia gazu suszącego [L/min]		5	10
Ciśnienie nebulizatora [psi]		45	35
Napięcie przyłożone do kapilary [V]		3500	
Napięcie ładowania [V]		500	1000



7. Analiza próbek o znaczeniu historycznym

Wstępna identyfikacja substancji barwiących przeprowadzona została z użyciem chromatografu cieczowego sprzężonego ze spektrometrem mas z analizatorem kwadrupolowym QQQ wyposażonym w źródło jonów ESI pracującym w trybie przemiatania widma, z jonizacją w trybie ujemnym. W celu potwierdzenia uzyskanych wyników dla wybranych związków przeprowadzono dodatkowo badania z użyciem kwadrupolowego analizatora czasu przelotu (HPLC-QTOF-MS/MS) pracującego w trybie przemiatania widma mas produktów reakcji jonów (*Product Ion Scan*), z jonizacją w trybie ujemnym. Analiza HPLC-QTOF-MS/MS pozwoliła na identyfikację związków na podstawie widm MS/MS wybranych jonów oraz ich dokładnych mas monoizotopowych. Uzyskane dane spektrochromatograficzne porównane zostały z wynikami otrzymanymi dla ekstraktów z surowców barwierskich w celu określenia pochodzenia substancji barwiących obecnych w badanych obiektach muzealnych.

Do określenia rodzaju włókna oraz rodzaju zaprawy barwierskiej użytej w procesie barwienia tkaniny i produkcji laków barwnych zastosowana została skaningowa mikroskopia elektronowa sprzężona ze spektrometrem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (SEM-EDS). Technika EDS pozwala na identyfikację składu pierwiastkowego analizowanych materiałów. Zdjęcia wykonane skaningowym mikroskopem elektronowym umożliwiającym z kolei obserwację topografii ich powierzchni, co pozwoliło określić między innymi mikrostrukturę oraz stopień ich zniszczenia. Spektroskopia w podczerwieni FT-IR umożliwiła rozpoznanie rodzaju włókien pobranych z historycznych tekstyliów.

7.1. Substancje barwiące obecne w tkaninach historycznych

7.1.1. Włókna pochodzące z XVI-wiecznego kobierca

Kobierzec z motywami czintamani wykonany został w drugiej połowie XVI wieku w warsztacie tureckim mieszczącym się w Kairze. Do zbiorów Muzeum Narodowego w Krakowie trafił z kościoła Bożego Ciała w Krakowie, któremu został ofiarowany przez Stanisława Jabłonowskiego, pułkownika króla Jana Sobieskiego, po jego powrocie ze zwycięskiej bitwy pod Wiedniem. Dywan jest szczególnie wyjątkowy ze względu na swoją wielkość. Jego powierzchnia to prawie 40 m², co czyni go jednym z największych zachowanych dywanów na świecie.

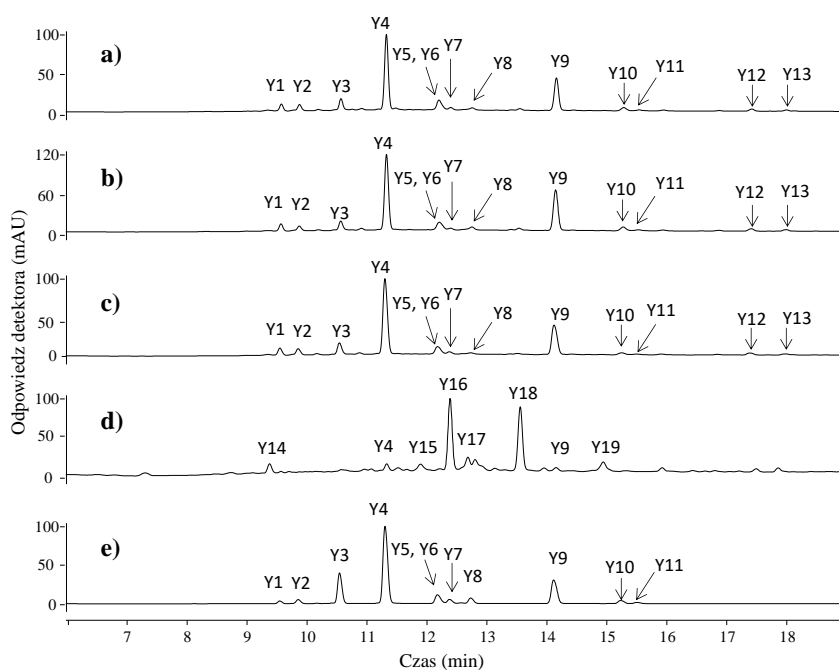
Analizie spektrochromatograficznej poddano jedenaście próbek włókien pobranych z różnych miejsc dywanu (Rys. 23). Wśród nich znajdowały się nici zabarwione na kolor żółty, czerwony, niebieski, zielony, brązowy oraz beżowy.



Rysunek 23. Zdjęcie fragmentu kobierca z motywami czintamani wraz z zaznaczeniem miejsc poboru próbek (kolekcja MNK-XIX-8950).

Włókna żółte

Cztery włókna oznaczone symbolami F2, F3, F10 i F11 miały barwę żółtą o różnych odcieniach. Spektrochromatogramy ekstraktów uzyskanych z tych nici przedstawione są na Rysunku 24.



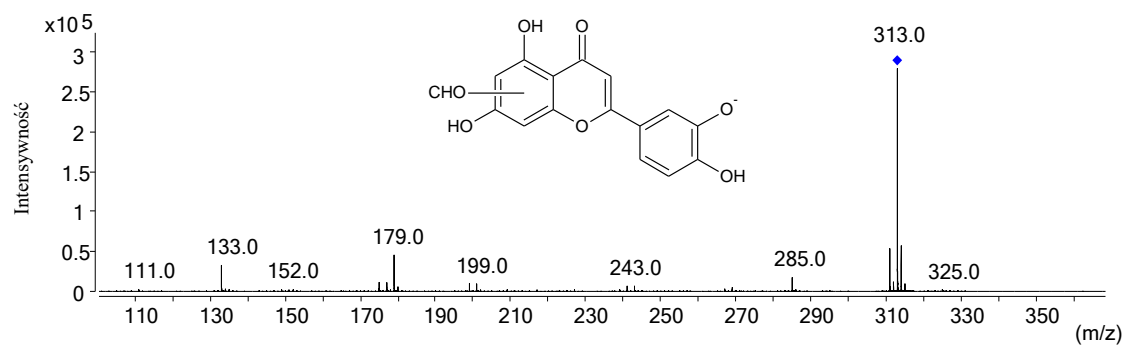
Rysunek 24. Spektrochromatogramy ekstraktów nici: a) F2, b) F3, c) F10, d) F11 oraz e) ekstrakt z rezedy żółtawej [99].

Struktury chemiczne i widma mas wszystkich zidentyfikowanych związków umieszczone zostały w Suplemencie pracy. Uzyskane spektrochromatogramy ekstraktów nici porównane zostały do profili chromatograficznych ekstraktów otrzymanych z surowców barwierskich dających żółtą barwę. W próbkach włókien oznaczonych symbolami F2, F3, F10 wykryto 8 glikozydów flawonoidów oraz trzy aglikony. Pierwszy związek **Y1** eluujący w czasie 9.5 min. został zidentyfikowany jako *C*-diglukozyd apigeniny. W widmie mas obecne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 593 oraz jonów fragmentacyjnych m/z : 503 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$, 473 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ i 575 $[M-H-H_2O]^-$. Utrata cząsteczek o masach 120 Da ($C_4H_8O_4$) i 90 Da świadczy o rozpadzie wiązań w obrębie cząsteczki glukozy, co jest reakcją charakterystyczną dla *C*-glukozydów [96]. Z kolei jon o wartości m/z 575 powstaje w wyniku odejścia cząsteczki wody. Identyfikacja *C*-diglukozydu apigeniny potwierdzona została na podstawie analizy HPLC-ESI(-)-QTOF (m/z 593.1513, błąd pomiaru masy -0.17 ppm). W widmie mas związku **Y2** widoczny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 609 z jego jonami fragmentacyjnymi m/z 447 $[M-H-Glu]^-$ oraz m/z 285 $[M-H-2Glu]^-$ (aglikon) tworzącymi się w wyniku sukcesywnej utraty cząsteczek glukozy. Na podstawie widma UV-Vis oraz ścieżki fragmentacji związek ten zidentyfikowany został jako *O*-diglukozyd luteoliny. Substancja oznaczona symbolem **Y3** posiada taką samą masę cząsteczkową, co związek **Y2**. W jego widmie mas widoczny jest sygnał o wartości m/z 447 odpowiadający jonowi po odszczepieniu jednej cząsteczki glukozy oraz sygnał o wartości m/z 285 tworzący się po odejściu dwóch cząsteczek tego cukru. Duża intensywność sygnału jonu powstałego po odszczepieniu jednej cząsteczki glukozy $[M-H-Glu]^-$ wskazuje na podstawienie jednostek cukrowych w różnych pozycjach aglikonu [23, 101]. Na podstawie widma mas oraz danych literaturowych związek ten zidentyfikowany został jako 3,7'-*O*-diglukozyd luteoliny [28]. Substancje oznaczone symbolami **Y4** i **Y8** posiadają takie same masy cząsteczkowe. Na widmach mas obu związków widoczne są sygnały pochodzące od jonu pseudocząsteczkowego m/z 447 i fragmentacyjnego m/z 285. W widmie mas substancji **Y8** dodatkowo widoczny jest sygnał o wartości m/z 284 pochodzący od jonu nieparzystnoelektronowego (anionorodnika) $[aglikon-H]^-$. Związki **Y4** i **Y8** zidentyfikowane zostały, jako *O*-glukozidy luteoliny. Obecność sygnału anionorodnika pozwala stwierdzić, że związek **Y8** to 4'-*O*-glukozyd luteoliny i tym samym odróżnić go od jego izomeru (7-*O*-glukozydu luteoliny - związek **Y4**) [24]. Pik chromatograficzny eluujący w czasie 12.2 min. wykazywał dość skomplikowane widmo mas. Algorytm dekonwolucji chromatogramu wykazał obecność dwóch koeluujących substancji **Y5** i **Y6**. W widmie mas związku **Y5** widoczny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 447 oraz jon o wartości m/z 285 $[M-H-Glu]^-$ pochodzący od aglikonu. Związek ten zidentyfikowany został jako *O*-glukozyd luteoliny, niestety pozycja jednostki cukrowej nie jest znana. Związek **Y6** o masie deprotonowanej cząsteczki 431 Da zidentyfikowany został jako *O*-glukozyd apigeniny. Sygnał jonu $^{0,2}X^-$ o wartości m/z 311 (utrata 120 Da) obserwowany w widmie mas świadczy

o rozpadzie glikozydu w obrębie wiązań 0,2 cząsteczki glukozy. Jest to typowe miejsce rozpadu cząsteczki cukru dla 7-*O*-glikozydów flawonoidów [24]. Związek **Y6** ostatecznie zidentyfikowany został jako 7-*O*-glikozyd apigeniny. W widmie mas związku **Y7** obecny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 461 oraz sygnały jonów fragmentacyjnych m/z 299 $[M-H-Glu]^-$ (aglikon) i m/z 284 $[M-H-Glu-CH_3]^-$. Odejście rodnika metylowego (utrata 15 Da) wskazuje na obecność grupy metoksylovej w cząsteczce, co świadczy, że zidentyfikowanym związkiem jest *O*-glikozyd chryzoeriolu. Związki oznaczone symbolami **Y9**, **Y10**, **Y11** to flawonoidy bez jednostek cukrowych. W widmie mas substancji **Y9** widoczny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 285 oraz jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z : 257 $[M-H-CO]^-$, 217 $[M-H-C_3O_2]^-$, 199 $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$ i 175 $[M-H-C_3O_2-C_2H_2O]^-$. Ponadto, w widmie mas obecne są także sygnały jonów powstałych w wyniku reakcji *retro* Dielsa-Aldera (RDA): jon $^{1,3}B^-$ m/z 133 oraz jon $^{1,3}A^-$ m/z 151. Wymienione jony pseudocząsteczkowe i fragmentacyjne są charakterystyczne dla cząsteczki luteoliny [102]. Związek **Y10** posiada podobną ścieżkę fragmentacji do luteoliny. W widmie mas widoczne są odejścia neutralnych cząsteczek: CO, CO₂, C₂H₂O, C₃O₂ (jony fragmentacyjne podane w Tabeli 3) oraz jony powstałe w reakcji RDA: $^{1,3}B^-$ m/z 117 i $^{1,3}A^-$ m/z 151. Związek ten zidentyfikowany został jako apigenina. Identyfikacja luteoliny i apigeniny poparta została danymi spektrometrii mas uzyskanymi dla ich syntetycznych wzorców. Substancja **Y11** o jonie $[M-H]^-$ m/z 299 ulega fragmentacji w wyniku utraty rodnika metylowego CH₃[•], tworząc jon o wartości m/z 284 oraz jon m/z 256 powstały w wyniku odejścia cząsteczki tlenku węgla [103]. Substancja ta zidentyfikowana została jako chryzoeriol. Wszystkie zidentyfikowane substancje barwiące obecne w ekstraktach nici F2, F3 oraz F10 wskazują na to, że zostały one zabarwione wyciągami z rezedy żółtawej i jagody perskiej.

W ekstraktach tych nici wykryte zostały dwie dodatkowe substancje (**Y12** i **Y13**) nieopisane jak dotąd w literaturze. W widmach mas obu związków obserwuje się jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 313. Sugerować to może, iż związki te są swoimi izomerami konstytucyjnymi. Ich widma fragmentacyjne są prawie identyczne. Widoczne są sygnały jonów o wartościach m/z : 285 $[M-H-CO]^-$, 243 $[M-H-CO-C_2H_2O]^-$, 201 $[M-H-CO-2C_2H_2O]^-$ oraz 179 $[M-H-134]^-$ i 133 $[M-H-180]^-$. Sygnały m/z 179 oraz m/z 133 odpowiadają jonom $^{1,3}A^-$ i $^{1,3}B^-$, powstałym w wyniku reakcji RDA w obrębie cząsteczki flawonoidu. Jon m/z 133 ma taką samą wartość m/z , co jon $^{1,3}B^-$ cząsteczki luteoliny, natomiast jon m/z 179 ma masę większą od jonu $^{1,3}A^-$ luteoliny o 28 Da. Różnica mas między jonami $^{1,3}A^-$ związków **Y12** i **Y13** a jonom $^{1,3}A^-$ luteoliny świadczyć może o obecności dodatkowego podstawnika, prawdopodobnie grupy formylowej w pierścieniu A flawonoidu (Rys. 25). Odmiennie czasy retencji obu substancji (17.4 i 18.0 min.) wskazują na to, że grupy te podstawione są w różnych pozycjach pierścienia A flawonoidu. Zaproponowana struktura chemiczna związków **Y12** i **Y13** została potwierdzona na podstawie analizy QTOF. Substancje te nie zostały wykryte w ekstraktach roślinnych

z rezedy żółtawej ani jagody perskiej, co świadczyć może, iż powstały one w wyniku naturalnego starzenia tego zabarwionego włókna.



Rysunek 25. Widmo MS/MS oraz przypuszczalna struktura chemiczna substancji Y13.

Uzyskane dane spektrometryczne (czasy retencji, maksima absorpcji (λ_{\max}), wzory sumaryczne, jony pseudocząsteczkowe wraz z błędem pomiaru ich masy oraz jony fragmentacyjne), a także nazwy zidentyfikowanych związków przedstawione zostały w Tabeli 3.

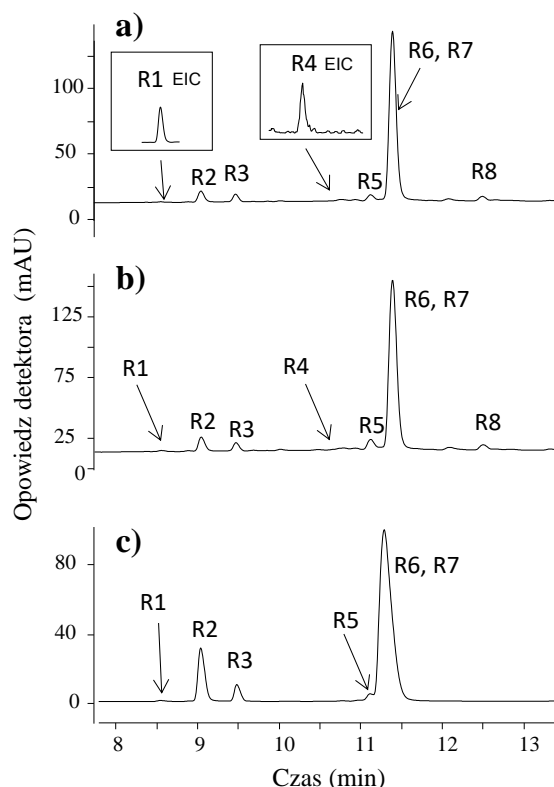
Tabela 3. Substancje barwiące zidentyfikowane w żółtych włóknach.

Peak	tr (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Jony fragmentacyjne (m/z)	Wzór sumaryczny	Błąd (ppm)	Nazwa związku	λ_{max} (nm)
Y1	9.56	593.1513	503, 473, 383, 353	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-0.17	C-diglukozyd apigeniny	272, 335
Y2	9.87	609.1442	447, 285	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	3.12	O-diglukozyd luteoliny	268, 336
Y3	10.56	609.1462	447, 285	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.16	3,7'-O-diglukozyd luteoliny	268, 341
Y4	11.32	447.0923	285	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2.24	7-O-glukozyd luteoliny	268, 349
Y5	12.20	447.0932	285	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.24	O-glukozyd luteoliny	268, 337
Y6	12.20	431.0989	311, 269, 268	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-1.16	7-O-glukozyd apigeniny	266, 348
Y7	12.40	461.1072	341, 299, 284, 283	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	3.68	O-glukozyd chryzoeriolu	266, 348
Y8	12.76	447.0936	285	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.67	4'-O-glukozyd luteoliny	268, 342
Y9	14.16	285.0407	257, 217, 199, 175, 151, 133	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1.05	luteolina	266, 349
Y10	15.28	269.0454	225, 151, 117	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0.37	apigenina	267, 337
Y11	15.54	299.0563	284, 256	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-0.67	chryzoeriol	266, 347
Y12	17.42	313.0349	285, 243, 201, 179, 133	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	1.6	poходna luteoliny	248, 346
Y13	18.01	313.0342	285, 243, 201, 179, 133	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	3.83	poходna luteoliny	284, 346
Y14	9.37	349.0028	371, 338, 269, 225, 213, 177, 165, 149, 135, 121	-	-	nzyd.	261, 392
Y15	11.99	243.0294	215, 199, 187, 175, 145, 113	C ₁₃ H ₈ O ₅	2.06	"związek typu C"	310, 346
Y16	12.39	269.0448	241, 225, 201, 185, 169, 149, 133, 121	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	2.60	isomer sulfureiny	316, 343
Y17	12.68	285.0407	269, 227, 179, 149, 135, 121	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1.05	fisteina	320, 360
Y18	13.55	269.0459	241, 225, 213, 197, 135, 133	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-1.47	sulfureyna	256, 396
Y19	14.95	314.0302	267, 239, 217, 199, 163, 135	-	-	nzyd.	292, 342



Niść F11 w odróżnieniu od pozostałych nici (F2, F3, F10) wykazywała soczystą żółto-pomarańczową barwę. Skład substancji barwiących obecnych w ekstrakcie tego włókna różnił się też zasadniczo. Na spektrochromatogramie zaobserwować można dwa intensywne piki oznaczone symbolami **Y16** i **Y18**. Są to główne substancje barwiące. W widmie mas związku **Y18** obecny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 269 i sygnały jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z : 241 $[M-H-CO]^-$, 225 $[M-H-CO_2]^-$, 213 $[M-H-2CO]^-$, 195 $[M-H-2CO-H_2O]^-$, oraz 135 i 133. Jony m/z 135 i m/z 133 powstały najprawdopodobniej w wyniku reakcji RDA zachodzącej w obrębie pierścieni A i B szkieletu auronu (pochodna flawonoidu). Widmo UV-Vis tego związku wykazuje maksima absorpcji (λ_{max}) przy długości fali 256, 275 i 396 nm. Uzyskane wyniki oraz dane literaturowe pozwoliły stwierdzić, iż wykrytą substancją jest sulfuretyna [100-102]. Substancja barwiąca oznaczona symbolem **Y16** posiada zbliżone do sulfuretyny widmo mas. Widoczne są na nim sygnały o wartościach m/z : 269, 241, 225, 135 i 133, obecne również w widmie sulfuretyny. Świadczyć to może, że związek ten jest jej izomerem, ale niestety dokładna jego struktura chemiczna nie jest znana. Z kolei substancja **Y17**, w widmie której widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 285 oraz jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z : 241 $[M-H-CO_2]^-$, 229 $[M-H-2CO]^-$, 149, 135 i 121 zidentyfikowana została jako fisteina. Potwierdzają to dane spektrochromatograficzne uzyskane dla wzorca tego związku. W próbce ekstraktu nici F11 wykryto także substancje oznaczone symbolami **Y14**, **Y15** i **Y19**. Związki te nie były obecne w pozostałych włóknach ani w ekstraktach z rezedy żółtawej i jagody perskiej. W widmie mas związku **Y15** widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 243 i jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z : 215 $[M-H-CO]^-$, 199 $[M-H-CO_2]^-$, 187 $[M-H-2CO]^-$ oraz 175 i 113. Widmo UV-Vis związku **Y15** wykazuje maksima absorpcji przy długościach fali 258, 308 i 336 nm. Po porównaniu uzyskanych wyników z danymi literaturowymi związek ten zidentyfikowany został jako produkt fotodegradacji brazyleiny, substancji barwiącej obecnej w drzewie brazylijskim [7, 107]. Produkt ten znany jest w literaturze jako „związek typu C” (z *ang.* compound type C). Jest on uznawany za marker wskazujący na użycie wyciągu z drzewa brazylijskiego w procesie barwienia [108, 109]. Jest to jedyna wykryta substancja, która pochodzi z drzewa brazylijskiego. Biorąc pod uwagę fakt, iż czerwone substancje barwiące obecne w korze i twarżycy drzewa brazylijskiego łatwo ulegają fotodegradacji i podatne są na blaknięcie przypuszcza się, że włókno F11 pierwotnie miało barwę pomarańczowo-czerwoną, która zbladła w naturalny sposób na skutek działania promieni słonecznych [7]. Spowodowało to zmianę barwy nici na kolor żółto-pomarańczowy. Wszystkie zidentyfikowane substancje barwiące w tym włóknie świadczą o tym, że do barwienia użyta została mieszanina wyciągów z trzech surowców barwierskich young fustic, rezedy żółtawej oraz drzewa brazylijskiego. Dane spektrochromatograficzne wszystkich zidentyfikowanych substancji barwiących przedstawione zostały w Tabeli 3.

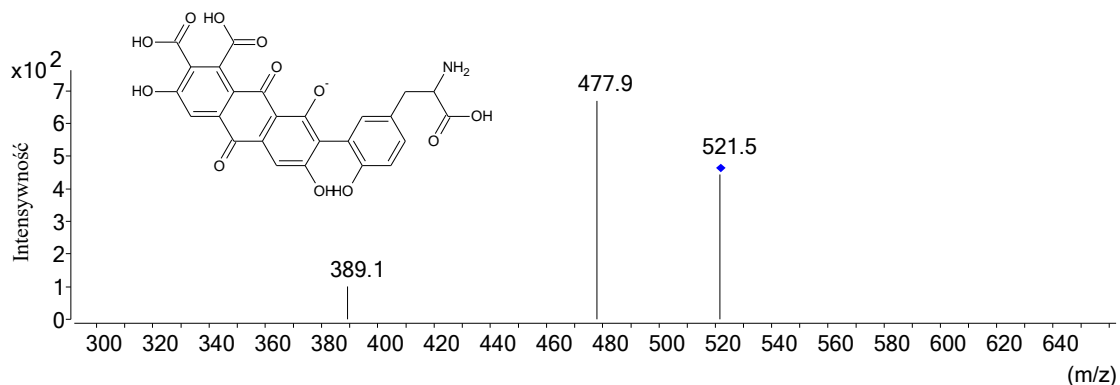
Analiza HPLC-DAD-MS ekstraktów z włókien czerwonych oznaczonych symbolami F6 i F12 wykazała obecność ośmiu substancji barwiących oznaczonych na spektrochromatogramach symbolami od R1 do R8 (Rys. 26). Profile chromatograficzne ekstraktów nici porównane zostały do profilu ekstraktu otrzymanego z surowca barwierskiego *lac dye*, zawierającego czerwone substancje barwiące. Dane spektrochromatograficzne oraz nazwy zidentyfikowanych substancji barwiących przedstawione zostały w Tabeli 4.



Rysunek 26. Spektrochromatogramy ekstraktów nici: a) F6, b) F12 i c) ekstraktu *lac dye* [99].

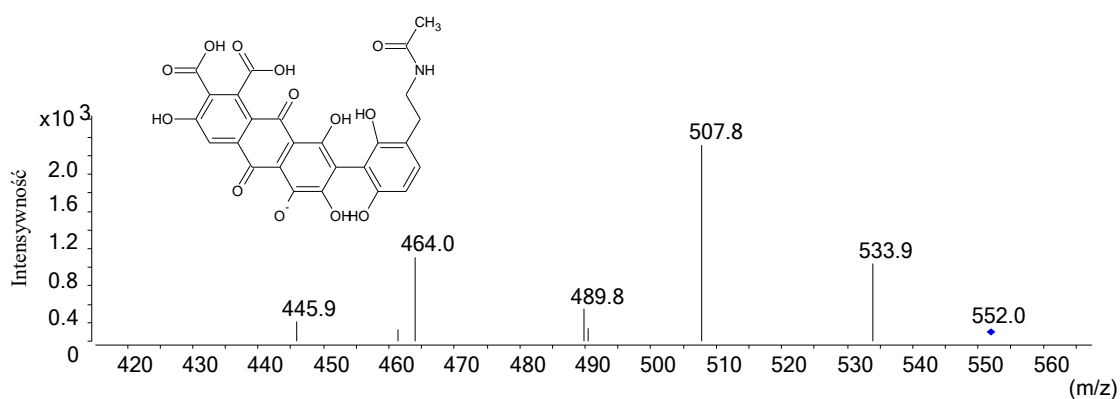
Największy pik chromatograficzny eluujący w czasie 11.2 min. ma dość skomplikowane widmo mas. Algorytm dekonwolucji chromatogramu wykazał obecność dwóch koeluujących substancji oznaczonych symbolami **R6** i **R7**. W widmie mas składnika pierwszego **R6** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy $[M-H]^-$ o wartości m/z 536, a także jony fragmentacyjne o wartościach m/z : 518 $[M-H-H_2O]^-$, 492 $[M-H-CO_2]^-$, 474 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 448 $[M-H-2CO_2]^-$, 430 $[M-H-2CO_2-H_2O]^-$ oraz 420 $[M-H-2CO_2-CO]^-$. Taka ścieżka fragmentacji charakterystyczna jest dla kwasów lakkainowych. Składa się na nią naprzemienna utrata dwutlenku węgla i cząsteczki wody [110]. Wnikliwa interpretacja widma mas pozwoliła zidentyfikować związek **R6** jako kwas lakkainowy A. W widmie mas związku **R7** obecny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 495, który fragmentuje dając jony o wartościach m/z : 477 $[M-H-H_2O]^-$, 451

[M-H-CO₂]⁻, 433 [M-H-CO₂-H₂O]⁻, 407 [M-H-2CO₂]⁻, 389 [M-H-2CO₂-H₂O]⁻. Substancja ta zidentyfikowana została jako kwas lakkainowy B. Obecność tych obu substancji pozwoliła stwierdzić, że do barwienia włókien użyty został wyciąg z insektów *Kerria lacca* Kerr (*lac dye*). Porównanie profili chromatograficznych ekstraktów z surowca barwierskiego i czerwonych nici ułatwiło dalszą identyfikację pozostałych antrachinonów. W widmie mas związku oznaczonego na spektrochromatogramie symbolem **R2** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 538 oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z: 520 [M-H-H₂O]⁻, 494 [M-H-CO₂]⁻, 476 [M-H-CO₂-H₂O]⁻, 450 [M-H-2CO₂]⁻ i 432 [M-H-2CO₂-H₂O]⁻. Związek ten na podstawie charakterystycznego szlaku rozpadu zidentyfikowany został jako kwas lakkainowy C. Kolejną wykrytą substancją barwiącą jest związek oznaczony symbolem **R3**. Widmo mas tego związku przedstawia sygnał cząsteczki deprotonowanej o wartości m/z 494 oraz sygnały jonów fragmentacyjnych m/z: 476 [M-H-H₂O]⁻, 450 [M-H-CO₂]⁻, 432 [M-H-H₂O-CO₂]⁻, 406 [M-H-2CO₂]⁻ i 388 [M-H-2CO₂-H₂O]⁻. Jony te, podobnie jak we wcześniej omawianych ścieżkach fragmentacji, utworzone zostały w wyniku naprzemiennej utraty cząsteczek dwutlenku węgla i wody. Związek **R3** to kwas lakkainowy E. Substancja oznaczona na spektrochromatogramie symbolem **R5** posiada masę cząsteczkową o 16 Da mniejszą od kwasu lakkainowego A. Jon pseudocząsteczkowy tego związku (m/z 520) fragmentuje tworząc jony o wartościach m/z: 476 [M-H-CO₂]⁻, 458 [M-H-H₂O-CO₂]⁻ oraz 432 [M-H-2CO₂]⁻. Substancja ta zidentyfikowana została jako kwas ksantolakkainowy A, który niezmiernie rzadko identyfikowany jest w obiektach historycznych [111]. Związek **R1** eluujący z kolumny chromatograficznej tuż przed kwasem lakkainowym C daje mało intensywny pik. W widmie mas tego związku obecny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 522 oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z: 478 [M-H-CO₂]⁻ i 434 [M-H-2CO₂]⁻ (Rys. 27). Masa cząsteczkowa tego związku jest mniejsza o 16 Da od masy kwasu lakkainowego C. Biorąc powyższe pod uwagę przypuszczać można, że związek **R1** jest pochodną kwasu lakkainowego C, uboższą o grupę hydroksylową. Analiza QTOF pozwoliła wyznaczyć dokładną masę monoizotopową jonu tego związku i jego wzór sumaryczny (522.0656 Da, C₂₅H₁₇NO₁₂, błąd pomiaru 4.02 ppm). Na podstawie uzyskanych informacji związek ten został przeze mnie nazwany „kwasem ksantolakkainowym C” analogicznie do kwasu ksantolakkainowego A. **Według mojej wiedzy substancja ta, nie została jak dotąd opisana w literaturze.**



Rysunek 27. Widmo MS/MS i prawdopodobna struktura chemiczna substancji **R1**.

Widmo mas (Rys. 28) związku oznaczonego na spektrochromatogramie symbolem **R4**, przedstawia sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 552 oraz jonów fragmentacyjnych m/z : 534 $[M-H-H_2O]^-$, 508 $[M-H-CO_2]^-$, 490 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 464 $[M-H-2CO_2]^-$, 446 $[M-H-2CO_2-H_2O]^-$. Związek ten zidentyfikowany został jako pochodna kwasu lakkainowego A, posiadającą dodatkową grupę hydroksylową w obrębie cząsteczki. Analiza QTOF pozwoliła wyznaczyć dokładną jego masę monoizotopową, wzór sumaryczny oraz błąd pomiaru masy (552.0769 Da, $C_{26}H_{19}NO_{13}$, błąd pomiaru 2.54 ppm). W związku z tym, że substancja **R4** obecna jest jedynie w ekstraktach historycznych włókien, a nie występuje w surowcu barwierskim *lac dye* przypuszcza się, że jest ona produktem naturalnego starzenia się tego barwnika. Potwierdza to analiza ekstraktu *lac dye* poddanego sztucznemu procesowi fotodegradacji (Rozdział 8.1). **Substancja ta nie została jak dotąd opisana w literaturze.**



Rysunek 28. Widmo MS/MS i prawdopodobna struktura chemiczna substancji **R4**.

Ostatnią substancją barwiącą wykrytą w ekstraktach czerwonych włókien jest związek oznaczony symbolem **R8**. W jego widmie mas widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 606 oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z : 588 $[M-H-H_2O]^-$,

562 [M-H-CO₂]⁻, 545 [M-H-CO₂-H₂O]⁻, 518 [M-H-2CO₂]⁻ oraz 500 [M-H-2CO₂-2H₂O]⁻. Zmierzona masa monoizotopowa deporotonowanej cząsteczki tego związku wynosi 606.1184 Da. Ścieżka fragmentacji tej substancji, podobnie jak widmo UV-Vis z maksimum absorpcji przy długości fali 288 i 492 nm, jest typowa dla kwasów lakkainowych. Niestety nie udało się określić struktury chemicznej tego związku.

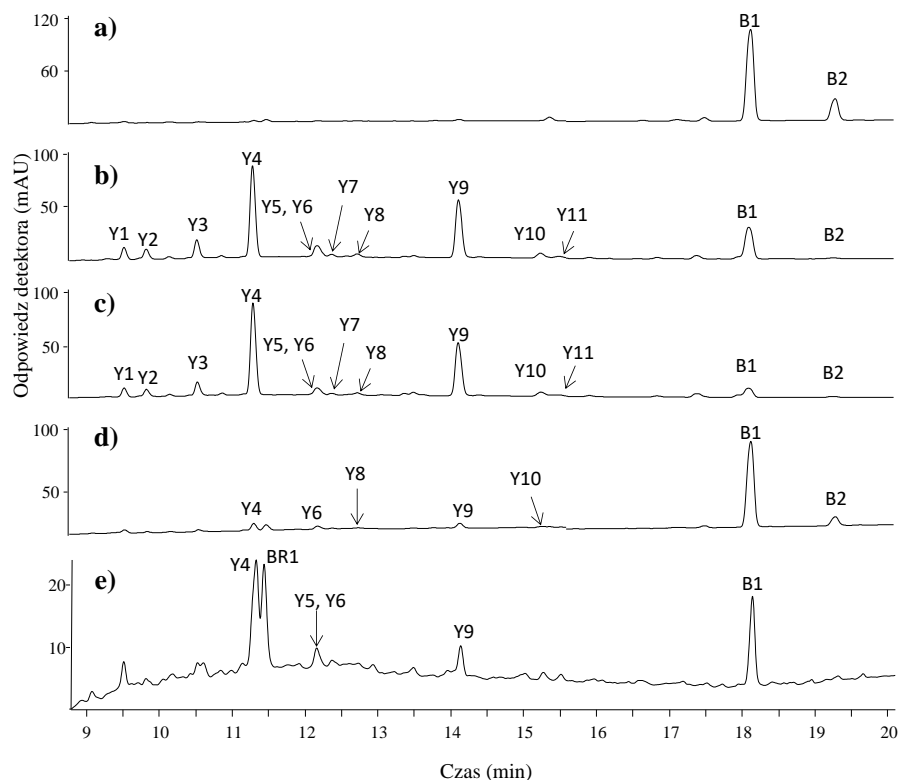
Tabela 4. Substancje barwiące zidentyfikowane we włóknach barwy czerwonej pobranych z kobierca.

Pik	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Jony fragmentacyjne (m/z)	Wzór sumaryczny	Błąd (ppm)	Nazwa związku	λ _{max} (nm)
R1	8.55	522.0656	478, 434	C ₂₅ H ₁₇ NO ₁₂	4.02	kwasy ksantolakkainowy C	293, 425
R2	9.04	538.0626	520, 494, 476, 450, 432,	C ₂₅ H ₁₇ NO ₁₃	0.19	kwasy lakkainowy C	288, 490
R3	9.48	494.0723	476, 450, 432, 406, 388, 378	C ₂₄ H ₁₇ NO ₁₁	1.21	kwasy lakkainowy E	288, 490
R4	10.99	552.0769	534, 508, 490, 464, 446	C ₂₆ H ₁₉ NO ₁₃	2.54	po pochodna kwasu lakkainowego A	285, 504
R5	11.12	520.0854	502, 476, 458, 432, 414	C ₂₆ H ₁₉ NO ₁₁	5.96	kwasy ksantolakkainowy A	294, 430
R6	11.29	536.0836	518, 492, 474, 448, 430, 420	C ₂₆ H ₁₉ NO ₁₂	-0.37	kwasy lakkainowy A	288, 490
R7	11.29	495.0568	477, 451, 433, 407, 389	C ₂₄ H ₁₆ NO ₁₂	0.2	kwasy lakkainowy B	288, 490
R8	12.55	606.1184	562, 518	-	-	nzid.	288, 492

Włókna niebieskie, zielone i brązowe

Analiza HPLC-DAD-MS ekstraktu z niebieskiego włókna oznaczonego symbolem F5 wykazała obecność dwóch substancji **B1** i **B2** (Rys. 29a). W widmie mas związku **B1** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 261 oraz dwa mniej intensywne jony fragmentacyjne o wartościach m/z 233 [M-H-CO]⁻ oraz 217 [M-CONH₂]⁻. Związek ten zidentyfikowany został jako indygotyna. Substancja **B2** posiada widmo mas bardzo podobne do indygotyny i zidentyfikowana została jako indyrubina. Oba te związki są swoimi izomerami konstytucyjnymi, ale łatwo je rozróżnić na podstawie odmiennych czasów retencji (18.1 i 19.2 min.) oraz widm UV-Vis. Indygotyna wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 620 nm, podczas gdy indyrubina przy 550 nm [112]. Obecność tych dwóch związków wskazuje na użycie indygo do barwienia włókna F5. Trudno jednak dokładnie określić, jaki gatunek rośliny (*Isatis tinctoria* L. czy *Indigofera tinctoria* L.) został użyty w procesie barwienia. Biorąc pod uwagę wyniki ostatnich badań (Rozdział 7.3.3.), które wykazały obecność śladowych ilości

apigeniny i chryzoeriolu w ekstrakcie z *Isatis tinctoria* L., domniemać można, że to raczej *Indigoferia tinctoria* L. została użyta do zabarwienia tej nici.



Rysunek 29. Spektrochromatogramy ekstraktów nici: a) F5, b) F8, c) F9, d) F4 oraz e) F1 [99].

Włókna oznaczone symbolami F4, F8 i F9 mają barwę zieloną w różnych odcieniach. Profile chromatograficzne ekstraktów nici F8 i F9 są bardzo do siebie zbliżone (Rys. 29b i 29c) i wskazują na obecność trzynastu substancji barwiących. Zidentyfikowane zostały substancje barwiące pochodzące z rezydy żółtawej: *C*-diglukozyd apigeniny (**Y1**), *O*-diglukozyd luteoliny (**Y2**), 3,7'-*O*-diglukozyd luteoliny (**Y3**), 7-*O*-glukozyd luteoliny (**Y4**), *O*-glukozyd luteoliny (**Y5**), 7-*O*-glukozyd apigeniny (**Y6**), *O*-glukozyd chryzoeriolu (**Y7**), 4'-*O*-glukozyd luteoliny (**Y8**), luteolina (**Y9**), apigenina (**Y10**) oraz chryzoeriol (**Y11**), a także te występujące w indygo: indygotyna (**B1**) i indyrybina (**B2**). W ekstraktach włókien F8 i F9 ilość barwników żółtych przeważa nad niebieskimi, stąd ich jasnozielony kolor. Z kolei w ekstrakcie włókna F4 indygotyna (**B1**) występuje w przeważającej ilości w porównaniu do żółtych barwników. Ma to niewątpliwie wpływ na jego intensywną ciemnozieloną barwę. Wśród żółtych barwników obecnych w ekstrakcie tego włókna zidentyfikowane zostały śladowe ilości: 7-*O*-glukozydu luteoliny (**Y4**), 7-*O*-glukozyd apigeniny (**Y6**), 4'-*O*-glukozyd luteoliny (**Y8**) oraz ich aglikony, luteolinę (**Y9**) i apigeninę (**Y10**). Wiele gatunków roślin barwierskich posiada w swoim

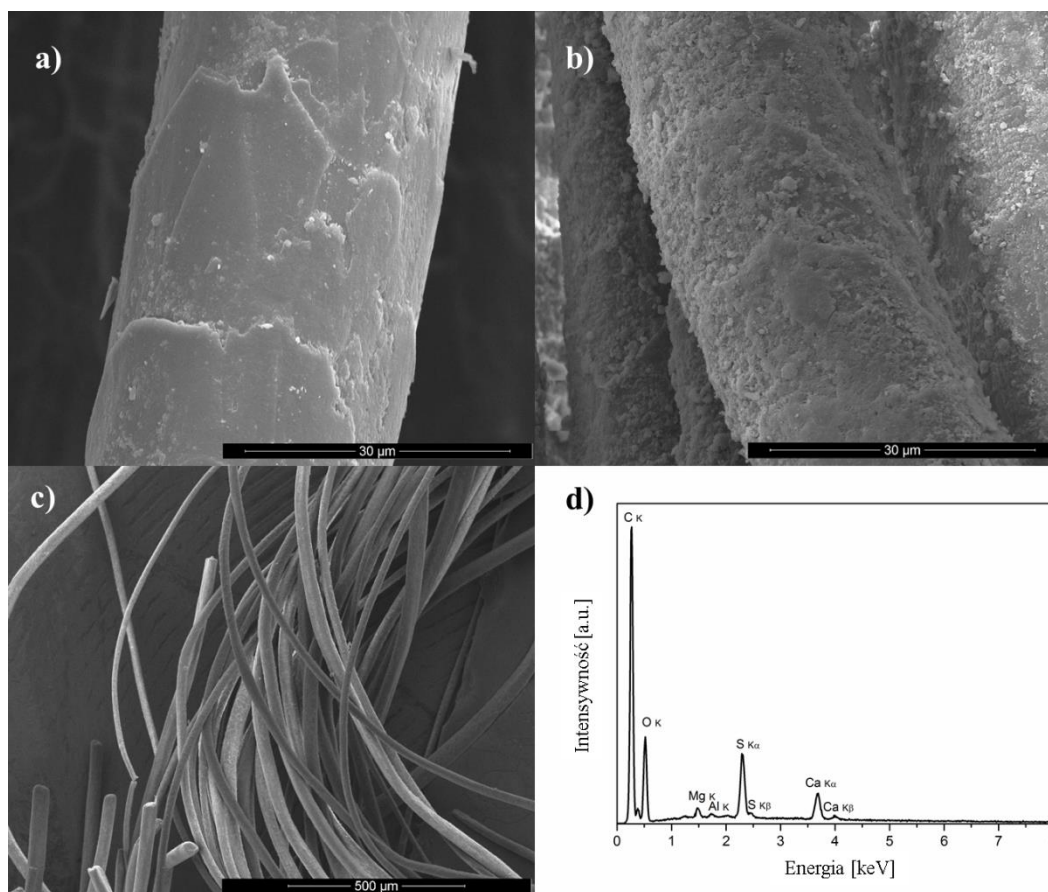
składzie luteolinę, jak i apigeninę, Trudno jest więc stwierdzić, który dokładnie gatunek został użyty do barwienia włókna F4. Markerami potwierdzającymi użycie rezedy żółtawej są luteolina, apigenina i chryzoeriol [26]. Ponieważ chryzoeriol nie został zidentyfikowany w próbce, nie ma więc pewności czy to właśnie rezeda żółtawa użyta została w procesie barwienia. Doniesienia literaturowe wskazują jednak, że rezeda żółtawa w połączeniu z indygo stosowana była najczęściej w celu uzyskania barwy zielonej [28, 33, 113].

Spektrochromatogram ekstraktu włókna brązowego F1 (Rys. 28e) wskazuje na obecność sześciu substancji barwiących. W ekstrakcie zidentyfikowano 7-*O*-glukozyd luteoliny (**Y4**), 7-*O*-glukozyd apigeniny (**Y6**), *O*-glukozyd luteoliny (**Y5**) oraz luteolinę (**Y9**). Są to substancje barwiące obecne w wielu gatunkach roślin, w tym w rezedzie żółtawej. W próbce nie wykryto jednak chryzoeriolu, dlatego też nie można stwierdzić jaki dokładnie gatunek wykorzystany został w trakcie procesu barwienia [60]. W ekstrakcie tej nici wykryto również indygotynę (**B1**) oraz kwas elagowy (**BR1**), których obecność wskazuje na użycie indygo oraz garbników roślinnych (tanin). Taniny dodawane do wełny zaprawionej żelazem powodują przygaszenie barwy prowadząc nawet do uzyskania brązu lub czerni [114].

Ze względu na to, że w ekstrakcie brązowego włókna F7 nie wykryto żadnych organicznych substancji barwiących, przypuszcza się, że włókno to w naturalnej postaci zostało użyte do utkania kobierca.

Analiza budowy włókien (SEM-EDS)

Stan fizyczny włókien określić można bezpośrednio na podstawie analizy ich morfologii. Badania mikrostruktury włókien przeprowadzone zostały przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej SEM. Zdjęcia SEM (Rys. 30) powierzchni nici wykazały ich cylindryczny kształt (średnice włókien od 20 do 40 μm), łuskowatość i guzkowate zgrubienia na całej ich długości. Powyższe cechy są charakterystyczne dla struktury wełny pochodzenia zwierzęcego [115]. W niektórych fragmentach widoczne są uszkodzenia struktury włókna w postaci przerwania ich ciągłości, licznych spękań i chropowatych powierzchni. Powstały one najprawdopodobniej w wyniku zużycia lub naturalnego procesu ich degradacji.



Rysunek 30. Zdjęcia SEM próbek włókien pobranych z koberca: a) włókno F2 (powiększenie 2500x), b) włókno F1 (powiększenie 2500x). c) włókno F2 (powiększenie 100x) oraz d) widmo SEM-EDS włókna F2 [99].

Technikę skaningowej mikroskopii elektronowej sprzężonej z spektroskopią dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (SEM-EDS) zastosowano do oznaczenia składu pierwiastkowego historycznych nici. Węgiel, tlen i siarka występują w największych ilościach. Analiza SEM-EDS wykazała również obecność śladowych ilości innych pierwiastków takich jak: Fe, Cu, Al, Ca, Na, Si. Glin, żelazo i miedź mogą pochodzić od zaprawy barwierskiej użytej w procesie barwienia. O ile sole glinu nie zmieniają barwy farbowanych tekstyliów, to sole żelaza i miedzi powodują ciemnienie barwników oraz samej wełny. Rodzaj i ilość użytych zapraw wpływa na ostateczne zabarwienie i odcień włókna [116]. Próbkę nici pobrane z koberca nie różniły się radykalnie składem pierwiastkowym, jednakże względne ich ilości były na różnym poziomie stężeń. Brązowe włókno F1 pokryte jest największą ilością soli żelaza i wapnia, co doskonale widać na jego zdjęciu SEM (Rys. 30b). Wapń, krzem i sód mogą pochodzić od zanieczyszczeń powstałych w trakcie przechowywania i użytkowania koberca. Nie można jednoznacznie potwierdzić, że są one składnikami zaprawy barwierskiej. Obecność siarki nie jest zaskakująca, ponieważ pierwiastek ten tworzy mostki disulfidowe w białkach

będących budulcem wełnianych włókien. Zaskakujący jest natomiast fakt, iż w żadnej z badanych próbek nici nie wykryto chromu, choć wiadomo, że w przeszłości jego sole były powszechnie stosowane jako zaprawy barwierskie [116]. W Tabeli 5 przedstawiony został skład pierwiastkowy wszystkich analizowanych włókien.

Tabela 5. Skład pierwiastkowy włókien.

Oznaczenie włókna	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Pierwiastek												
C	58	70	64	65	71	72	66	64	62	76	67	69
O	33	27	33	33	27	27	32	34	36	22	31	26
Al	0.6	0.5	0.6	0.3	0.1	0.1	0.3	0.3	0.9	0.2	0.1	0.5
Si	0.9	0.2	0.3	0.1	0.1	-	0.1	0.4	0.4	-	0.1	0.6
S	3.5	0.8	0.5	0.5	0.6	0.7	0.7	0.5	0.6	1.0	0.7	2.7
Ca	2.1	0.5	0.5	0.4	0.5	1.0	0.4	0.3	0.5	0.4	0.4	0.6
Fe	1.6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.2	0.1	<0.1	<0.1	-	0.15	0.1
Mg	0.2	0.2	0.2	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.2	0.1	0.3
Na	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
Śladowe ilości	-	P, Cu	P	P	-	Cu	Cu	Cu	P, Cu	Cu	Cu	Cu

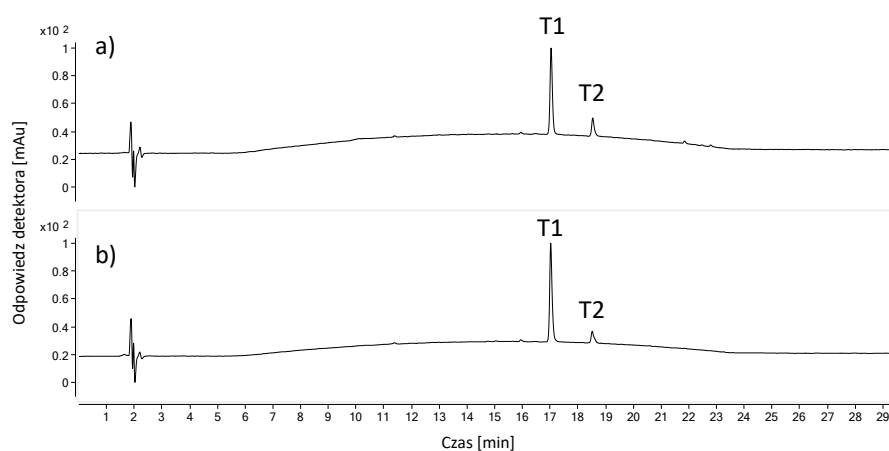
Analiza FT-IR

Spektroskopia IR jest techniką umożliwiającą identyfikację włókien i na podstawie charakterystycznych pasm absorpcyjnych pozwala je odróżnić od siebie. Widma IR wszystkich analizowanych włókien wykazują silne pasmo absorpcyjne przy 3275 cm^{-1} , odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania -N-H grup aminowych oraz wiązania -O-H grup fenyloowych. Pasma absorpcyjne przy 2925 i 2880 cm^{-1} pochodzą od drgań rozciągających wiązań -C-H. Pasma przy 1225 cm^{-1} pochodzi od drgań rozciągających wiązania -C-N. Słabe pasmo adsorpcyjne w obszarze 1040 cm^{-1} wskazuje z kolei na obecność wiązań eterowych. W widmach IR wszystkich analizowanych nici zaobserwowano sygnały w zakresie $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ świadczące o obecności pierwszorzędowych grup amidowych oraz sygnały przy $1550\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ charakterystyczne dla drugorzędowych grup amidowych. Ponadto, widoczne są pasma w obszarach $640\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ i $590\text{-}525\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań rozciągających grup C-S. Obecność wiązań amidowych i sulfidowych świadczy o białkowej strukturze nici [117, 118].

7.1.2. Włókna pochodzące ze średniowiecznego arrasu

Analiza HPLC-DAD-MS

Analizie spektrometrycznej poddano ekstrakty dwóch włókien o barwie czerwonej i fioletowej. Włókna te pobrane zostały ze średniowiecznego arrasu należącego do prywatnego kolekcjonera. Spektrochromatogramy (Rys. 31) obu ekstraktów są niemal identyczne, co wskazuje na taki sam skład substancji barwiących. W widmie mas związku oznaczonego symbolem **T1** widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego o wartości m/z 239 oraz jonów fragmentacyjnych tworzących się w wyniku utraty cząsteczek tlenku węgla i dwutlenku węgla o wartościach m/z : 211 $[M-H-CO]^-$, 195 $[M-H-CO_2]^-$, 183 $[M-H-2CO]^-$, oraz 167 $[M-H-CO_2-CO]^-$. Związek ten zidentyfikowany został jako alizaryna. W widmie mas substancji barwiącej **T2** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 255 wraz z jonami fragmentacyjnymi o wartościach m/z 227 $[M-H-CO]^-$ oraz 183 $[M-H-CO-CO_2]^-$. Na podstawie czasu retencji, ścieżki fragmentacji oraz widma UV-Vis związek ten zidentyfikowany został jako purpuryna.

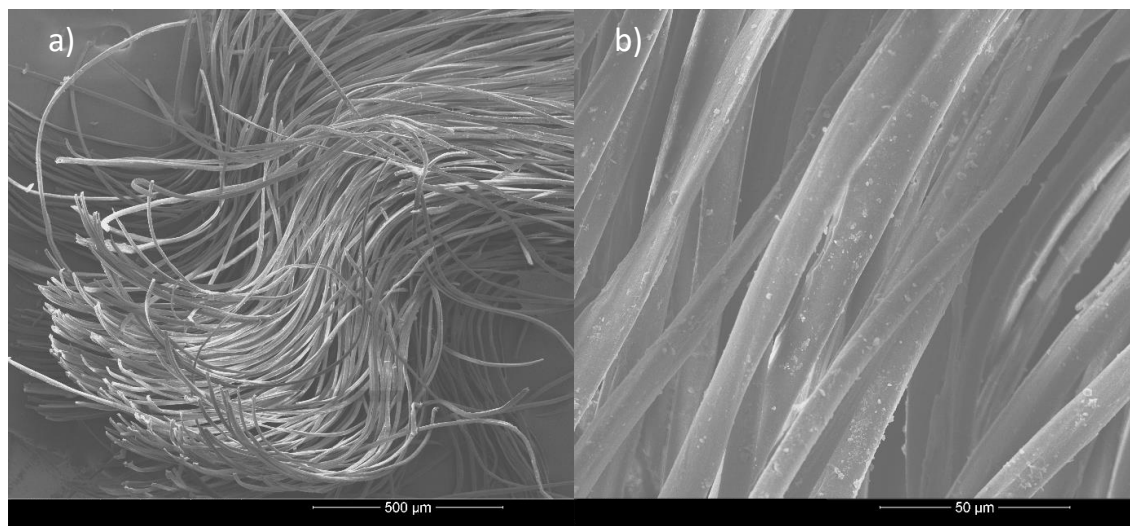


Rysunek 31. Spektrochromatogramy ekstraktów z nici a) czerwonej, b) fioletowej.

Obecność alizaryny i purpuryny w obu ekstraktach świadczy o użyciu marzanny barwierskiej w procesie barwienia. Mimo znacznej różnicy barw tych nici nie stwierdzono obecności niebieskich barwników indygooidowych (indygotyny czy indyrbiny) ani barwników purpurowych (bromopochodnych indygotyny i indyrbiny) w ekstrakcie nici o barwie fioletowej.

Analiza budowy włókien (SEM-XPS)

Zdjęcia SEM (Rys. 32) obrazujące mikrostrukturę powierzchni analizowanych nici wykazały ich ciągłość na całej długości i zróżnicowaną średnicę (od 10 do 20 μm) pojedynczych włókien. Ich powierzchnia jest gładka i charakteryzuje się wysoką połyskliwością. Powyższe cechy są typowe dla włókien jedwabnych [119].



Rysunek 32. Zdjęcia SEM fioletowego włókna pobranego z arrasu: a) powiększenie 100 x, b) powiększenie 1000 x.

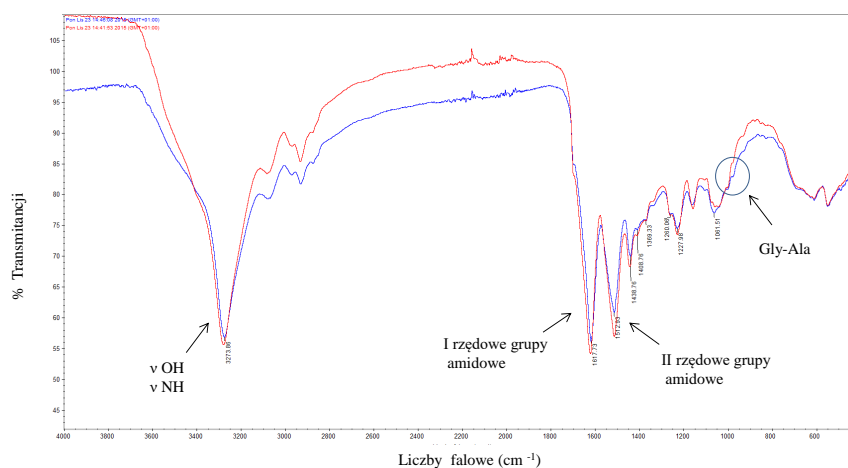
Ze względu na to, że w zależności od rodzaju zaprawy barwierskiej tkaniny przyjmują różne zabarwienie przeprowadzono analizę składu pierwiastkowego obu nici. Analiza wykonana została przy zastosowaniu rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów XPS. Zawartości procentowe węgla, tlenu, żelaza i glinu przedstawione zostały w Tabeli 6. W próbce nici fioletowej zidentyfikowano żelazo oraz znaczne ilości glinu, z kolei w nici czerwonej żelaza nie wykryto. Według doniesień literaturowych barwiąc tkaniny ekstraktem z marzanny barwierskiej zastosowanie soli glinu prowadzi do uzyskania barwy czerwonej, soli cynku barwy różowej, a użycie soli żelaza daje barwę fioletową [33]. Wyjaśnia to więc różnice w zabarwieniu obu analizowanych włókien mimo ich identycznego składu substancji barwiących.

Tabela 6. Skład procentowy pierwiastków obecnych w nici czerwonej i fioletowej.

zawartość %	fioletowa nić	czerwona nić
węgiel	57.68	60.97
tlen	25.16	27.18
żelazo	0.53	brak
aluminium	1.65	0.51

Analiza FT-IR

W widmie IR (Rys. 33) obu nici obserwuje się silne pasmo absorpcyjne przy 3274 cm^{-1} , odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania -N-H grup aminowych oraz wiązania -O-H. Kolejne silne sygnały obserwowane w zakresie $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ świadczą o obecności pierwszorzędowych grup amidowych, a sygnały w obszarze $1550\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ są charakterystyczne dla drugorzędowych grup amidowych. Obecność wiązań amidowych świadczy o białkowej strukturze nici (włókno zwierzęce) [117, 120]. Dodatkowo mało intensywne sygnały przy 995 oraz 975 cm^{-1} charakterystyczne są dla sekwencji aminokwasów Gly-Ala w strukturze białka fibroiny, co wskazuje na to że analizowane włókna są jedwabne [117, 121].



Rysunek 33. Widma FT-IR włókien pobranych ze średniowiecznego arrasu (linia czerwona-włókno czerwone, linia niebieska-włókno fioletowe).

7.2. Substancje barwiące obecne w farbach historycznych

Analizowane próbki farb pobrane zostały z różnego typu obiektów muzealnych, w tym z tubek farb oraz palet malarskich należących do Jana Matejki i Leona Wyczółkowskiego oraz z obrazów wybitnych polskich XIX wiecznych malarzy: Józefa Pankiewicza, Henryka Siemiradzkiego, Maksymiliana Gierymskiego, Jacka Malczewskiego oraz włoskiego malarza Marcello Bacciarellego. Identyfikacja naturalnych barwników organicznych obecnych w próbkach farb przeprowadzona została na podstawie ich czasów retencji, widm UV-Vis oraz widm mas (Suplement pracy). Otrzymane wyniki zostały dodatkowo porównane z danymi uzyskanymi dla ekstraktów wybranych surowców barwierskich, a także roztworów substancji wzorcowych.

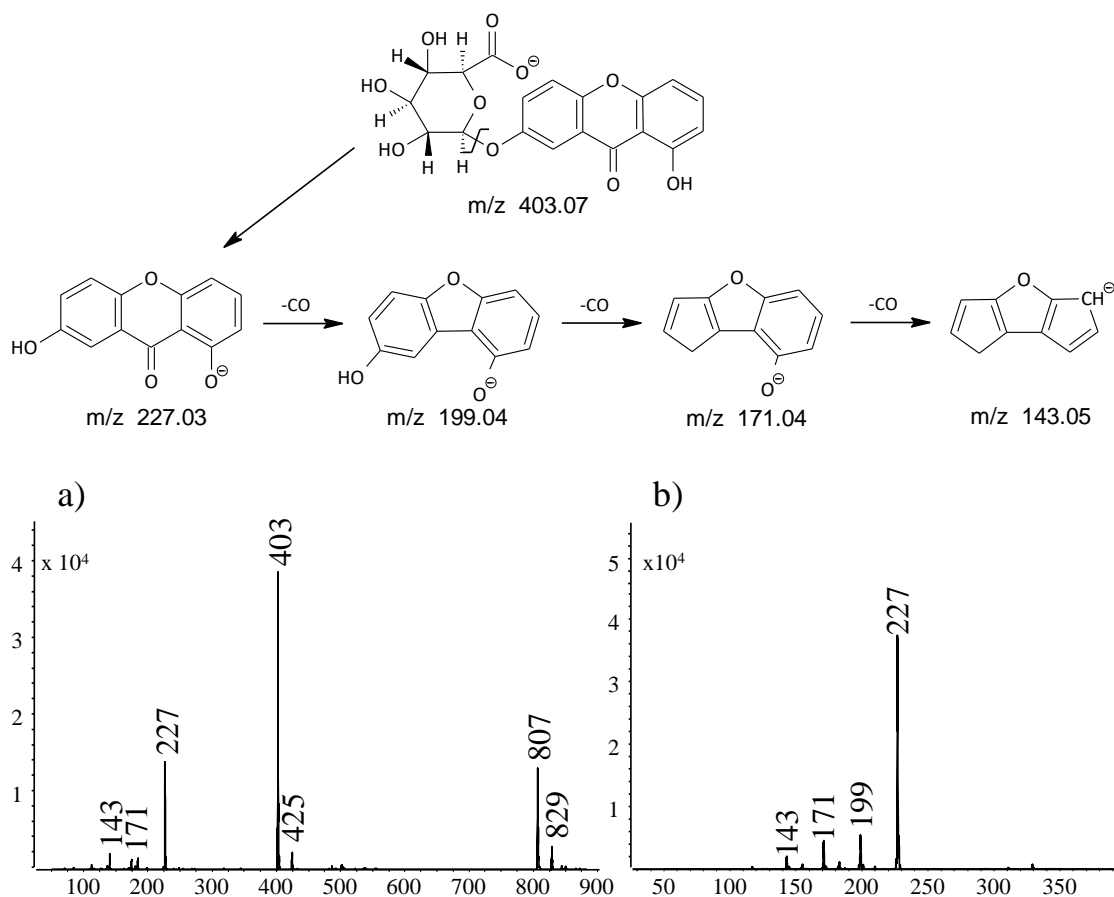
7.2.1. Farby pochodzące z tubek Jana Matejki

W Domu Matejki (oddział MNW w Krakowie) zgromadzona została niezwykła kolekcja jego materiałów malarskich. Zawiera ona blisko trzysta tubek farb, siedem palet oraz inne pamiątki po artyście. Tubki obejmują głównie farby produkowane przez francuską firmę Richard Ainè o czym świadczą częściowo zachowane papierowe etykiety na tubkach. Etykiety te pozwalają łączyć poszczególne farby z ich nazwą handlową, choć nie zawsze pokrywa się ona z sugerowanym przez producenta składem [122].

Farba Jaune de Indien

Częściowo zachowana etykieta na tubce farby, oznaczona przez producenta *Jaune de Indien* sugeruje, że barwnikiem użytym do jej produkcji była żółcień indyjska.

Spektrochromatogram ekstraktu tej farby wykazał obecność dwóch głównych substancji barwiących (Rys. 12.c, Rozdz. III.5.1.2). W widmie mas związku pierwszego eluującego w czasie 12.9 min. widoczne są trzy intensywne sygnały o wartościach m/z 807, 403 i 227 (Rys. 34a). Sygnał m/z 403 odpowiada deprotonowanej cząsteczce kwasu euksantynowego, z kolei jon m/z 227 to euksanton $[M-H-176]^-$. Sygnał o wartości m/z 807 odpowiada dimerowi kwasu euksantynowego $[2M-H]^-$, a pik m/z 829 to jon adduktu dimeru kwasu euksantynowego z sodem $[2M-2H+Na]^-$. Mniej intensywny sygnał o wartości m/z 425 odpowiada z kolei adduktowi kwasu euksantynowego z sodem $[M-2H+Na]^-$. Jony fragmentacyjne o wartościach m/z 199, 171 i 143 tworzą się w wyniku sukcesywnej utraty cząsteczek tlenu węgla (-28 Da). W widmie mas (Rys. 34b) związku eluującego w czasie 16.5 min. obserwuje się sygnał o wartości m/z 227 odpowiadający jonowi euksantonu z charakterystycznymi dla tego związku jonami fragmentacyjnymi m/z : 199, 171 i 143. Widma mas oraz zaproponowane ścieżki fragmentacji kwasu euksantynowego i euksantonu przedstawiono na Rysunku 34.



Rysunek 34. Widma mas oraz zaproponowane ścieżki fragmentacji: a) kwasu euksantynowego i b) euksantonu [94].

Niektóre naturalne barwniki organiczne są obecnie trudno osiągalne, a wręcz niedostępne. Przykładem takiego barwnika jest żółcień indyjska, której produkcję wstrzymano na początku XX wieku. Ze względu na to, że kwas euksantynowy nie jest obecnie dostępny a metoda jego otrzymywania nie została jak dotąd opracowana, przeprowadzono syntezę jego aglikonu (euksantonu).

Synteza euksantonu

Reakcja otrzymywania euksantonu przebiegała dwuetapowo na podstawie zmodyfikowanych procedur Carta i Patela [123, 124].

Synteza 2,6-dihydroksybenzoesanu metylu

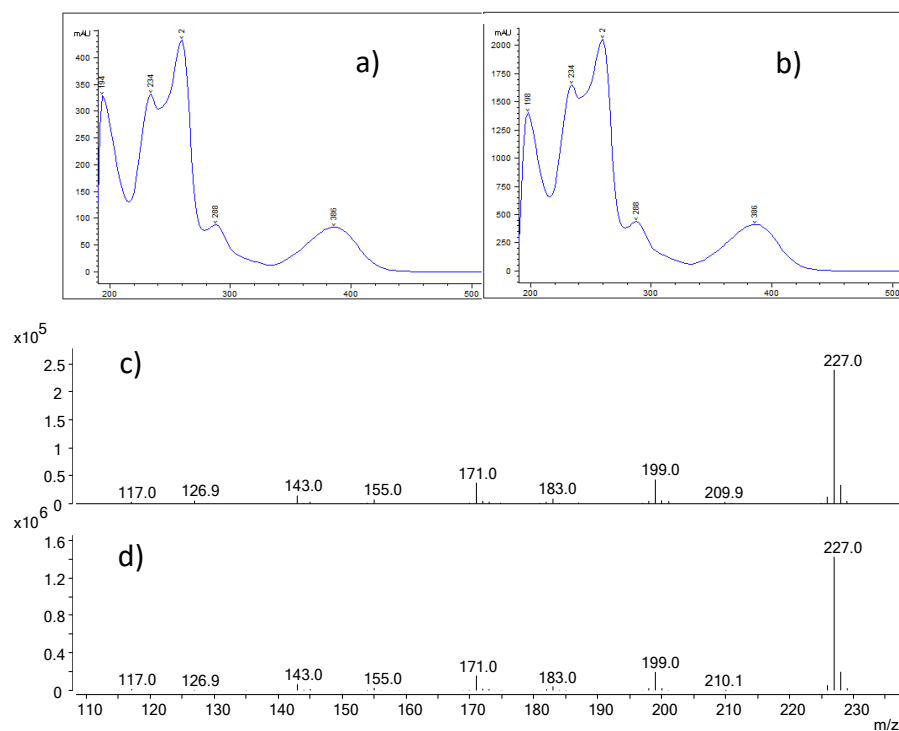
Do mieszaniny kwasu 2,6-dihydroksybenzoesowego (5 g, 0.032 mol) i metanolu (75 mL, 1.856 mol) wkraplano w temperaturze 0°C chlorek tionylu (10 mL, 0.138 mol). Całość mieszano przez 30 min. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia w atmosferze azotu (30 h). Otrzymaną mieszaninę poreakcyjną schłodzono, a rozpuszczalnik oddestylowano

pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i przemyto nasyconym wodnym roztworem NaHCO_3 . Warstwę organiczną suszono bezwodnym MgSO_4 , rozpuszczalnik oddestylowano do sucha, Surowy produkt oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina AcOEt/n-heksan (3:7, v/v). Produkt otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 55%, $R_f=0,67$ (faza ruchoma: AcOEt/n-heksan (30/70, v/v)), $t_r=59-63^\circ\text{C}$, $^1\text{H NMR}$ (MeOD-*d*4): δ 4.05 (s, 3H, CH_3), 6.45 (dd, 2H, $J=9.2$; 1.6, ArH), 7.30 (m, 1H, ArH).

Synteza 1,7-dihydroksyksantonu

Mieszaninę hydrochinonu (1.62 g, 0.015 mol), 2,6-dihydroksybenzoesu etylu (2.5 g, 0.15 mol) i eteru difenylowego (7.5 mL, 0.05 mol) ogrzewano w atmosferze azotu przez 48 h. Otrzymaną mieszaninę poreakcyjną schłodzono, a rozpuszczalnik oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt w postaci brązowego oleju oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina AcOEt/n-heksan (15:85, v/v). Po rekrystalizacji z 2-propanolu otrzymano produkt w postaci żółtych kryształów z wydajnością 9.09%, $R_f=0,43$ (faza ruchoma: AcOEt/n-heksan (30:70, v/v)), $^1\text{H NMR}$ (MeOD-*d*4): δ 6.56 (dd, 1H, $J=9.0$; 2.0, ArH), 6.77 (s, 1H, ArH), 6.87 (d, 1H, $J=9.1$, ArH), 6.95 (dd, 1H, $J=9.1$; 1.8, ArH), 6.98 (dd, 1H, $J=9.2$; 1.9 ArH), 7.34 (t, 1H, $J=5.3$, ArH), 12.9 (brs, 2H, -OH).

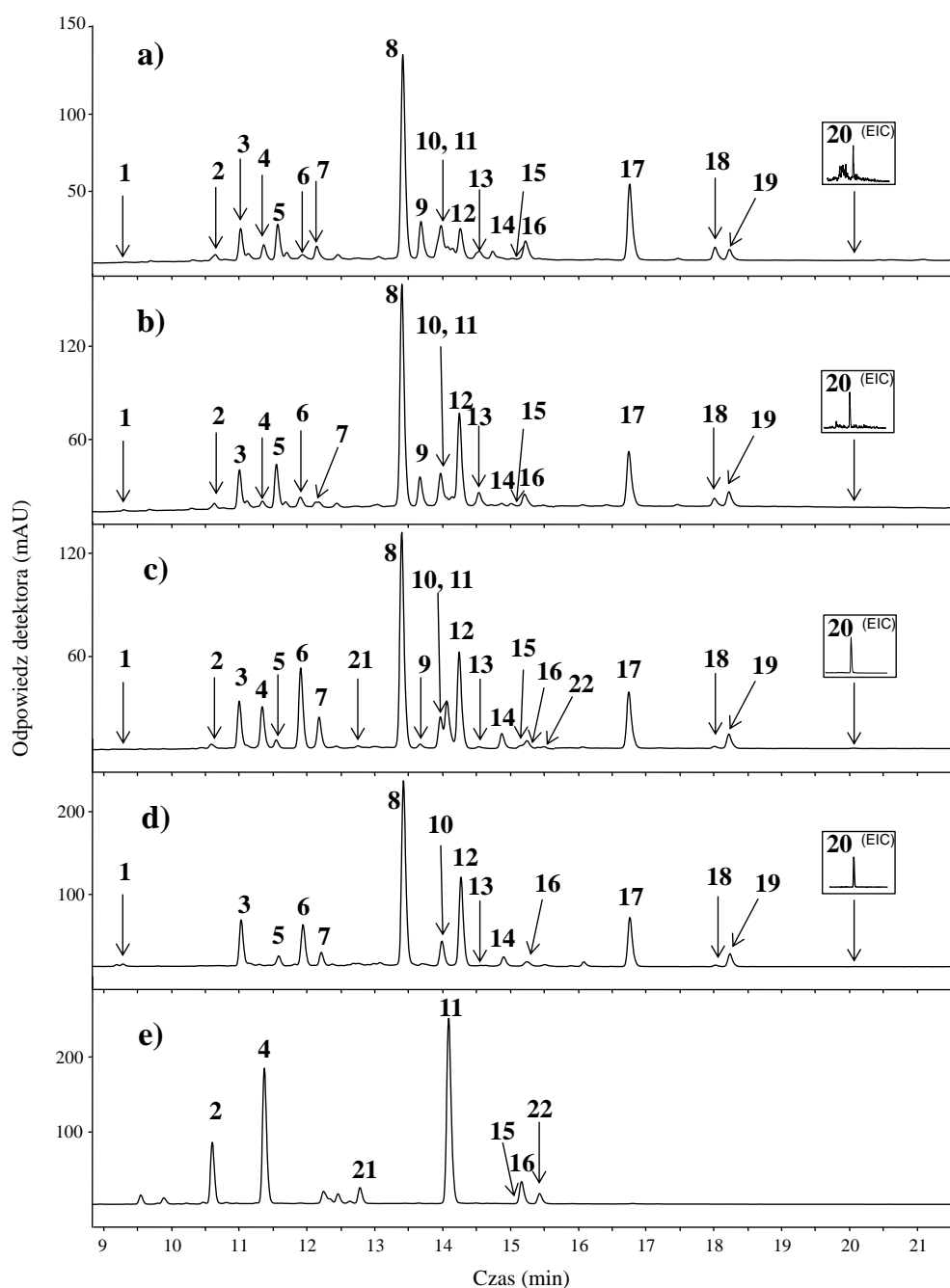
Uzyskany na drodze syntezy organicznej euksanton poddany został analizie HPLC-DAD-MS w tych samych warunkach chromatograficznych, co ekstrakt farby *Jaune de Indien*. Na podstawie czasów retencji, widm UV-Vis oraz widm mas potwierdzono, że w próbce historycznej farby obecny jest składnik żółci indyjskiej (Rys. 35).



Rysunek 35. Widma UV-Vis euksantonu a) wyizolowanego z farby *Jaune de Indien*, b) wzorca syntetycznego oraz widm mas euksantonu c) wyizolowanego z farby *Jaune de Indien*, d) wzorca syntetycznego.

Farby Laque de Robert 5 i Laque de Robert 6

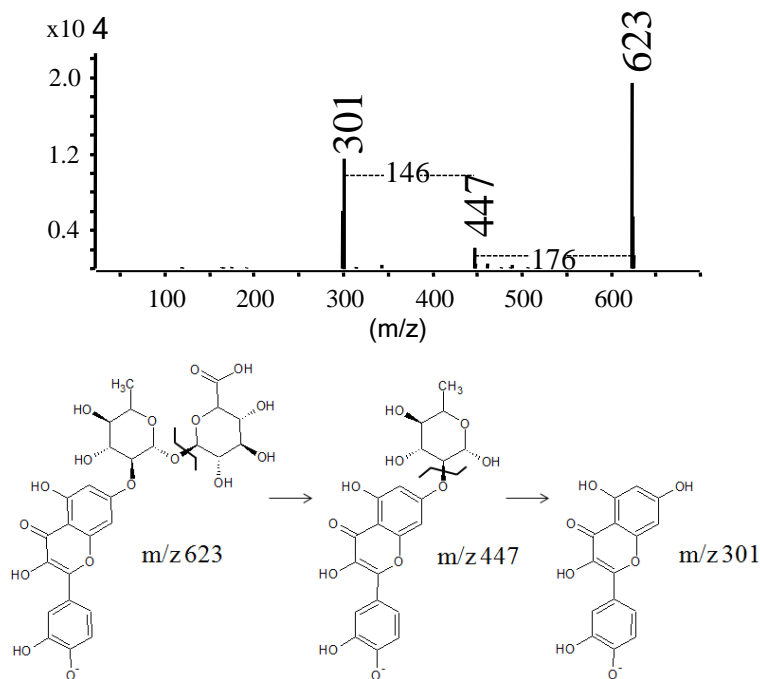
W próbkach farb pobranych z tubek o nazwach producenckich *Laque de Robert 5* i *Laque de Robert 6* zidentyfikowano łącznie dwadzieścia substancji barwiących, w tym 8 aglikonów i 12 glikozydów (Tab. 7). Profile chromatograficzne obu ekstraktów farb porównano z danymi uzyskanymi dla ekstraktów jagody perskiej (*Rhamni maturi* L.) i rezedy żółtawej (*Reseda luteola* L.) (Rys. 36).



Rysunek 36. Spektrochromatogramy ekstraktów: a) *Laque de Robert 5*, b) *Laque de Robert 6*, c) *Still de Grain*, d) jagody perskiej, e) rezedy żółtawej [125].

Jak widać na Rysunku 36 a i b, profile chromatograficzne ekstraktów obu farb są bardzo do siebie zbliżone. W widmie mas związku **1** eluującego w czasie 9.4 min. widoczny jest jon pseudocząsteczkowy $[M-H]^-$ o wartości m/z 609 z jonami fragmentacyjnymi m/z 447 i m/z 285, powstałymi w wyniku utraty odpowiednio jednej i dwóch jednostek glukozy. Związek ten zidentyfikowany został jako *O*-diheksozyd kemferolu. Substancja ta nigdy wcześniej nie została wykryta w ekstraktach z rezedy żółtawej ani jagody perskiej. Jej obecność stwierdzono natomiast w ekstrakcie roślinnym z rodziny *Tamus communis* [126]. W widmie mas substancji

oznaczonej na spektrochromatogramie numerem **2** obserwuje się charakterystyczną dla *O*-glukozydów flawonoidów ścieżkę fragmentacji. Substancja o jonie pseudocząsteczkowym m/z 609 ulega rozpadowi tworząc jony o wartościach m/z 447 (utrata 162 Da) i m/z 285 (utrata 324 Da). Jony te powstają w wyniku oderwania jednej, a następnie dwóch cząsteczek glukozy. Związek **2** zidentyfikowany został jako 3',7-*O*-diglukozyd luteoliny. W widnie mas związku **3** obecny jest jon $[M-H]^-$ m/z 755 i sygnały pochodzące od jonów fragmentacyjnych $[M-H-Rha]^-$ m/z 609, $[M-H-2Rha]^-$ m/z 463 oraz $[M-H-2Rha-Glu]^-$ m/z 301, odpowiadające utracie jednej, a następnie dwóch jednostek ramnozy i w końcu cząsteczki glukozy. Związek ten zidentyfikowany został jako *O*-diramnozo-glukozyd kwercetyny. Substancja oznaczona na spektrochromatogramie numerem **4** o masie cząsteczkowej 448 Da, na podstawie ścieżki fragmentacji zidentyfikowana została jako 7-*O*-glukozyd luteoliny. Jest to jeden z głównych składników obecnych w ekstrakcie z rezedy żółtawej. Związek **5** pojawiający się na spektrochromatogramie w formie piku o czasie retencji 11.6 min. wykazywał maksimum absorpcji (λ_{max}) przy długości fali 350 i 266 nm. W widmie mas tego związku obecny jest jon pseudocząsteczkowy $[M-H]^-$ o wartości m/z 739. Jony fragmentacyjne m/z 593, 447 i 285 odpowiadają odejściu jednej, a następnie dwóch cząsteczek ramnozy i ostatecznie utracie glukozy. Identyfikacja tego związku jako *O*-diramnozo-glukozydu kemferolu została potwierdzona na podstawie porównania widm UV-Vis czystego kemferolu i luteoliny. Choć oba te aglikony mają tę samą masę cząsteczkową, to jednak ich maksima absorpcji mają różne wartości. W widmie mas związku **6** widoczny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 609 oraz jony fragmentacyjne m/z 447 i m/z 301. Jony te tworzą się w wyniku sukcesywnej utraty cząsteczek ramnozy i glukozy. Zidentyfikowana substancja to *O*-ramnozo-glukozyd kwercetyny. Kolejny związek **7** wykazuje widmo mas, na którym obecny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 447 i jon fragmentacyjny m/z 301, powstały w wyniku utraty cząsteczki ramnozy. Substancja ta zidentyfikowana została jako *O*-ramnozyd kwercetyny. Największy pik na obu spektrochromatogramach ekstraktów farb *Laque de Robert 5* i *Laque de Robert 6* pochodzi od substancji **8**. Jon macierzysty tego związku (m/z 769) ulega fragmentacji dając jony potomne m/z 623 $[M-H-Rha]^-$, m/z 477 $[M-H-2Rha]^-$ oraz jon aglikonu m/z 315 $[M-H-2Rha-Glu]^-$ tworzące się w wyniku utraty odpowiednio jednej cząsteczki ramnozy, dwóch cząsteczek ramnozy oraz dwóch cząsteczek ramnozy i glukozy jednocześnie. Substancja ta zidentyfikowana została jako *O*-diramnozo-glukozyd ramnetyny. W widmie mas związku **9** eluującego w czasie retencji 13.7 min. widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 623 oraz dwa jony fragmentacyjne m/z 447 i m/z 301 powstające w wyniku odejścia cząsteczki kwasu glukuronowego i następnie cząsteczki ramnozy. Związek **9** to *O*-ramnozo-glukuronid kwercetyny. Widmo mas tego związku oraz prawdopodobna ścieżka jego fragmentacji przedstawiona została na Rysunku 37.



Rysunek 37. Widmo mas oraz ścieżka fragmentacji *O*-ramnozo-glukuronidu kwercetyny [125].

Identyfikacja tego związku poparta została szczegółową analizą HPLC-QTOF-MS/MS ($C_{27}H_{28}O_{17}$, 623.1253 Da, błąd 0.16 ppm). Związek ten obecny jest tylko w historycznych, ponad stuletnich farbach, które uległy najprawdopodobniej naturalnemu procesowi zestarzenia. Nie występuje on natomiast w ekstraktach z jagody perskiej czy rezedy żółtawej. *O*-ramnozo-glukuronid kwercetyny powstał przypuszczalnie ze swojego prekursora *O*-ramnozo-glukozydu (związek **6**) w wyniku utleniania. W obu próbkach farb *Laque de Robert* intensywność pików **9** przewyższa intensywność pików **6**, podczas gdy w ekstrakcie z jagody perskiej jest on jednym z najbardziej intensywnych sygnałów. **Związek ten nie został dotychczas opisany w literaturze.** Kolejną wykrytą substancją barwiącą oznaczoną numerem **10** jest kwercetyna, zidentyfikowana na podstawie widm UV-Vis i mas oraz czasu retencji. W widmie mas związku **11** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 285 oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z: 197, 151, 133. Związek ten zidentyfikowany został jako luteolina. W widmie mas związku **12** obserwuje się ścieżkę fragmentacji jonu macierzystego m/z 783 prowadzącą do utworzenia jonów potomnych o wartościach m/z: 637 [M-H-Rha]⁻, 491 [M-H-2Rha]⁻, 329 [M-H-2Rha-Glu]⁻ oraz 299 [M-H-2Rha-Glu-2CH₃]⁻. Jon m/z 299 tworzy się w wyniku odszczepienia trzech jednostek cukrowch oraz dwóch rodników metylowych CH₃[•] i wskazuje on na obecność dwóch grup metoksyłowych w obrębie cząsteczki aglikonu. Grupy metoksyłowe w porównaniu z grupami hydroksyłowymi są bardziej hydrofobowe, z tego też względu substancja ta eluuje z kolumny po kwercetynie i luteolinie. Związek **12** zidentyfikowany został jako *O*-diramnozo-glukozyd ramnazyny. Związek **13** eluujący w czasie

14.5 min. ma widmo mas, na którym widoczny jest jon $[M-H]^-$ m/z 637 oraz jony fragmentacyjne: m/z 329 $[M-H-RhaGlu]^-$ (utrata 308 Da), m/z 314 $[M-H-RhaGlu-CH_3]^-$ oraz m/z 299 $[M-H-RhaGlu-2CH_3]^-$. Związek **13** to *O*-ramnozo-glukozyd ramnazyny, co zostało potwierdzone analizą HPLC-QTOF-MS/MS ($C_{29}H_{34}O_{16}$, 637.1794 Da, błąd -3,14 ppm). W widmie mas związku **14** obserwuje się ścieżkę fragmentacji jonu macierzystego m/z 623 prowadzącą do utworzenia dwóch głównych jonów potomnych m/z 461 i m/z 315. Pierwszy z tych jonów tworzy się w wyniku odejścia glukozy, a drugi glukozy i ramnozy jednocześnie. Zidentyfikowanym związkiem jest *O*-ramnozo-glukozyd ramnetyny. Substancje oznaczone numerami od **15** do **19** są aglikonami flawonoidów. Na podstawie danych spektrometrycznych uzyskanych dla związków **15**, **16** i **19** zidentyfikowane zostały one odpowiednio jako apigenina, kemferol oraz ramnazyna. Substancja **17**, w widmie której widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 315 oraz jony fragmentacyjne m/z 300 $[M-H-CH_3]^-$, m/z 272 $[M-H-CH_3-CO]^-$, m/z 244 $[M-H-CH_3-2CO]^-$ zidentyfikowana została jako ramnetyna. Związek **18** wykazuje dość skomplikowane widmo mas, na którym widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 299 oraz jony fragmentacyjne o wartościach: m/z 284 $[M-H-CH_3]^-$, 271 $[M-H-CO]^-$, 256 $[M-H-CH_3-CO]^-$, 243 $[M-H-2CO]^-$ i 228 $[M-H-CH_3-2CO]^-$. Związek ten to ramnocytryna. Ostatnią zidentyfikowaną substancją **20** jest emodyna należąca do grupy antrachinonów. Substancja ta pochodzi z ekstraktu z jagody perskiej i posiada charakterystyczne widmo, w którym widoczne są sygnały pochodzące od jonów utworzonych w reakcjach dekarbonylacji i dekarboksylacji: m/z 241 $[M-H-CO]^-$, m/z 225 $[M-H-CO_2]^-$ oraz m/z 197 $[M-H-CO_2-CO]^-$.

Ma podstawie uzyskanych danych wnioskować można, iż do produkcji obu farb *Laque de Robert 5* i *Laque de Robert 6* użyto ekstraktów z jagody perskiej oraz z bliżej nieokreślonego gatunku rośliny należącej do rezedowatych, zawierającej duże ilości luteoliny. Nie można jednak potwierdzić, że w procesie barwienia użyty został ekstrakt z rezedy żółtawej, ponieważ w żadnych zanalizowanych ekstraktach farb nie został wykryty chryzoeriol.

Tabela 7. Substancje barwiące obecne w żółtych farbach *Laque de Robert 5, Laque de Robert 6 i Still de Grain*.

Pik	tr (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Jony		Wzór sumaryczny	Błąd (ppm)	Nazwa związku	λ _{max} (nm)
			fragmentacyjne (m/z)					
1	9.4	609.1458	447, 285		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	0.49	<i>O</i> -diglukozyd kemferolu	268, 325
2	10.6	609.1479	447, 285		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-2.95	3';7'- <i>O</i> -diglukozyd luteoliny	267, 342
3	11.0	755.2050	609, 463, 301		C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	-1.32	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd kwercetyny	256, 356
4	11.4	447.0941	327, 285, 151		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-1.79	7'- <i>O</i> -glukozyd luteoliny	255, 340
5	11.6	739.2096	593, 447, 285		C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	-0.68	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd kemferolu	266, 348
6	11.9	609.1462	447, 301		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.16	<i>O</i> -ramnozo-glukozyd kwercetyny	256, 350
7	12.2	447.0935	301, 211, 151		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.45	<i>O</i> -ramnozyd kwercetyny	257, 349
8	13.4	769.2191	623, 447, 315		C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	0.78	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd ramnetyny	257, 357
9	13.7	623.1253	447, 301		C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	0.16	<i>O</i> -ramnozo-glukuronid kwercetyny	260, 357
10	14.0	301.0360	232, 151, 121		C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-1.99	kwercetyna	255, 360
11	14.1	285.0400	197, 151, 133		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1.75	luteolina	254, 348
12	14.2	783.2357	637, 491, 329, 314, 299		C ₃₅ H ₄₄ O ₂₀	-0.5	3- <i>O</i> -diramnozo-glukozyd ramnazyny	256, 356
13	14.5	637.1794	329, 314, 299		C ₃₀ H ₃₄ O ₁₆	-3.14	<i>O</i> -ramnozo-glukozyd ramnazyny	250, 355
14	14.8	623.1612	461, 315		C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	0.80	3- <i>O</i> -glukozo-ramnozyd ramnetyny	257, 347
15	15.1	269.0457	227, 225, 151		C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-0.74	apigenina	267, 337
16	15.2	285.0414	257, 151		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-3.16	kenferol	266, 354
17	16.7	315.0509	300, 272, 244, 165, 121		C ₁₆ H ₁₂ O ₇	0.32	ramnetyna	256, 371
18	18.0	299.0563	284, 271, 256, 243, 228		C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-0.67	ramnocytryna	266, 367
19	18.2	329.0667	314, 301, 299, 286, 271, 258		C ₁₇ H ₁₄ O ₇	0.00	ramnazyna	256, 371
20	20.1	-	241, 225, 197		C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-	emodyna	252, 286
21	12.9	447.0928	285, 225, 151		C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.89	<i>O</i> -glukozyd luteoliny	268, 342
22	15.4	299.0568	284, 256, 243, 227, 199, 151		C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-2.34	chryzoeriol	267, 348



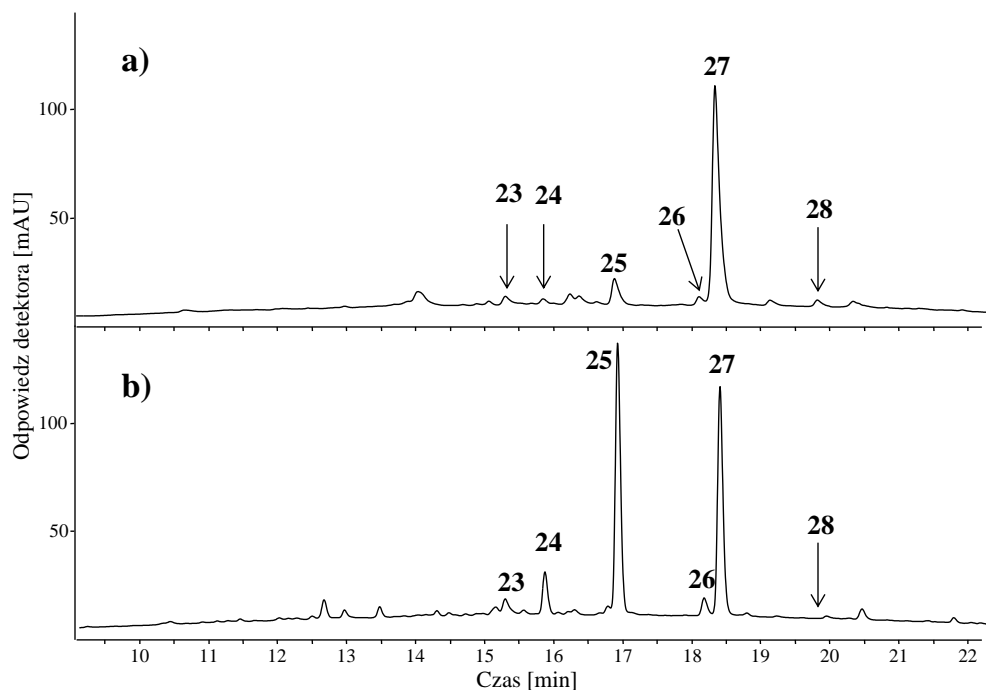
Farba Still de Grain

Farba z handlową nazwą *Still de Grain* na etykiecie tubki posiada zbliżony skład substancji barwiących do farb *Laque de Robert 5* i *Laque de Robert 6* (Rys. 36 c). W jej ekstrakcie oprócz związków oznaczonych numeracją od **1** do **20** (Tab. 7) wykryto dwie dodatkowe substancje **21** i **22**. Związek **21** eluował z kolumny chromatograficznej w czasie 12.9 min. W jego widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 447 oraz dwa główne jony fragmentacyjne o wartościach m/z 285 i 151. Pierwszy z nich tworzy się w wyniku utraty cząsteczki glukozy, drugi ($^{1,3}A^+$) powstaje z kolei w wyniku reakcji RDA w obrębie pierścienia aglikonu. Związek **21** zidentyfikowany został jako O-glukozyd luteoliny, niestety nie da się ustalić miejsca podstawienia cząsteczki cukru. Pik **22** o małej intensywności ma widmo mas z jonem pseudocząsteczkowym m/z 299 i jonami fragmentacyjnymi o wartościach m/z: 284 $[M-H-CH_3]^+$, 271 $[M-H-CO]^+$ oraz 256 $[M-H-CO-CH_3]^+$. Na podstawie danych spektrochromatograficznych związek ten zidentyfikowany został jako chryzoeriol.

Wykryte substancje barwiące świadczą, że do produkcji farby *Still de Grain* użyto dwóch surowców barwierskich, jagody perskiej oraz rezedy żółtawej.

Farba Laque de Garance

W czerwonej farbie *Laque de Garance* zidentyfikowanych zostało sześć substancji barwiących. Związki te oznaczono na spektrochromatogramie numerami od **23** do **28** (Rys.38 a) i wymieniono w Tabeli 8. Otrzymane wyniki zostały dodatkowo porównane z danymi uzyskanymi dla ekstraktu z marzanny barwierskiej.



Rysunek 38. Spektrochromatogramy ekstraktów a) farby *Laque de Garance* oraz b) marzanny barwierskiej [125].

Alizaryna i purpuryna są głównymi substancjami barwiącymi większości gatunków marzanny barwierskiej należącej do rodziny *Rubia*. Na widmach mas wykrytych substancji barwiących widoczne są sygnały pochodzące od jonów tworzących się w typowych dla antrachinonów reakcjach fragmentacji polegających na odszczepieniu cząsteczek tlenku węgla oraz dwutlenku węgla. Pik oznaczony numerem **27** ma największą intensywność i stanowi główny składnik analizowanej próbki. W jego widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 255 oraz jego jony fragmentacyjne o wartościach m/z : 227 $[M-H-CO]^-$ oraz 183 $[M-H-CO-CO_2]^-$. Substancja ta zidentyfikowana została jako purpuryna. W analizowanej próbce wykryte zostały także trzy związki **23**, **25** i **26** o takich samych masach cząsteczkowych 240 Da. Substancje te mają bardzo podobne widma mas. Eluują one jednak z kolumny o różnych czasach retencji, a ich widma UV-Vis różnią się nieznacznie. W widmie mas związku **23** widoczne są sygnały jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z : 211 $[M-H-CO]^-$, 195 $[M-H-CO_2]^-$, 183 $[M-H-2CO]^-$ oraz 167 $[M-H-CO_2-CO]^-$. Jony fragmentacyjne m/z 211 i 167 obecne są również w widmach mas związków **25** i **26**. Zidentyfikowane one zostały jako alizaryna (**25**) oraz jej izomery konstytucyjne **23**, **26**. Identyfikacja alizaryny możliwa była dzięki porównaniu jej czasu retencji (16.8 min.) i widma mas z danymi uzyskanymi dla jej syntetycznego odpowiednika. Związki **23** i **26** wmywane były z kolumny w czasach 15.2 i 18.1 minut. Różnice retencji tych substancji spowodowane są ich różną hydrofobowością wynikającą z odmiennego położenia grup hydroksylowych w cząsteczce. Alizaryna posiada grupy hydroksylowe w pozycji *orto*, podczas gdy w izomerze **26** ułożone są one względem siebie

w pozycji *meta*, co czyni ją bardziej hydrofobową. Na tej podstawie związek **26** zidentyfikowany został jako ksantopurpuryna [127]. Z kolei substancja **23** eluująca najszybciej zidentyfikowana została jako hystazaryna [128]. Związek **24** obecny jest w próbce w niewielkiej ilości. W jego widmie mas, podobnie jak w widmie mas purpuryny, widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 255 oraz jony fragmentacyjne m/z 227 i m/z 183. Substancja ta ma jednak odmienne widmo UV-Vis oraz krótszy czas retencji. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z odmiennego położenia trzech grup hydroksylowych w cząsteczce w porównaniu do purpuryny. Związek **24** obecny jest również w próbce ekstraktu marzanny barwierskiej. Został on zidentyfikowany jako 1,2,3-trihydroksyantrachinon (z *ang.* *anthragallol*). Substancja **28** eluująca z kolumny chromatograficznej jako ostatnia ma widmo mas, na którym widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 253 wraz z jonami fragmentacyjnymi o wartościach m/z: 225 [M-H-CO]⁻, 211 [M-H-C₂H₂O]⁻, 197 [M-H-2CO]⁻. Związkiem tym jest rubiadyna.

Tabela 8. Substancje barwiące obecne w czerwonej farbie *Laque de Garance*.

Pik	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Jony fragmentacyjne (m/z)	Wzór sumaryczny	Błąd (ppm)	Nazwa związku	λ _{max} (nm)
23	15.2	239.0352	211, 195, 183, 167	C ₁₄ H ₈ O ₄	-0.91	hystazaryna	282, 413
24	15.9	255.0295	227, 183	C ₁₄ H ₈ O ₅	1.57	antragallol	279, 405
25	16.8	239.0348	211, 167	C ₁₄ H ₈ O ₄	-0.84	alizaryna	280, 427
26	18.1	239.0342	211, 195, 167	C ₁₄ H ₈ O ₄	-3.35	ksantopurpuryna	251, 422
27	18.3	255.0296	227, 183	C ₁₄ H ₈ O ₅	-1.18	purpuryna	255, 480
28	19.8	253.0503	225, 211, 197	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	-1.18	rubiadyna	244, 409

Substancje barwiące wykryte w tym ekstrakcie świadczą o użyciu marzanny barwierskiej do wytworzenia farby *Laque de Garance*.

7.2.2. Farby pochodzące z palet malarskich

Palety Jana Matejki

Analizie spektrochromatograficznej poddano próbki farb pobranych z palet należących do Jana Matejki. Te XIX-wieczne palety wykonane zostały z drewna orzechowego i mają wymiary 45x33 cm. Naniesione na nie farby ułożone są przeważnie stożkowo od kolorów jasnych ku ciemnym (Rys. 39).



Rysunek 39. Zdjęcia palet malarskich z pracowni Jana Matejki: a) paleta 2, b) paleta 3 i c) paleta 5 (zdjęcie M. Wachowiak).

Próbki farb, które zawierają przypuszczalnie organiczne substancje barwiące oznaczone zostały przez konserwatorów symbolami określającymi numer palety (P) oraz numerami wskazującymi punkt ich pobrania. Zidentyfikowane na podstawie analizy HPLC-DAD-MS substancje barwiące oraz źródło ich pochodzenia (surowiec barwierski) zebrane zostały w Tabeli 9.

Tabela 9. Wyniki analiz HPLC-DAD-MS próbek farb pobranych z palet malarskich Jana Matejki.

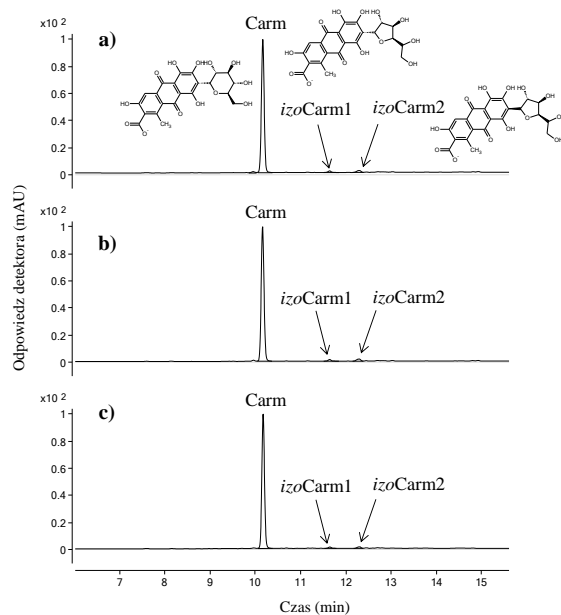
Oznaczenie próbki	Substancja barwiąca	[M-H] ⁻ i jony fragmentacyjne m/z	Surowiec barwierski	
P2-16	kwasy euksantynowy metylowany kwas euksantynowy	403 (227) 417 (227)	zółcień indyjska	
P2-22	kwasy euksantynowy glikozyd alizaryny i lucydyny	403 (227) 563,533 (269, 239)	zółcień indyjska	
P2-36	hystazaryna alizaryna purpuryna nordamnakantal	239 (211, 195) 239 (211, 193) 255 (227, 199) 267 (239, 211)	marzanna barwierska	
P2-37	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd kwercetyny	755 (609, 463, 301)	jagoda perska	
	<i>O</i> -ramnozo-glukozyd kwercetyny	609 (301)		
	<i>O</i> -ramnozyd kwercetyny	447 (301)		
	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd ramnetyny	769 (315)		
	<i>O</i> -ramnozo-glukuronid kwercetyny	623 (447, 315, 301)		301
	kwercetyna	(285, 173, 151)		
	kemferol	285		
ramnetyna	315 (300, 287, 272)			
P2-42	brak barwników organicznych	-	-	
P3-17	hystazaryna	239 (211, 195)	marzanna barwierska	
	ksantopurpuryna	239 (211, 195)		
	alizaryna	239 (211, 183)		
	purpuryna	255 (227, 211)		

Tabela 9. cd.

P3-20 P3-24 P2-25 P2-28	brak barwników organicznych	-	-
P5-4	kwasy euksantynowe metylowany kwas euksantynowy euksanton	403 (227) 417 (227) 227(199, 171)	zółcień indyjska
P5-8	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd kwercetyny <i>O</i> -ramnozo-glukozyd kwercetyny <i>O</i> -ramnozyd kwercetyny <i>O</i> -diramnozo-glukozyd ramnetyny <i>O</i> -ramnozo-glukuronid kwercetyny kwercetyna kemferol ramnetyna	755 (609, 463, 301) 609 (301) 447 (301) 769 (315) 623 (447, 315, 301) 301 (285, 173, 151) 285 315 (300, 287, 272)	jagoda perska
P5-11	<i>O</i> -diramnozo-glukozyd kwercetyny <i>O</i> -ramnozo-glukozyd kwercetyny <i>O</i> -ramnozyd kwercetyny <i>O</i> -diramnozo-glukozyd ramnetyny <i>O</i> -ramnozo-glukuronid kwercetyny kwercetyna kemferol ramnetyna kwasy euksantynowe	755 (609, 463, 301) 609 (301) 447 (301) 769 (315) 623 (447, 315, 301) 301 (285, 173, 151) 285 315 (300, 287, 272) 403 (227,199)	jagoda perska zółcień indyjska
P5-19 P5-20 P5-21	kwasy euksantynowe metylowany kwas euksantynowy euksanton	403 (227,199) 417 (227) 227 (199,171)	zółcień indyjska
P5-25	glukozyd lucydyny i alizaryny hystazaryna alizaryna purpuryna nordamnakantal	563, 533 (269, 239) 239 (211, 195) 239 (211, 171) 255 (227, 183) 267 (239, 211,195)	marzanna barwierska

Paleta Leona Wyczółkowskiego

Analizie poddane zostały dwie próbki czerwonych farb oznaczone przez konserwatorów numerami 6 i 16. Profile chromatograficzne ekstraktów obu farb są niemal identyczne i wskazują na obecność trzech substancji barwiących oznaczonych symbolami **Carm**, **izoCarm1** oraz **izoCarm2** (Rys. 40).



Rysunek 40. Spektrochromatogramy ekstraktów a) próbki farby 16, b) próbki farby 6, c) ekstraktu z koszenili.

W widmie mas związku **Carm** będącego głównym składnikiem ekstraktu widoczne są dwa intensywne sygnały o wartościach m/z 491 i 447. Jon m/z 491 odpowiada deprotonowanej cząsteczce kwasu karminowego, z kolei jon m/z 447 tworzy się po utracie dwutlenku węgla $[M-H-CO_2]^-$. W widmie mas widoczny jest również sygnał o wartości m/z 983 pochodzący od dimeru kwasu karminowego $[2M-H]^-$. Sygnały m/z 357, 327, 299 mają wartość niższą od jonu m/z 447 $[M-H-CO_2]^-$ odpowiednio o 90 Da ($C_3H_6O_3$), 120 Da ($C_4H_8O_4$), i 148 Da ($C_5H_8O_5$). Wskazuje to na fragmentację w obrębie cząsteczki glukozy prowadzącej do utworzenia jonów $[^{0,3}X-H-CO_2]^-$, $[^{0,2}X-H-CO_2]^-$, $[^{0,1}X-H-CO_2]^-$. Przedstawiona fragmentacja jest typowa dla C-glukozydów [24]. Dwa pozostałe związki **IzoCarm1** i **IzoCarm2** mają takie same widma mas jak kwas karminowy, eluują jednak w różnych czasach (Tab. 10). Są to najprawdopodobniej izomery kwasu karminowego (7-C- α -D-piranozydu kwasu kermesowego) różniące się jednostkami cukrowymi. Związek **IzoCarm1** to 7-C- α -D-furanozyd kwasu kermesowego, a **IzoCarm2** to 7-C- α -D-piranozyd kwasu kermesowego [127]. Wykryte substancje barwiące świadczą, iż do produkcji obu farb użyto ekstraktu z koszenili.

Tabela 10. Substancje barwiące obecne w próbkach czerwonych farb z palety Leona Wyczółkowskiego.

Pik	t_R (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	Jony fragmentacyjne (m/z)	Wzór sumaryczny	Nazwa związku	λ_{max} (nm)
Carm	10.1	491	447, 357, 327, 299	$C_{22}H_{20}O_{13}$	kwas karminowy	276, 490
IzoCarm1	11.6	491	447, 357, 327, 299	$C_{22}H_{20}O_{13}$	7-C- α -D-furanozyd kwasu kermesowego	276, 490
IzoCarm2	12.3	491	447, 357, 327, 299	$C_{22}H_{20}O_{13}$	7-C- α -D-piranozyd kwasu kermesowego	276, 490

7.2.3. Farby pochodzące z obrazów XIX wiecznych malarzy

Obrazy Józefa Pankiewicza

W próbkach farb pobranych z obrazów Józefa Pankiewicza zidentyfikowano szereg substancji barwiących. W Tabeli 11 wymienione zostały tytuły obrazów oraz zidentyfikowane substancje barwiące wraz z prawdopodobnym źródłem ich pochodzenia oraz jonami pseudocząsteczkowymi i fragmentacyjnymi. Nadmienić należy, iż próbki te pobrane zostały z obrazów w bardzo małych ilościach i dodatkowo oprócz barwników zawierały również spoiwa, werniksy i inne komponenty olejnego malunku, dlatego też identyfikacja barwników była wyjątkowo problematyczna.

Tabela 11. Substancje barwiące obecne w próbkach farb pobranych z obrazów Józefa Pankiewicza.

Obraz	Oznaczenie próbki	Substancja barwiąca	Jon [M-H] ⁻ i jony fragmentacyjne m/z	Surowiec barwierski
Targ na kwiaty przed kościołem św. Magdaleny w Paryżu	baldachim	kwas euksantynowy	403 (227)	żółcień indyjska
		metylowany kwas euksantynowy	417 (227)	
		euksanton	227 (199)	indygo
		indygotyna	262 (261)	
	kwiat 14	kwas karminowy	491 (447)	koszenila
czerwień	kwas karminowy dwa izomery kwasu karminowego	491 (447) 491 (447)	koszenila	
Lato	lato 14-błękit	kwas karminowy	491 (447)	koszenila
Wóz z sianem	wóz 7	kwas karminowy	491 (447)	koszenila

Obraz Marcello Bacciarellego

W próbkach czerwonych farb pobranych z obrazu *Portret Stanisława Augusta Poniatowskiego w stroju koronacyjnym* oznaczonych przez konserwatora numeracją 120/2, 120/5c 120/9a, 1501/1, 1502/3 zidentyfikowany został kwas karminowy. Jego obecność wskazuje na użycie ekstraktu z koszenili do produkcji farb. W próbce 120/5c zidentyfikowana

została także katechina, będąca składnikiem tanin stosowanych w celu przygaszenia barwy [114].

Obrazy Henryka Siemiradzkiego

Rozpoczęty w 2012 roku projekt „Analiza warsztatu Henryka Siemiradzkiego na podstawie dzieł znajdujących się w zbiorach MNK i innych kolekcji” ma na celu rozpoznanie warsztatu malarskiego tego artysty. W ramach współpracy z muzeum przekazane nam zostały próbki pobrane z ośmiu wytypowanych obrazów H. Siemiradzkiego. Podkreślić warto, iż w 1879 roku ofiarowując polskiemu narodowi obraz *Pochodnie Nerona* malarz ten zapoczątkował zbiory Muzeum Narodowego w Krakowie - najstarszego z polskich muzeów [129]. W Tabeli 12 przedstawione zostały wyniki spektrometrycznych analiz próbek farb z tych obrazów.

Tabela 12. Wyniki analizy HPLC-DAD-(ESI-)-MS próbek farb pobranych z obrazów Henryka Siemiradzkiego.

Obraz	Próbka	Substancja barwiąca	Jon [M-H] ⁺ i jony fragmentacyjne m/z	Surowiec barwierski	
Pochodnie Nerona	19 ^a jasna zieleń	ramnozyd kwercetyny	447 (300, 301)	jagoda perska lub dąb barwierski	
		kemferol	285		
		kwercetyna	301		
	20 ciemna zieleń	glukozo-ramnozyd kemferolu ramnozyd kwercetyny ramnozyd kemferolu kwercetyna	593 (285) 447 (300,301) 431 (285) 301	jagoda perska lub dąb barwierski	
		kemferol	285		
		kwas karminowy dwa izomery kwasu karminowego	491 (447) 491 (447)		koszenila
		alizaryna	239 (211)		
	5 czerwień	ksantopurpuryna purpuryna	239 (211) 255 (227)	marzanna barwierska	
	Przysze ofiary Koloseum	żółcień	kwas euksantynowy metylowany kwas euksantynowy euksanton	403 (227, 213, 199) 417 (227, 213, 199) 227 (213, 199, 183, 169)	żółcień indyjska
Półakt kobiety	czerwień	alizaryna purpuryna	239 (211) 255 (227)	marzanna barwierska	

Cyganka	czerwień	kwaskarminowy izomer kwasu karminowego	491 (447) 491 (447)	koszenila
		hystazaryna purpuryna	239 (211) 255 (227)	marzanna barwierska
		kwaseuksantynowy metylowany kwas euksantynowy	403 (227) 417	żółcień indyjska
Chrystus i Samarytanka		kwaseuksantynowy metylowany kwas euksantynowy euksanton	403 (227, 213, 199) 417 (227, 213, 199) 227 (213, 199, 183, 169)	żółcień indyjska
Z wiatykiem	fiolet	hystazaryna purpuryna	239 (211) 255 (227)	marzanna barwierska
U źródła	fiolet	hystazaryna alizaryna purpuryna	239 (211) 239 (211) 255 (227)	marzanna barwierska
Odpoczynek	ciemna zieleń	kwaseuksantynowy metylowany kwas euksantynowy euksanton	403 (227, 213, 199) 417 (227, 213, 199) 227 (213, 199, 183, 169)	żółcień indyjska

Indyjskie XIX-wieczne obrazy

W zbiorach Zakładu Konserwacji i Restauracji Sztuki Nowoczesnej znajdują się dwa indyjskie obrazy nieznanego autorstwa datowane na XIX wiek. Wyniki spektrochromatograficznych analiz próbek farb pobranych z tych obrazów przedstawione zostały w Tabeli 13.

Tabela 13. Substancje barwiące obecne w próbkach farb pobranych z indyjskich obrazów.

Obraz	Oznaczenie próbki	Substancja barwiąca	Jon [M-H] ⁻ i jony fragmentacyjne m/z	Surowiec barwierski
Obraz 1	błękit krawiec	indygotyna indyrubina	262 (261) 261	indygo
	kufer	kwas euksantynowy metylowany kwas euksantynowy euksanton	403 (227) 417 (227) 227 (199)	żółcień indyjska
Obraz 2	szwacze	kwas euksantynowy metylowany kwas euksantynowy euksanton indygotyna	403 (227) 417 (227) 227 (199) 262 (261)	żółcień indyjska indygo

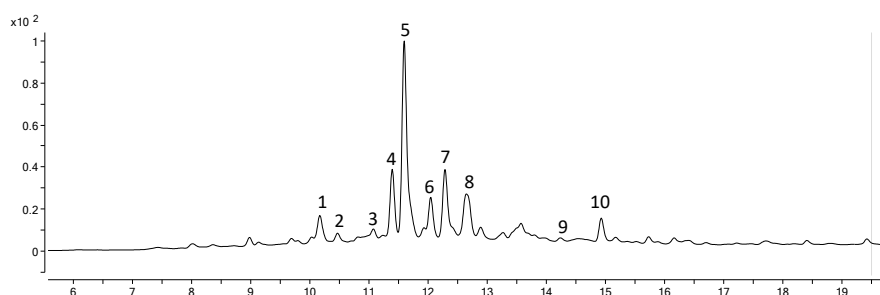
7.3. Substancje barwiących obecne w wybranych surowcach barwierskich

Struktury chemiczne i widma mas wszystkich zidentyfikowanych związków w ekstraktach różnych surowców barwierskich umieszczone zostały w Suplemencie pracy.

7.3.1. Żółcień

Janowiec barwierski

Janowiec barwierski (*Genista tinctoria* L.), podobnie jak rezedza żółtawa, jest surowcem barwierskim bogatym we flawonoidy [26]. W jego ekstrakcie wykryto dziesięć substancji barwiących (Rys.41, Tab. 14).



Rysunek 41. Spektrochromatogram ekstrakstu janowca barwierskiego.

W widmie mas związku **1** obecne są dwa intensywne sygnały o wartościach m/z: 415 [M-H]⁻ oraz 253 [M-H-Glu]⁻. Związek ten zidentyfikowany został jako *O*-glukozyd chryzyny. Widmo mas związku **2** przedstawia charakterystyczną dla *C*-glukozydów fragmentację jonu m/z

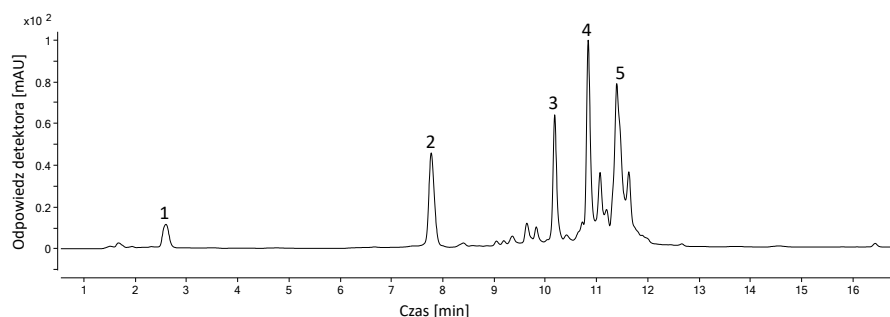
447 [M-H]⁻ prowadzącą do utworzenia jonów potomnych o wartościach m/z: 387 [M-H-C₂H₄O₂]⁻, 357 [M-H-C₃H₆O₃]⁻ oraz 327 [M-H-C₄H₈O₄]⁻. Na ich podstawie związek ten zidentyfikowany został jako C-glukozyd luteoliny. W widmie mas substancji **3** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 431 oraz jony fragmentacyjne m/z 341 [M-H-C₃H₆O₃]⁻, 311 [M-H-C₄H₈O₄]⁻, 269 [M-H-Glu]⁻. Substancja ta to C-glukozyd genisteiny. Związek **4** posiada taką samą masę cząsteczkową co związek **3**, jednakże ma odmienne widmo mas i widmo UV-Vis. Jego jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 431 fragmentuje tworząc jony m/z 311 [M-H-C₄H₈O₄]⁻, 269 [M-H-Glu]⁻. Wykrytą substancją jest O-glukozyd genisteiny, ponieważ w przeciwieństwie do apigeniny ma ona maksimum absorpcji przy długości fali 260 nm. Główną substancją barwiącą obecną w janowcu barwierskim jest związek oznaczony numerem **5**. W jego widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 461 oraz jony fragmentacyjne 443 [M-H₂O]⁻, 371 [M-H-C₃H₆O₃]⁻, 341 [M-H-C₄H₈O₄]⁻, 299 [M-H-Glu]⁻, 284 [M-H-Glu-CH₃]⁻. Na ich podstawie związek ten zidentyfikowany został jako C-glukozyd chryzoeriolu. Kolejnymi zidentyfikowanymi substancjami są luteolina **9** (m/z 285) i genisteina **10** (m/z 269). W ekstrakcie obecne są również substancje oznaczone numerami **6**, **7** i **8**. Jony pseudocząsteczkowe związków **6** i **7** mają identyczną wartość (m/z 503) i są o 42 Da większe od C-glukozydu chryzoeriolu. Na ich widmach mas widoczne są sygnały jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z: 473 [M-2CH₃]⁻, 461 [M-3CH₃]⁻, 443 [M-4CH₃]⁻, 417 [M-3CH₃-CO₂]⁻, 341 [M-H-Glu]⁻. Odejście trzech rodników metylowych świadczy o obecności trzech grup metoksylowych w obrębie tych cząsteczek. Sugeruje to, że wykrytymi substancjami są pochodne glukozydu chryzoeriolu zawierające dwie dodatkowe grupy metylowe. Położenia tych grup nie można jednak ustalić. Z kolei w widmie mas substancji **8** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 545, większy o 84 Da od C-glukozydu chryzoeriolu. Widoczne są również jony fragmentacyjne m/z: 503 [M-3CH₃]⁻, 485 [M-H₂O-3CH₃]⁻ oraz 443 [M-H₂O-6CH₃]⁻. Ten ostatni sugerować może odejście sześciu rodników metylowych, jednakże nie można tego potwierdzić i z tego też względu nie udało się określić struktury chemicznej tego związku.

Tabela 14. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie janowca barwierskiego.

Pik	t _r min	[M-H] ⁻ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	λ _{max} nm	Nazwa substancji
1	10.2	415	253	290, 330	O-glukozyd chryzyny
2	10.5	447	387, 357, 327	260, 330	C-glukozyd luteoliny
3	11.0	431	341, 311, 269	267, 338	C-glukozyd apigeniny
4	11.4	431	863, 311, 269, 133	259	O-glukozyd genisteiny
5	11.6	461	923, 443, 371, 341, 299, 285, 284	267, 348	C-glukozyd chryzoeriolu
6	12.0	503	461, 443, 417, 353, 341, 311	267, 348	pochodne glukozydu chryzoeriolu z trzema dodatkowymi grupami metylowymi
7	12.3	503	485, 461, 443, 371, 341, 298, 269	267, 348	nzyd.
8	12.6	545	503, 485, 443, 353, 323, 269	256, 345	luteolina
9	14.2	285	151, 133	266, 349	genisteina
10	14.9	269	241, 133, 107	260	

Galasówki

Galasówki są źródłem brązowych i czarnych barwników zaprawowych będących zhydrolizowanymi pochodnymi tanin, np. kwas galusowy. W ekstrakcie z tego surowca barwierskiego zidentyfikowanych zostało pięć substancji barwiących, w tym kwas galusowy, trzy taniny powstałe w wyniku polimeryzacji kwasu galusowego i kwas elagowy (Rys.42, Tab. 15).



Rysunek 42. Spektrochromatogram ekstraktu z galasówek.

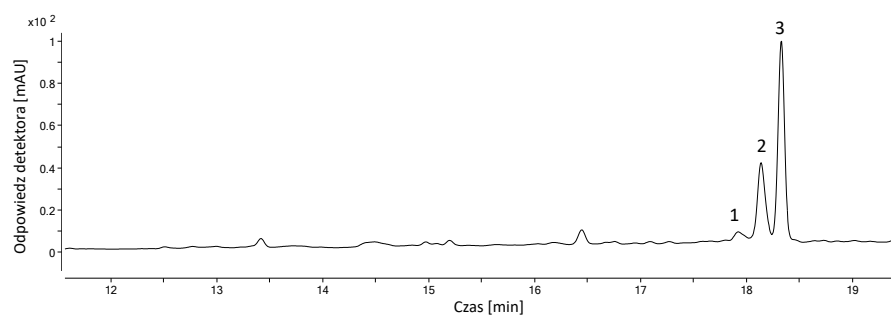
Pierwszy eluujący związek to kwas galusowy. W jego widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 169 wraz z jonami fragmentacyjnymi m/z 125 $[M-H-CO_2]^-$, 107 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$ oraz 79 $[M-H-CO_2-H_2O-CO]^-$. Na widmach mas cząsteczek oznaczonych numerami 2, 3 i 4 widoczne są jony pseudocząsteczkowe o wartościach m/z 321, 787 i 939 (Tab. 15). Powstają one w wyniku rozpadu polimerów kwasu galusowego (G) i opisywane są w literaturze jako jony $[2G-H-H_2O]^-$ (m/z 321), $[M-H-6(G-H_2O)]^-$ (m/z 787) oraz $[M-H-5(G-H_2O)]^-$ (m/z 939) [130]. W ekstrakcie obecny jest również kwas elagowy o jonie pseudocząsteczkowym m/z 301.

Tabela 15. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z galasówek.

Pik	t_r min	[M-H] m/z	Jony fragmentacyjne m/z	λ_{max} nm	Nazwa substancji
1	2.6	169	125, 107, 79	216, 272	kwas galusowy
2	7.8	321	183, 169, 155, 140, 139, 124, 111	216, 272	produkty rozpadu polimerów kwasu galusowego
3	10.2	787	635, 465, 317, 241, 169, 125	218, 278	
4	10.8	939	787, 617, 433, 335, 183, 169, 125	220, 280	kwas elagowy
5	11.4	301	245, 183, 169, 139, 140, 125, 124	275, 365	

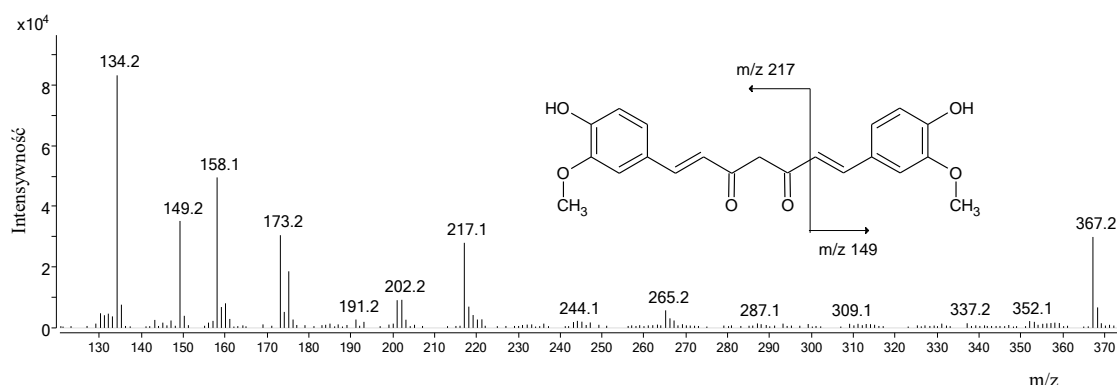
Kurkuma

Kurkuma to barwnik pozyskiwany z ostryżu długiego (*Curcuma longa* L.). W ekstrakcie tego surowca barwierskiego zidentyfikowane zostały trzy substancje barwiące z grupy kurkuminoidów (Tab. 16, Rys. 43).



Rysunek 43. Spektrochromatogram ekstraktu z kurkumy.

Główną substancją barwiącą jest kurkumina I oznaczona na spektrochromatogramie numerem **3**. W jej widmie mas widoczny jest sygnał m/z 217 $[M-H-C_9H_9O_2]^-$ charakterystyczny dla tego typu związków [131]. Jon ten ulega dalszej fragmentacji dając sygnały o wartościach m/z : 202 $[M-H-C_9H_9O_2-CH_3]^-$, 173 $[M-H-C_9H_9O_2-CO_2]^-$, 158 $[M-H-C_9H_9O_2-CH_3-CO_2]^-$. Z kolei jon m/z 149 powstaje w wyniku odszczepienia fragmentu $C_{12}H_{11}O_4$ od jonu macierzystego i ulega on dalszej fragmentacji w wyniku odejścia rodnika metylowego tworząc jon m/z 134. Widmo mas kurkuminy I wraz z zaznaczeniem charakterystycznej ścieżki fragmentacji przedstawione są na Rysunku 44.



Rysunek 44. Widmo mas i struktura chemiczna kurkuminy I.

Związkiem oznaczonym numerem **2** jest kurkumina II, posiadająca w swojej strukturze jedną grupę metoksyową. Substancja ta fragmentuje analogicznie do kurkuminy I dając jony potomne wymienione w Tabeli 16. W ekstrakcie kurkumy obecna jest również kurkumina III (bis-demetoksykurkumina) występująca w najmniejszych ilościach. W jej widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 307 oraz jony fragmentacyjne m/z : 265, 247, 217, 187, 173, 143 i 119.

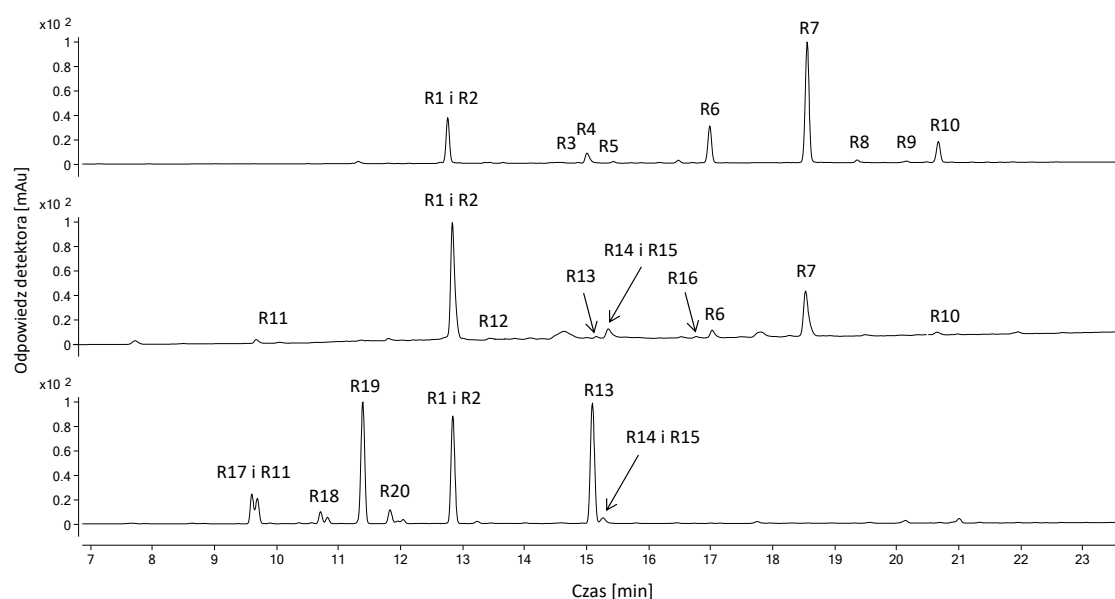
Tabela 16. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z kurkumy.

Pik	t_r min	[M-H] ⁺ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	λ_{max} nm	Nazwa substancji
1	18.0	307	265, 247, 217, 187, 173, 143, 119	260, 420	kurkumina III
2	18.2	337	322, 299, 217, 201, 173, 158, 149, 143, 134, 119	255, 420	kurkumina II
3	18.4	367	352, 337, 265, 217, 202, 173, 158, 149, 143, 134	250, 415	kurkumina I

7.3.2. Czerwienie

Kraplaki

Analizie spektrometrycznej poddane zostały ekstrakty uzyskane z korzeni marzanny barwierskiej (*Rubia tinctoria* L.) oraz marzanki (*Asperula tinctoria* L.) pochodzące z polskich upraw, a także ekstrakty z korzeni marzanny uprawianej w Iranie. Skład substancji barwiących obecnych w ekstraktach z marzanny i marzanki znacząco się różni (Rys. 45).



Rysunek 45. Spektrometryczne chromatogramy ekstraktów z: a) *Rubia tinctoria* L., b) *Rubia tinctoria* L. z upraw irańskich, c) *Asperula tinctoria* L. z upraw polskich.

Marzanna barwierska (*Rubia tinctorum* L.) z upraw polskich

W ekstrakcie z marzanny barwierskiej *Rubia tinctoria* L. zidentyfikowanych zostało ogółem dziesięć substancji barwiących, w tym trzy glikozydy i siedem aglikonów (Tab. 17). Widmo mas pierwszej substancji (Rys. 45a) eluującej w czasie 11.2 min jest dość skomplikowane. Algorytm dekonwolucji chromatogramu wykazał obecność dwóch

koeluujących związków oznaczonych symbolami **R1** i **R2**. W widmie mas składnika pierwszego **R1** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy $[M-H]^-$ o wartości m/z 533, a także jon fragmentacyjny m/z 239, który utworzony został w wyniku oderwania cząsteczki ramnozoksylozydu (294 Da). Związek ten zidentyfikowany został jako prymwerozyd alizaryny. Widmo mas drugiej koeluującej substancji **R2** przedstawia sygnały pochodzące od jonu pseudocząsteczkowego m/z 563 i od jonu fragmentacyjnego m/z 269 (utrata 294 Da). Związek ten zidentyfikowany został jako prymwerozyd lucydny. Na widmie mas związku oznaczonego sygnałem **R3** obecne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 417 oraz dwóch jonów fragmentacyjnych m/z 255 i 227. Pierwszy z nich (m/z 255) powstaje w wyniku oderwania cząsteczki glukozy (-162 Da), drugi natomiast (m/z 227) tworzy się w wyniku dekarbonylacji aglikonu. Związek ten to glukozyd purpuryny. W analizowanej próbce zidentyfikowano trzy związki o takich samych masach cząsteczkowych (**R4**, **R5**, **R6**). Związki te posiadają bardzo podobne widma mas z jonom pseudocząsteczkowym m/z 239 i jonami fragmentacyjnymi m/z : 211 $[M-H-CO]^-$, 195 $[M-H-CO_2]^-$, 183 $[M-H-2CO]^-$ oraz 167 $[M-H-CO_2-CO]^-$, ale różnią się czasami retencji. Substancjami tymi są alizaryna **R6** oraz jej izomery konstytucyjne. Związek **R4** zidentyfikowany został jako hystazaryna, natomiast struktura **R5** nie została jednoznacznie określona. Najwyższy pik (**R7**) na spektrochromatogramie zidentyfikowany został jako purpuryna na podstawie jonu pseudocząsteczkowego m/z 255 i charakterystycznych dla niej jonów fragmentacyjnych. W widmie mas związku **R9** obserwuje się sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 253 oraz sygnały jonów fragmentacyjnych m/z : 225 $[M-H-CO]^-$, 211 $[M-H-C_2H_2O]^-$, 197 $[M-H-2CO]^-$. Substancja ta zidentyfikowana została jako rubiadyna. Ostatnią eluującą substancją barwiącą jest związek **R10**, w którego widmie mas widoczne są reakcje fragmentacji polegające na odejściu cząsteczek CO oraz CO₂ prowadzące do utworzenia jonów o wartościach m/z : 239 $[M-H-CO]^-$, 211 $[M-H-2CO]^-$ i 195 $[M-H-CO_2]^-$. Zidentyfikowanym związkiem jest nordamnakantal.

Tabela 17. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie marzanny barwierskiej z upraw polskich.

Pik	t_r <i>min</i>	$[M-H]^-$ <i>m/z</i>	Jony fragmentacyjne <i>m/z</i>	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
R1	12.9	533	239	254, 418,	prymwerozyd alizaryny
R2	12.9	563	269	254, 418,	prymwerozyd lucydny
R3	14.6	417	255, 227, 226, 211, 195	-	glukozyd purpuryny
R4	15.1	239	211, 195	290, 420	hystazaryna
R5	15.4	239	211, 195	255, 440	izomer alizaryny
R6	16.9	239	211, 183	280, 430	alizaryna
R7	18.6	255	239, 227, 199, 183	255, 480	purpuryna
R8	19.4	265	237, 221, 209, 181	285, 415	nzyd.
R9	20.2	253	225, 211, 197	280, 412	rubiadyna
R10	20.5	267	265, 239, 211, 195	300, 425	nordamnakantal

Marzanna barwierska (Rubia tinctorum L.) z upraw irańskich

Skład substancji barwiących obecnych w ekstrakcie z irańskiej marzanny barwierskiej różni się od marzanny barwierskich pochodzącej z upraw polskich. W obu ekstraktach zidentyfikowano wprawdzie prymwerozyd alizaryny i lucydyny, alizarynę, purpurynę oraz nordamnakantal, jednakże w ekstrakcie marzanny irańskiej wykryto pięć dodatkowych substancji oznaczonych symbolami od **R11** do **R16** (Rys. 45b, Tab. 18). Związek **R11** eluuje jako pierwszy z kolumny chromatograficznej w czasie 9.8 min. W jego widmie mas widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 593 wraz z dwoma jonami fragmentacyjnymi m/z 549 oraz m/z 255. Jon m/z 549 wskazuje na fragmentację tego związku w wyniku odejścia cząsteczki CO₂, co świadczy o obecności grupy karboksylowej (najprawdopodobniej w jednostce cukru). Drugi jon o wartości m/z 255 utworzony został w wyniku jednoczesnej utraty dwutlenku węgla oraz glukozy i kwasu glukuronowego. Na podstawie ścieżki fragmentacji związek ten zidentyfikowany został jako glukozo-glukuronid purpuryny. Masa cząsteczkowa związku **R12** jest większa o 16 Da od masy cząsteczkowej rubiadyny. W widmie mas obserwuje się sygnały jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z 251 i m/z 239, utworzonych w wyniku odejścia cząsteczki wody oraz tlenu węgla. Związek ten zidentyfikowano jako pochodną rubiadyny posiadającą dodatkową grupę hydroksylową. Kolejną wykrytą substancją jest związek oznaczony symbolem **R13**. Ścieżka fragmentacji tego związku jest charakterystyczna dla prymwerozydów antrachinonów. Obserwuje się tu odejście jednostki cukrowej i następnie reakcje fragmentacji aglikonu polegające na odejściu CO z utworzeniem jonów o wartościach m/z 253 (aglikon) oraz m/z 225. Związek ten zidentyfikowany został jako prymwerozyd rubiadyny. W widmie mas związku **R14**, oprócz jonu pseudocząsteczkowego m/z 299, obserwuje się fragmentację poprzez odszczepienie cząsteczki dwutlenku węgla m/z 255 [M-H-44]⁻, a następnie odejście tlenu węgla (m/z 227). Związkiem tym jest pseudopurpuryna. Na widmie mas substancji **R15** widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 283 oraz dwa jony fragmentacyjne m/z 239 [M-H-CO₂]⁻ i 211 [M-H-CO₂-CO]⁻. Substancja ta zidentyfikowana została jako munistyna. W widmie mas związku **R16** obecny jest jon m/z 269 [M-H]⁻ oraz jony fragmentacyjne m/z 251 [M-H-H₂O]⁻ i 239 [M-H-CH₂O]⁻, świadczące że jest to lucydyna.

Tabela 18. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie irańskiej marzanny barwierskiej.

Pik	t_r <i>min</i>	[M-H] ⁺ <i>m/z</i>	Jony fragmentacyjne <i>m/z</i>	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
R11	9.8	593	549, 299, 255	290, 430	prymwerozyd pseudopurpuryny
R1	12.9	533	239	254, 418	prymwerozyd alizaryny
R2	12.9	563	269	254, 418	prymwerozyd lucydyny
R12	13.7	269	251, 239	225, 415	hydroksyrubiadyna
R13	15.2	547	253, 225	270, 408	prymwerozyd rubiadyny
R14	15.4	299	255, 227	287, 492	pseudopurpuryna
R15	15.4	283	239, 211	287, 492	munistyna
R16	16.8	269	251, 239	280, 419	lucydyna
R6	17.0	239	211, 183, 155	280, 430	alizaryna
R7	18.5	255	239, 227, 199, 183	255, 480	purpuryna
R10	20.55	267	265, 239, 211, 195	300, 425	nordamnakantal

Marzanka barwierska (Asperula tinctoria L.) z upraw polskich

W ekstrakcie z marzanki barwierskiej wykrytych zostało dziesięć substancji barwiących. Związki takie jak prymwerozydy lucydyny **R1** i alizaryny **R2**, prymwerozyd pseudopurpuryny **R11**, prymwerozyd rubiadyny **R13**, pseudopurpuryna **R14** oraz munistyna **R15** zostały zidentyfikowane także w ekstraktach z marzanny barwierskiej. Substancje oznaczone na spektrochromatogramie symbolami **R17-R20** obecne są jedynie w ekstrakcie z marzanki barwierskiej (Rys. 45c, Tab. 19). Widmo UV-Vis związku **R17** wykazuje maksima absorpcji przy długościach fali 290 i 360 nm. Wskazywać to może, że jest on flawonoidem. W widmie mas widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego m/z 609 oraz jonów fragmentacyjnych o wartościach m/z 447 [M-H-Glu]⁺ i 315 [M-H-Glu-Ksyl]⁺. Związek ten zidentyfikowany został jako prymwerozyd nieznanego flawonoidu, w którym aglikon ma masę 316 Da. W widmie mas substancji **R18** obecny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 593 wraz z jonami fragmentacyjnymi m/z : 299 [M-H-Glu-Ksyl]⁺ i 269 [M-H-CHO-Glu-Ksyl]⁺. Związek ten fragmentuje analogicznie do wcześniej wykrytych glikozydów antrachinonów i został zidentyfikowany jako prymwerozyd nieznanego aglikonu. Główną substancją barwiącą jest związek oznaczony symbolem **R19**. W jego widmie UV-Vis obserwuje się maksima absorpcji charakterystyczne dla flawonoidów (290 i 355 nm). Jon pseudocząsteczkowy substancji **R19** (m/z 497) fragmentuje z utworzeniem jonów o wartościach m/z 453 [M-H-CO₂]⁺ i 203 [M-H-Glu-Ksyl]⁺. W widmie mas widoczny jest również sygnał m/z 955 pochodzący od jonu dimeru tego związku. Na podstawie danych spektrochromatograficznych przypuszcza się, że substancja ta to prymwerozyd flawonoidu posiadający przypuszczalnie grupę karboksylową. Niestety nie udało się ustalić struktury chemicznej tego związku. Substancja oznaczona na spektrochromatogramie jako **R20** posiada maksimum absorpcji zbliżone do substancji **R17**. W widmie mas **R20** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 315, który fragmentuje tworząc jony o wartościach m/z : 297 [M-H-H₂O]⁺, 282 [M-H-H₂O-CH₃]⁺, 271 [M-H-CO₂]⁺, 254 [M-H-H₂O-CH₃-CO]⁺ i 226 [M-H-H₂O-CH₃-2CO]⁺. Substancją tą jest flawonoid o nieznanym strukturze, który w tym ekstrakcie występuje również w formie prymwerozydu (związek **R17**).

Analiza spektrometryczna ekstraktu z *Asperuli tinctorii* L. nie została jak dotąd opisana w literaturze.

Tabela 19. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z marzanki barwierskiej.

Pik	t_r <i>min</i>	[M-H] ⁺ <i>m/z</i>	Jony fragmentacyjne <i>m/z</i>	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
R17	9.7	609	447, 315	290, 360	prymwerozyd flawonoidu
R11	9.8	593	549, 299, 255	290, 430	prymwerozyd pseudopurpuryny
R18	10.8	593	341, 299, 269,	340, 400	prymwerozyd nieznanego antrachinonu
R19	11.4	497	275, 245, 231, 227, 213, 203, 202, 171, 159	290, 355	nzid.
R20	11.9	315	297, 285, 282, 270, 271, 254, 242, 226	290, 360	nzid.
R1	12.9	533	239	254, 418	prymwerozyd alizaryny
R2	12.9	563	269	254, 418	prymwerozyd lucydyny
R13	15.2	547	253, 225	270, 408	prymwerozyd rubiadyny
R14	15.4	299	255, 227, 183	287, 492	pseudopurpuryna
R15	15.4	283	239, 211	287, 492	munistyna

Kraplaki firmy Kremer

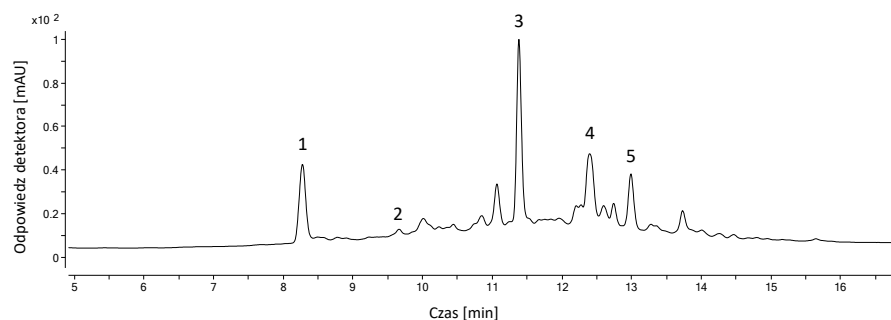
Analizie spektrometrycznej poddane zostały ekstrakty uzyskane z trzech kraplaków: lazuru krapowego, kraplaku żółtawego oraz kraplaku Perego. Ekstrakty te różniły się zarówno barwą, jak i składem. Lazurowy kraplak ma odcień różowo-czerwony i w swym składzie zawiera dziewięć substancji barwiących: prymwerozyd alizaryny i lucydyny, hystazarynę, antragallol, alizarynę, ksantopurpurynę, purpurynę, rubiadynę oraz nordamnakantal (Tab. 20). W czerwono-pomarańczowym ekstrakcie kraplaku żółtawego zidentyfikowano tylko pięć substancji barwiących, w tym: antragallol, alizarynę, ksantopurpurynę, purpurynę oraz nordamnakantal. Nie wykryto natomiast prymwerozydu lucydyny i alizaryny ani hystazaryny. Z kolei w purpurowym ekstrakcie z kraplaku Perego, oprócz związków obecnych w lazurze krapowym, zidentyfikowano również lucydynę.

Tabela 20. Substancje barwiące obecne w ekstraktach z kraplaków firmy Kremer.

Pik	t_r <i>min</i>	[M-H] ⁺ <i>m/z</i>	Jony fragmentacyjne <i>m/z</i>	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
1	12.9	533	239	418, 254	prymwerozyd alizaryny
2	12.9	563	269	418, 254	prymwerozyd lucydyny
3	15.3	239	211, 195	420, 290	hystazaryna
4	15.9	255	239, 227, 211, 199	410, 282	antragallol
5	16.7	269	251, 239, 223, 211, 195	420, 282	lucydyna
6	16.9	239	211, 183, 155	430, 280	alizaryna
7	18.2	239	211, 195	251, 422	ksantopurpuryna
8	18.4	255	239, 227, 199, 183	255, 480	purpuryna
9	19.8	253	225, 211, 197	244, 409	rubiadyna
10	20.5	267	265, 239, 211, 195	425, 300	nordamnakantal

Krokosz barwierski

W ekstrakcie z krokosza barwierskiego zidentyfikowanych zostało pięć substancji barwiących (Rys. 46).



Rysunek 46. Spektrochromatogram ekstraktu z krokosza barwierskiego.

Związki te to C-glukozydy flawonoidów. W Tabeli 21 przedstawione zostały ich dane spektrochromatograficzne oraz nazwy. W widmie mas pierwszej substancji barwiącej oznaczonej numerem **1** widoczny jest sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 611 wraz jonami fragmentacyjnymi m/z 521 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$ i 491 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$, charakterystycznymi dla rozpadu C-glukozydów. Związek ten zidentyfikowany został jako hydroksysafflor A. Pik **2** o mniejszej intensywności to pochodna hydroksysaffloru A uboższa o jedną cząsteczkę glukozy. Potwierdza to jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 449. Kolejnym zidentyfikowanym związkiem jest safflor A oznaczony na spektrochromatogramie numerem **4**. Jest to również pochodna hydroksysaffloru A. W widmie mas tego związku widoczne są sygnały pochodzące od jonu pseudocząsteczkowego o wartości m/z 593 oraz jony fragmentacyjne m/z : 575 $[M-H-H_2O]$, 447 $[M-H-Rha]$ i 431 $[M-H-Glu]$. Główną substancją barwiącą w analizowanym ekstrakcie jest związek **3**. Jego masa cząsteczkowa jest większa o 162 Da od saffloru A, co świadczy o obecności dodatkowej cząsteczki glukozy. W widmie mas tego związku obserwuje się jon pseudocząsteczkowy m/z 755 oraz jony fragmentacyjne m/z : 673, 611, 593, 447, 285. Ostatnią substancją barwiącą wykrytą w ekstrakcie z krokosza barwierskiego jest prekartamina (**5**) o masie cząsteczkowej 956 Da.

Tabela 21. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z krokosza barwierskiego.

Pik	t_r <i>min</i>	$[M-H]$ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
1	8.27	611	521, 491, 437, 293	224, 402	hydroksysafflor A
2	9.57	449	419, 359, 338, 329, 299	297, 400	hydroksysafflor A - Glu
3	11.4	755	673, 611, 593, 447, 285	415	safflor A + Glu
4	12.4	593	575, 447, 431	412	safflor A
5	12.9	955	977, 613, 487, 447, 175	290, 420	prekartamina

Koszenila

W ekstrakcie z koszenili oprócz kwasu karminowego **1** i jego dwóch izomerów (**4**, **5**) opisanych już w rozdziale 7.2.2. niniejszej dysertacji wykryto trzy dodatkowe substancje barwiące oznaczone numerami **2**, **3** i **6**. Substancje te obecne są w ekstrakcie w niewielkich

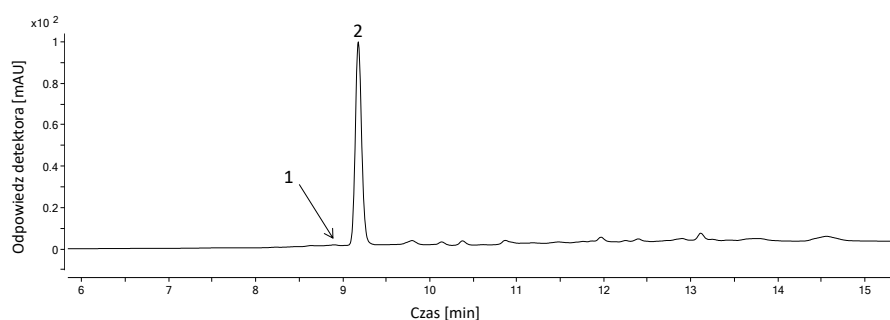
ilościach. Związek **2** o jonie pseudocząsteczkowym m/z 490 ulega fragmentacji tworząc główny jon potomny m/z 446 $[M-H-CO_2]^-$. Związek ten ma masę cząsteczkową mniejszą jedynie o 1 Da od kwasu karminowego, co wskazywać może, że jest to kwas 5-aminokermesowy [127]. Z kolei związek **3** (m/z 475) ma masę mniejszą o 16 Da od kwasu karminowego. Ulega on reakcji fragmentacji w wyniku odejścia cząsteczki dwutlenku węgla dając jon potomny o wartości m/z 431. Związek ten zidentyfikowany został jako glikozyd kwasu flawokermesowego. Ostatnim wykrytym w ekstrakcie związkiem jest substancja **6** o masie deprotonowanej cząsteczki 313 Da. Ulega ona fragmentacji w wyniku utraty kolejno cząsteczek CO , CO_2 i CO tworząc odpowiednio jony o wartościach m/z 285, 269 i 241. Związek ten zidentyfikowany został jako kwas flawokermesowy.

Tabela 22. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie koszenili.

Pik	t_r min	$[M-H]^-$ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	λ_{max} nm	Nazwa substancji
1	10.1	491	983, 473, 447, 429, 357, 327, 299, 285	276, 490	kwas karminowy
2	11.2	490	446	-	kwas 5-aminokermesowy
3	11.5	475	431	-	glikozyd kwasu flawokermesowego
4	11.6	491	473, 455, 447, 429, 380, 357, 327, 299, 270, 255	276, 490	7-C- α -D-furanozyd kwasu kermesowego
5	12.2	491	473, 455, 429, 413, 393, 371, 357, 339, 327, 299, 285, 270, 255	276, 490	7-C- α -D-piranozyd kwasu kermesowego
6	14.4	313	285, 269, 241	-	kwas flawokermesowy

Drzewo brazylijskie (*brazilwood*)

Główną substancją barwiącą obecną w ekstrakcie z drzewa brazylijskiego jest protosappanina B (z *ang.* protosappanin B) oznaczona na spektrochromatogramie numerem **2** (Rys.47, Tab.23).



Rysunek 47. Spektrochromatogram ekstraktu brazilwood.

W widmie jej mas obserwuje się intensywny sygnał jonu pseudocząsteczkowego m/z 303 wraz jonami fragmentacyjnymi m/z 273 i 229. W ekstrakcie występują również śladowe ilości brazyleiny **1** o masie cząsteczkowej 284 Da.

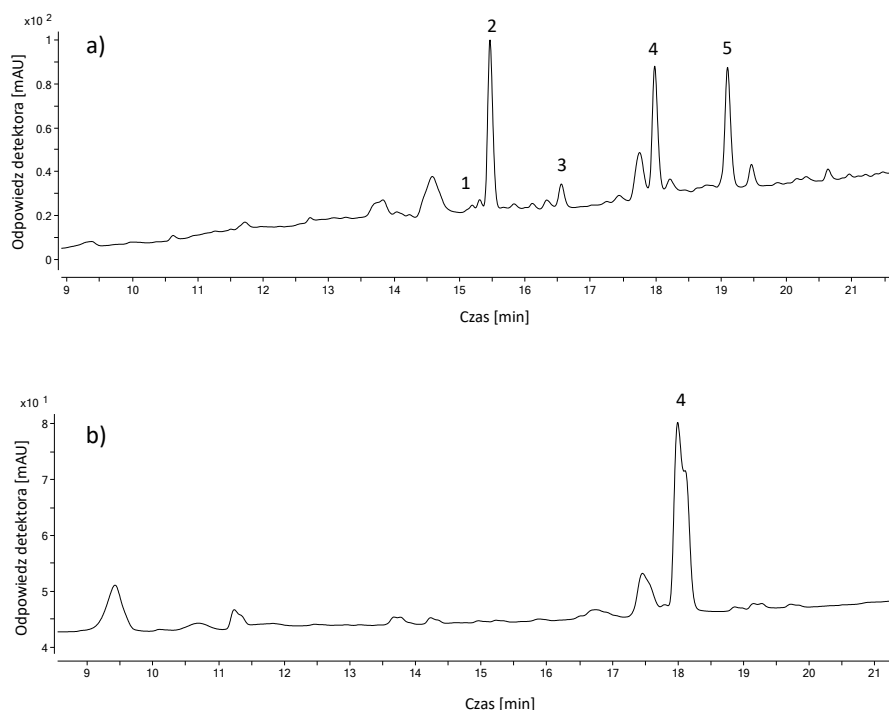
Tabela 23. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z drzewa brazylijskiego.

Pik	t_r mn	[M-H] m/z	Jony fragmentacyjne m/z	λ_{max} nm	Nazwa substancji
1	8.9	283	271, 255, 229, 211	290, 440	brazyleina
2	9.3	303	273, 229	287, 255	protosappanina B

7.3.3. Błękity

Indygo

Naturalne indygo uzyskać można z urzetu barwierskiego (indygo europejskie) oraz indygowca barwierskiego (indygo indyjskie). W zależności od gatunku rośliny, z której jest ono wytwarzane, ekstrakt różni się składem substancji barwiących (Rys. 48a i b).



Rysunek 48. Spektrochromatogramy ekstraktów: a) urzetu barwierskiego, b) indygowca barwierskiego.

Umożliwia to rozróżnianie tych surowców barwierskich. Odmiana indyjska zawiera w swoim składzie indygotynę **4** oraz śladowe ilości indyrubiny **5**. Indygo europejskie jest natomiast bogatszym źródłem barwników organicznych. W ekstrakcie obecne są nie tylko indygotyna i indyrubina, ale również apigenina **1** oraz chryzoeriol **2**. Problem w określeniu źródła pochodzenia indygo pojawia się w trakcie identyfikacji barwników w próbkach o odcieniu zielonym. Kolor ten uzyskiwano najczęściej w wyniku mieszania indygo z rezedą żółtawą, a ta ostatnia zawiera w swoim składzie również apigeninę i chryzoeriol. Z tego więc względu ciężko jest stwierdzić, która z roślin jest źródłem pochodzenia tych związków. Widma

mas indygotyny oraz indyrubiny są praktycznie identyczne. Obecne są w nich jony pseudocząsteczkowe o wartości m/z 261 oraz fragmentacyjne o wartościach m/z 233 [M-H-CO]⁻, 217 [M-H-CO₂]⁻, 175 [M-H-CO-C₂H₂O]⁻, 146 [Iza-H]⁻ (jon izatyny), 131 [Iza-H-NH]⁻ (Tab. 24).

Tabela 24. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z urzetu barwierskiego.

Pik	t_r <i>min</i>	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	Jony fragmentacyjne <i>m/z</i>	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
1	15.2	269	225, 151, 117	267, 337	apigenina
2	15,5	299	284, 256	266, 347	chryzoeriol
3	16.6	259	231, 175	490, 390	nzin.
4	18.0	261	233, 217, 175, 162, 146, 131	619, 286	indygotyna
5	19.1	261	233, 217, 175, 162, 146, 131	540, 289	indyrubina

Kampesz

Kolor niebieski można uzyskać również z drewna kampszowego *Hamatoxylon campechianum* L. Są to drzewa rosnące na Jamajce i w Hondurasie. Kampesz w Europie zaczęto stosować w barwiarstwie już na początku XV w. Z ekstraktu rdzenia pnia tej rośliny uzyskać można szeroki wachlarz barw. Przykładowo, z ałunem potasowo-glinowym daje on barwę fioletową lub granatową, z solami żelaza szarości i czernie, a z solami cyny odcienie zbliżone do purpury [59].

W ekstrakcie kampszu obecne są dwie substancje barwiące. W widmie mas związku 1 widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 299 wraz z jonami fragmentacyjnymi o wartościach m/z : 281 [M-H-H₂O]⁻, 271 [M-H-CO]⁻, 253 [M-H-CO-H₂O]⁻ oraz 225 [M-H-2CO-H₂O]⁻ i 173. Związek ten zidentyfikowany został jako hemateina. Kolejną eluującą substancją jest hematoksyлина. W widmie jej mas obserwuje się jon pseudocząsteczkowy m/z 301 oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z : 283 [M-H-H₂O]⁻, 259 [M-H-C₂H₂O]⁻ i 179. Identyfikacja hematoksyliny potwierdzona została na podstawie danych spektrometrii mas syntetycznego wzorca.

Tabela 25. Substancje barwiące obecne w ekstrakcie z kampszu.

Pik	t_r <i>min</i>	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	Jony fragmentacyjne <i>m/z</i>	λ_{max} <i>nm</i>	Nazwa substancji
1	3.5	299	281, 271, 253, 225, 173	285, 440	hemateina
2	5.8	301	299, 283, 271, 259, 179, 137	290	hematoksyлина

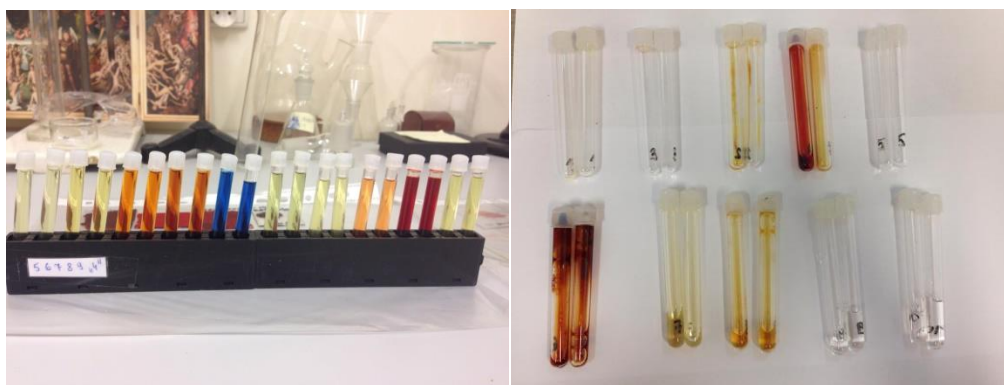
8. Fotodegradacja barwników

W celu zbadania procesów fotodegradacji naturalnych barwników organicznych przeprowadzone zostały badania starzeniowe zarówno roztworów barwników, jak i farb modelowych wykonanych według historycznych przepisów. Badania przeprowadzono w komorze wyposażonej w lampę ksenonową emitującą promieniowanie pokrywające się z zakresem promieniowania słonecznego. Parametry pracy aparatu opisane są w części III.3 niniejszej dysertacji. Próbkę ekstraktów z rezedy żółtawej, lac dye, kraplaku, koszenili i purpuryny pobierane były po 48, 96 i 168 godzinach. Ekstrakty z drzewa brazylijskiego, jagody francuskiej oraz kwercetyny pobierane były co godzinę, natomiast ekstrakt z indygo pobierano co 10 minut przez godzinę. Próbkę farb pobierano z kolei po 168 i 332 godzinach. Ekstrakty barwników wykorzystane w badaniach fotodegradacji wykonane zostały według poniżej opisanych procedur:

- Wzorce purpuryny oraz kwercetyny (5 mg) rozpuszczono w 20 mL mieszaniny zawierającej H₂O/ACN/DMSO (1:1:0.5, v/v/v) i poddano naświetlaniu.
- Zhomogenizowany surowce barwierskie (10 gr) umieszczono w kolbie okrągłodennej, zawieszono w mieszaninie H₂O/ACN (100 mL) i ogrzewano przez 1 h w temperaturze 60°C. Ostudzoną zawiesinę zdekantowano, a następnie poddano naświetlaniu. W przypadku indygo, surowiec zawieszono w 20 mL DMSO, poddano działaniu fal ultradźwiękowych przez 5 minut i poddano naświetlaniu.

8.1. Identyfikacja produktów fotodegradacji barwników w ekstraktach surowców barwierskich

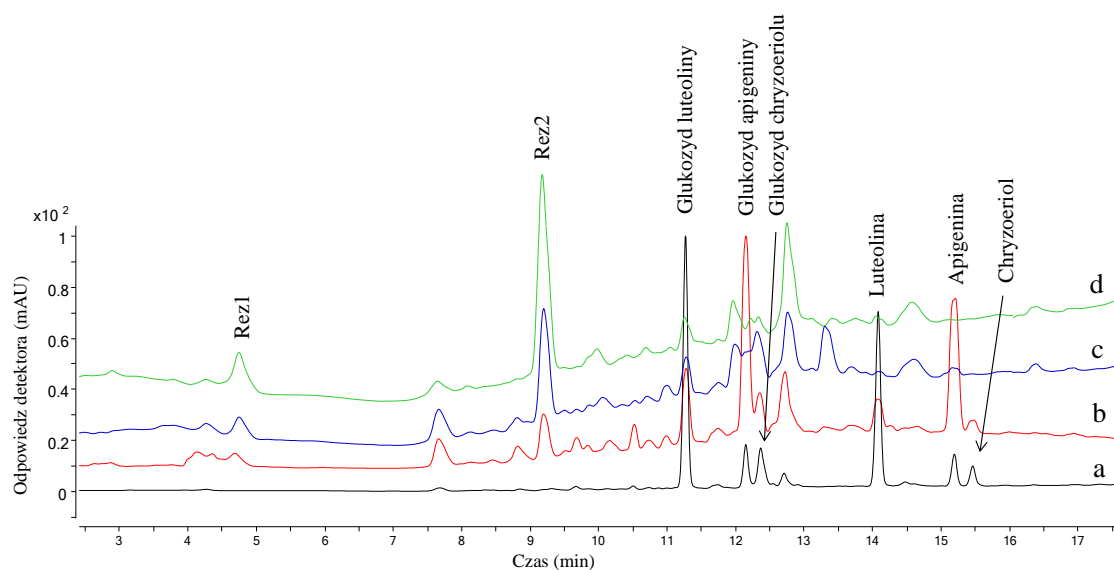
Badaniom poddane zostały ekstrakty z rezedy żółtawej, kraplaku, lac dye, koszenili, jagody francuskiej, drzewa brazylijskiego i indygo oraz roztwory syntetycznej kwercetyny i purpuryny (Rys. 49). W celu identyfikacji produktów fotodegradacji w pierwszej kolejności przeprowadzono analizę spektrometrii mas w trybie przemieszczenia całego widma mas. Pozwoliło to na określenie przybliżonych mas tworzących się związków. Z kolei analizy QTOF oraz MS/MS, dzięki znajomości dokładnych mas monoizotopowych i jonów fragmentacyjnych, umożliwiły ich identyfikację. Wykrytym produktom fotodegradacji przypisane zostały odpowiednie symbole wraz z liczbą porządkową odpowiadającą kolejności ich retencji.



Rysunek 49. Zdjęcia ekstraktów surowców barwierskich a) przed naświetlaniem i b) po naświetlaniu.

Produkty fotodegradacji w ekstrakcie z rezedy żółtawej

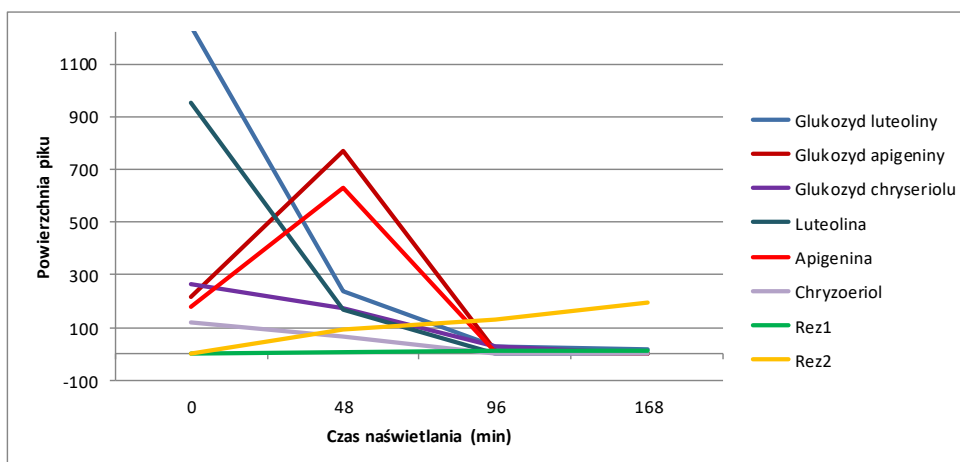
Próbki ekstraktów z rezedy żółtawej pobierano z fotoreaktora odpowiednio po 48, 96 i 168 godzinach naświetlania. Zmiany zachodzące w roztworze w trakcie naświetlania zostały przedstawione na poniższych spektrochromatogramach (Rys. 50).



Rysunek 50. Spektrochromatogramy ekstraktów z rezedy żółtawej: a) bez naświetlania oraz naświetlanych przez: b) 48 h, c) 96 h, d) 168 h. (**Rez1** i **Rez2** - produkty fotodegradacji).

Ilość chryzoeriolu i jego glukozydu sukcesywnie malała wraz z długością naświetlania próbki, a po upływie 168 godzin zaobserwowano całkowity ich zanik (Rys. 51). Degradacji ulegała też luteolina i jej glukozyd, choć okazały się one bardziej fotostabilne i można je było wykryć jeszcze po 168 godzinach ekspozycji na promieniowanie. W przypadku apigeniny i jej glukozydu po 48 godzinach naświetlania zaobserwowano ponad trzykrotny wzrost pola powierzchni ich pików chromatograficznych. Powodem tego zjawiska jest najprawdopodobniej proces polegający na oderwaniu jednej grupy hydroksylowej z cząsteczki luteoliny i jej

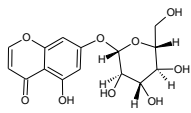
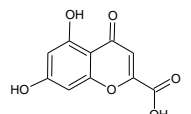
glukozydu, prowadzący do utworzenia produktów o masie identycznej z masą apigeniny i jej glukozydu. Po upływie 96 godzin naświetlania zaobserwowano spadek stężenia tych związków, a po 168 godzinach nie były już one wykrywalne. W wyniku ekspozycji na promieniowanie po 48 godzinach pojawiły się w ekstrakcie dwie nowe substancje oznaczone symbolami **Rez1** i **Rez2**. Ich stężenie wraz ze wzrostem długości naświetlania sukcesywnie rosło.



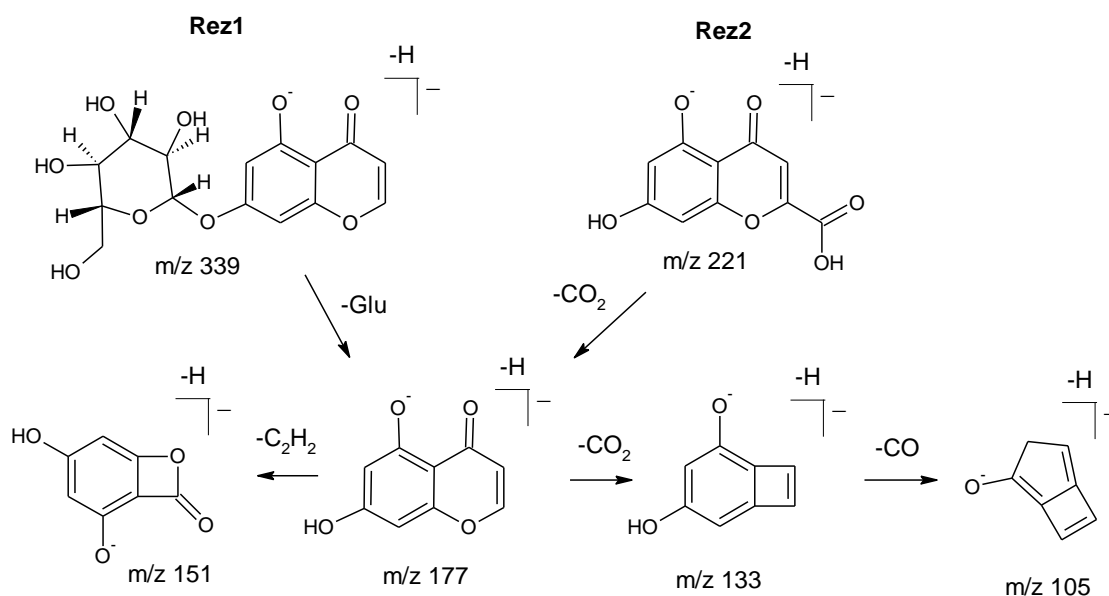
Rysunek 51. Wpływ czasu naświetlania ekstraktu z rezedy żółtawej na stężenie substancji barwiących i ich produktów degradacji.

W widmie mas związku oznaczonego symbolem **Rez1** obserwuje się jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 339 oraz jony fragmentacyjne m/z : 177, 151, 133, 105. Najbardziej intensywny sygnał m/z 177 tworzy się w wyniku oderwania cząsteczki glukozy (utrata 162 Da). Dalsza fragmentacja, podobnie jak w przypadku luteoliny, przebiega poprzez przegrupowanie *retro* Dielsa-Aldera i prowadzi do powstania jonów: $^{1,3}B^-$ m/z 133 oraz $^{1,3}A^-$ m/z 151. Związek **Rez1** tworzy się przypuszczalnie w wyniku odejścia pierścienia B flawonoidu od glukozydu luteoliny. W widmie mas związku **Rez2** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 221 oraz jon fragmentacyjny m/z 177 powstały w wyniku odszczepienia cząsteczki dwutlenku węgla $[M-H-CO_2]^-$. Wysoka intensywność sygnału m/z 177 świadczy najprawdopodobniej o obecności grupy karboksylowej. Dalsze reakcje fragmentacji następują w wyniku przegrupowania *retro* Dielsa-Aldera dając jony $^{1,3}B^-$ m/z 133 oraz $^{1,3}A^-$ m/z 151.

Tabela 26. Dane spektrochromatograficzne produktów fotodegradacji zidentyfikowanych w ekstrakcie z rezedy żółtawej.

Pik	t_R min	[M-H] ⁻ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	Masa monoizotopowa Da	Błąd ppm	Wzór sumaryczny i strukturalny
Rez1	4.7	339	177 [M-H-Glu] ⁻ 151 ^{1,3} A ⁻ 133 ^{1,3} B ⁻ 105 [M-H-Glu-CO ₂ -CO] ⁻	339.0720	0.29	C ₁₅ H ₁₅ O ₉ 
Rez2	9.2	221	177 [M-H-CO ₂] ⁻ 151 ^{1,3} A ⁻ 133 ^{1,3} B ⁻ 105 [M-H-2CO ₂ -CO] ⁻	221.0086	2.26	C ₁₀ H ₅ O ₆ 

Zaproponowane struktury chemiczne związków **Rez1** i **Rez2** powstałych podczas naświetlania wraz z danymi, na podstawie których dokonano identyfikacji zestawiono w Tabeli 26. Na Rysunku 52 przedstawione zostały prawdopodobne ścieżki fragmentacji tych związków.

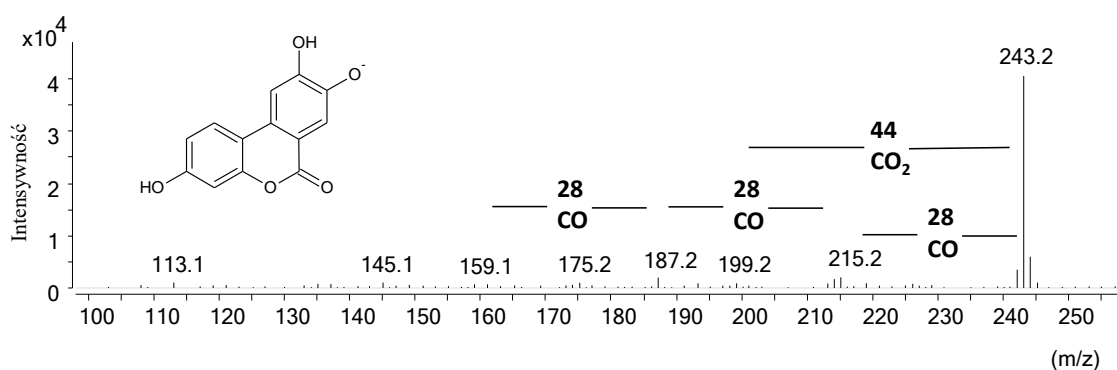


Rysunek 52. Struktury chemiczne związków **Rez1** i **Rez2** oraz ich ścieżki fragmentacji.

Produkty fotodegradacji w ekstrakcie z drzewa brazylijskiego

W ekstrakcie z drzewa brazylijskiego, już po pierwszej godzinie ekspozycji na promieniowanie, wykryty został główny produkt fotodegradacji. W widmie mas (Rys. 53) tego związku widoczne są sygnały jonu pseudocząsteczkowego o wartości m/z 243 i jonów

fragmentacyjnych m/z : 215 $[M-H-CO]^-$, 199 $[M-H-CO_2]^-$, 187 $[M-H-2CO]^-$, 175, 159 $[M-H-3CO]^-$, 113. W widmie UV-Vis widoczne są trzy maksima absorpcji przy długościach fali 258, 308 i 336 nm. Związek ten w literaturze nazywany jest „związkiem typu C” (z *ang.* compound type C) i jest on uważany za główny produkt fotodegradacji brazyleiny [132]. W miarę wzrostu stężenia związku typu C malały sygnały pochodzące od brazyleiny i protosappaniny B. Po 28 godzinach naświetlania ich ilość spadła o ponad połowę. Związek typu C został również wykryty w ekstrakcie włókna pochodzącego z XVI-wiecznego kobierca, co zostało przeze mnie opublikowane równoległe z pracą innych autorów, którzy zaproponowali strukturę chemiczną tego związku [107, 134].



Rysunek 53. Widmo mas i struktura chemiczna urolityny (związku typu C).

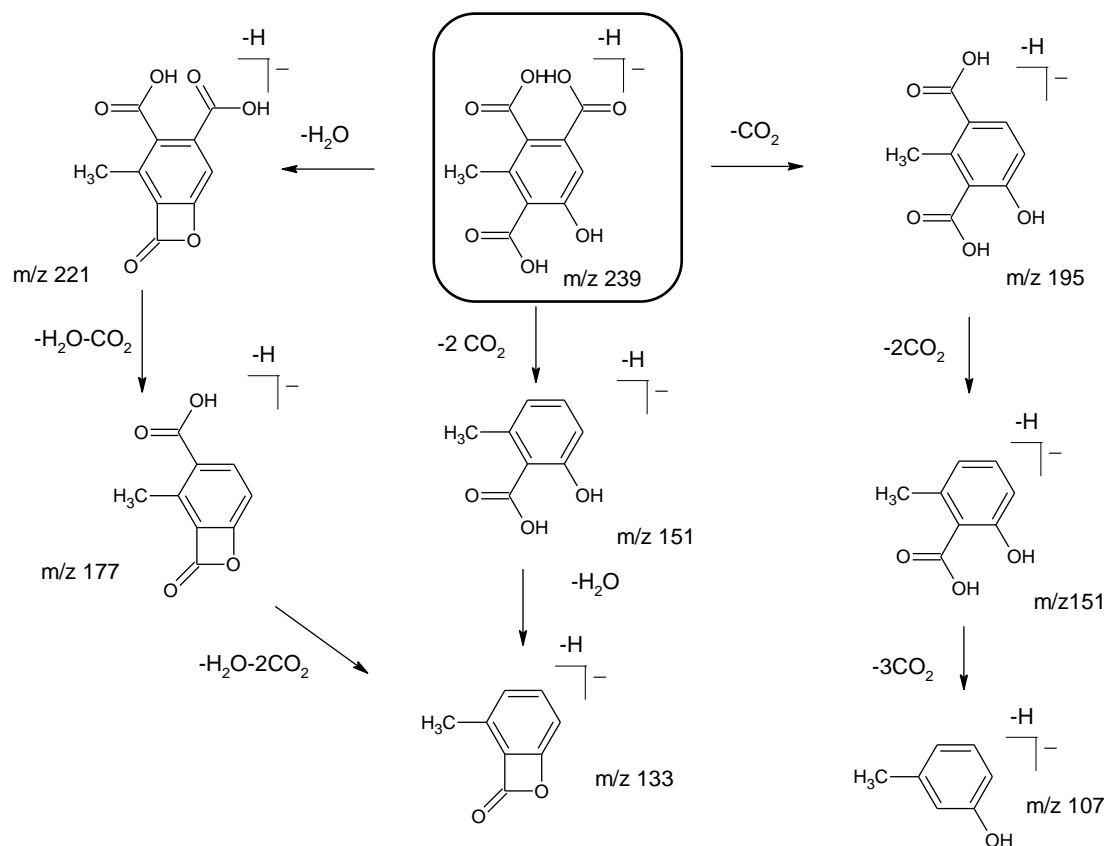
Produkty fotodegradacji w ekstrakcie z lac dye

W ekstrakcie z *lac dye* zidentyfikowano jeden produkt fotodegradacji. Związek **Lac1** wykryty został po 48 godzinach naświetlania, a jego stężenie nieznacznie rosło w miarę długości czasu ekspozycji na promieniowanie. Z kolei ilość pozostałych substancji barwiących obecnych w tym ekstrakcie nieznacznie malała. Widmo UV-Vis substancji **Lac1** z maksimami absorpcji przy długościach fali 285 i 504 nm ma bardzo zbliżony profil do widma UV-Vis kwasów lakkainowych. W jego widmie mas widoczne są sygnały pochodzące od jonu pseudocząsteczkowego m/z 552 oraz od jonów fragmentacyjnych m/z : 534 $[M-H-H_2O]^-$, 508 $[M-H-CO_2]^-$, 490 $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, 464 $[M-H-2CO_2]^-$ i 446 $[M-H-2CO_2-H_2O]^-$. Jony te tworzą się w wyniku naprzemiennej utraty cząsteczki wody i dwutlenku węgla. Jest to typowa dla kwasów lakkainowych ścieżka fragmentacji. Analiza HPLC-ESI(-)-QTOF umożliwiła wyznaczenie dokładnej masy monoizotopowej (552.0769 Da), której wartość odpowiada substancji o wzorze sumarycznym $C_{26}H_{19}NO_{13}$ z błędem pomiaru masy 2.54 ppm. Związek ten jest najprawdopodobniej pochodną kwasu lakkainowego A posiadającą dodatkową grupę hydroksylową w obrębie cząsteczki. Związek ten wykryty został również w ekstrakcie włókna pochodzącego z XVI-wiecznego kobierca. Struktura chemiczna oraz dane

spektrochromatograficzne tej substancji przedstawione zostały w Tabeli 4 i na Rysunku 28 umieszczonych w rozdziale 7.1.1.

Produkty fotodegradacji w ekstrakcie z koszenili

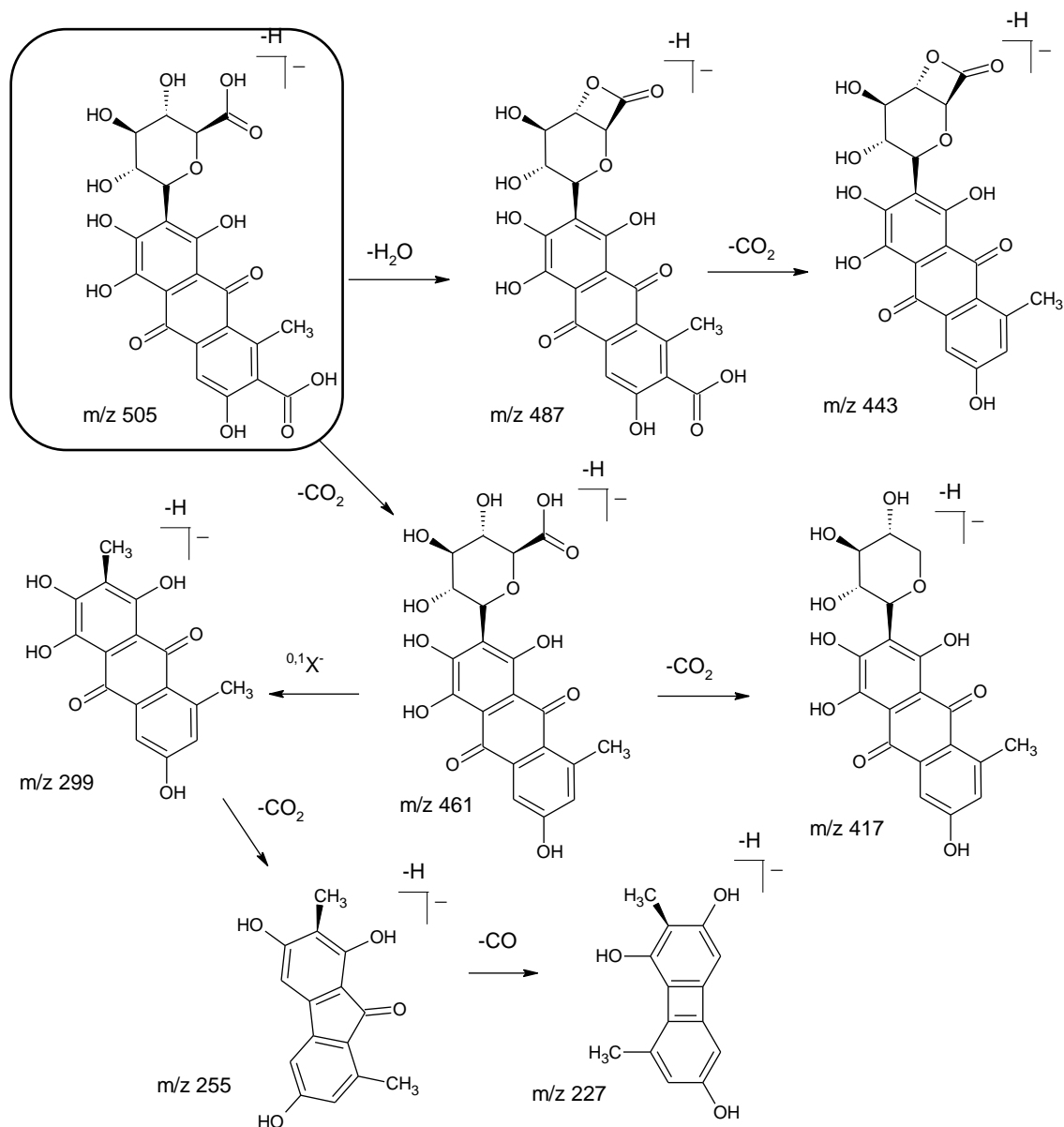
W trakcie naświetlania ekstraktu z koszenili po 48 godzinach naświetlania zawartość kwasu karminowego zmalała o połowę. Po 194 godzinach nie był on już wykrywalny. W ekstrakcie zidentyfikowano natomiast pięć nowych substancji (Tab. 27). Pierwszy produkt fotodegradacji **K1** zarejestrowany został po 48 godzinach naświetlania. Jest to najprawdopodobniej główny produkt fotodegradacji, ponieważ jego stężenie wzrastało w miarę długości naświetlania. W widmie mas tego związku widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 239 oraz sygnały jonów fragmentacyjnych m/z : 221 $[M-H-H_2O]^-$, 195 $[M-H-CO_2]^-$, 151 $[M-H-2CO_2]^-$ i 107 $[M-H-3CO_2]^-$. Utrata trzech cząsteczek dwutlenku węgla sugeruje na obecność trzech grup karboksylowych w obrębie cząsteczki **K1**. Odejście wody wskazuje z kolei na obecność grupy hydroksylowej. Wszystkie te podstawniki wpływają na polarność cząsteczki, stąd tak krótki jej czas retencji (2.7 min.). Zaproponowana struktura chemiczna substancji **K1** oraz prawdopodobne ścieżki jej fragmentacji przedstawione zostały na Rysunku 54.



Rysunek 54. Struktura chemiczna związku **K1** oraz jego prawdopodobne ścieżki fragmentacji.

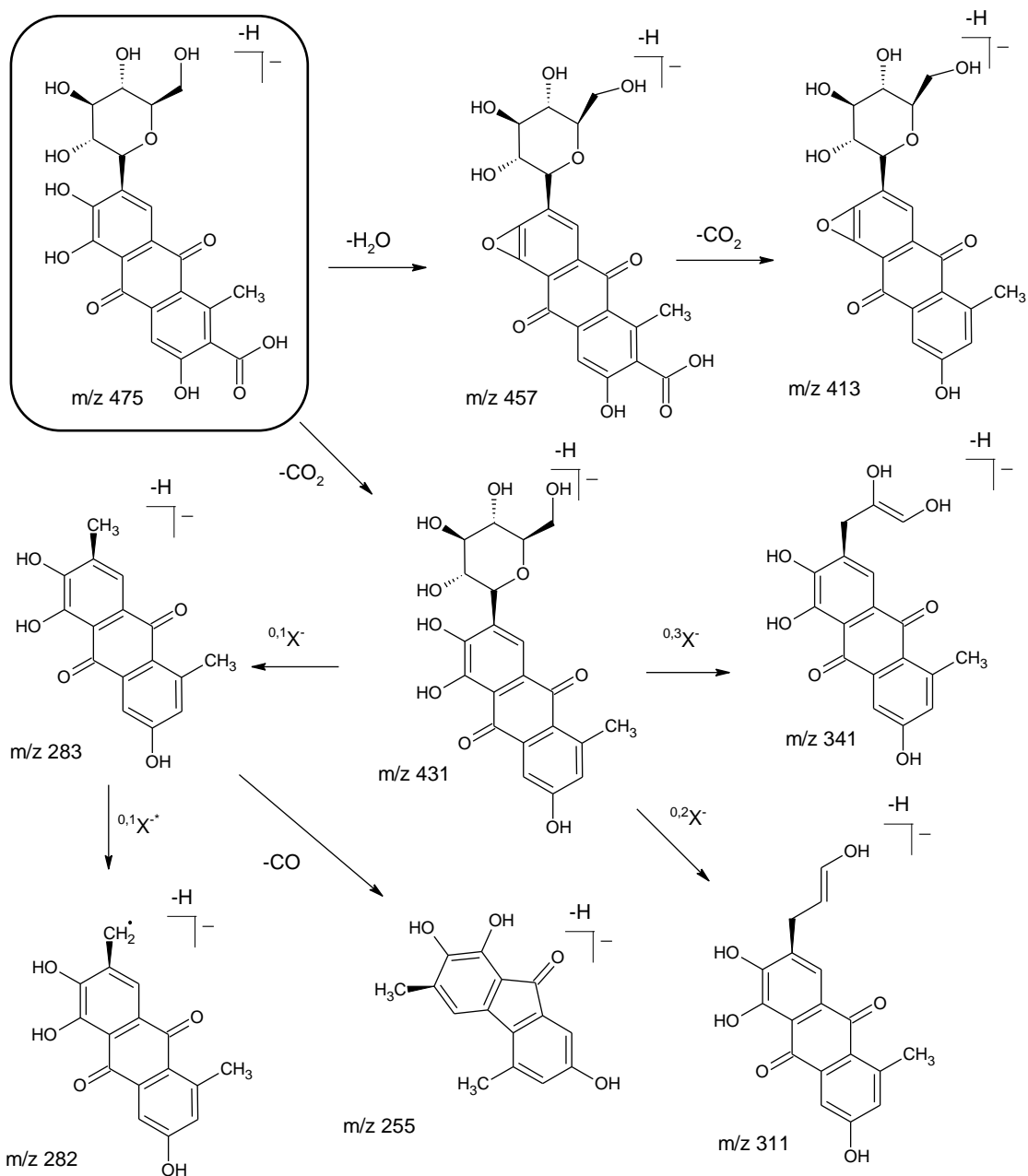
Związek oznaczony symbolem **K2** wykryty został w ekstrakcie dopiero po 168 godzinach naświetlania. W widmie mas tego związku widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 253 oraz jony fragmentacyjne m/z : 209 [M-H-CO₂]⁻, 191 [M-H-CO₂-H₂O]⁻, 165 [M-H-2CO₂]⁻, 147 [M-H-2CO₂-H₂O]⁻, 137 [M-H-2CO₂-CO]⁻, 121 [M-H-3CO₂]⁻, 103 [M-H-3CO₂-H₂O]⁻. Sygnały o wartościach m/z 209, 165 i 121 mają najwyższą intensywność i tworzą się w wyniku sukcesywnej dekarboksylacji. Znajomość dokładnej masy monoizotopowej tego związku oraz uzyskane widma MS/MS umożliwiły ustalenie struktury chemicznej produktu **K2** (Tab. 27).

Kolejne związki **K3** i **K4** wykryte zostały dopiero po 168 godzinach ekspozycji na promieniowanie. Związek **K3** utworzył się z kwasu karminowego (m/z 491) w wyniku utlenienia glukozy do kwasu glukuronowego (m/z 505). W widmie jego mas, poza charakterystycznymi dla antrachinonów reakcjami fragmentacji (odszczępienie cząsteczek CO₂, CO i H₂O), widoczne są również ścieżki fragmentacji typowe dla C-glikozydów [22]. Jon fragmentacyjny ^{0,1}X⁻ o wartości m/z 299 powstaje w wyniku rozerwania wiązań 0 i 1 w obrębie pierścienia kwasu glukuronowego. Jon ten ulega dalszej fragmentacji polegającej na odejściu neutralnych cząsteczek CO oraz CO₂, tworząc jony o wartościach m/z 255 i m/z 227. Struktura chemiczna związku **K3** oraz jego ścieżki fragmentacji przedstawione zostały na Rysunku 55.



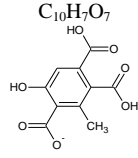
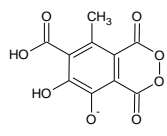
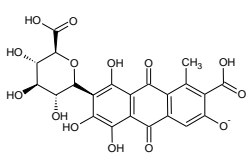
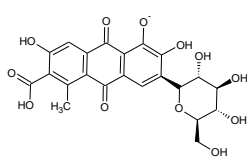
Rysunek 55. Struktura chemiczna oraz zaproponowane ścieżki fragmentacji związku **K3**.

Ostatnim wykrytym produktem fotodegradacji jest związek oznaczony symbolem **K4**. Powstaje on najprawdopodobniej z kwasu karminowego w wyniku odejścia jednej grupy hydroksylowej. W widmie mas tego związku widoczny jest intensywny sygnał jonu pseudocząsteczkowego o wartości m/z 475 oraz jony fragmentacyjne m/z : 457, 431, 413, 341, 311, 283, 282 i 255 (Tab. 27). Ścieżka fragmentacji tej substancji podobna jest do ścieżki fragmentacji kwasu karminowego. Szczególnie charakterystyczne są przemiany zachodzące w obrębie cząsteczki glukozy, znane w literaturze jako rozpady $^{0,1}X$, $^{0,2}X$, $^{0,3}X$. Polegają one na sukcesywnym odejściu cząsteczek $C_5H_8O_5$ (148 Da), $C_4H_8O_4$ (120 Da) oraz $C_3H_6O_3$ (90 Da). Na Rysunku 56 przedstawiona została zaproponowana struktura chemiczna produktu **K4** oraz prawdopodobne ścieżki jego fragmentacji.



Rysunek 56. Struktura chemiczna oraz zaproponowane ścieżki fragmentacji związku **K4**.

Tabela 27. Dane spektrometryczne produktów fotodegradacji zidentyfikowanych w ekstrakcie z koszenili.

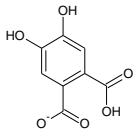
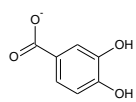
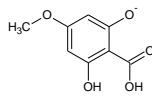
Pik	t_R min	[M-H]- m/z	Jony fragmentacyjne m/z	Masa monoizotopowa Da	Błąd ppm	Wzór sumaryczny i strukturalny
K1	2.7	239	221 [M-H-H ₂ O] ⁻ 195 [M-H-CO ₂] ⁻ 177 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 151 [M-H-2CO ₂] ⁻ 133 [M-H-2CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 107 [M-H-3CO ₂] ⁻	239.0202	-2.09	$C_{10}H_7O_7$ 
K2	4.2	253	209 [M-H-CO ₂] ⁻ 191 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 165 [M-H-2CO ₂] ⁻ 147 [M-H-2CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 137 [M-H-2CO ₂ -CO] ⁻ 121 [M-H-3CO ₂] ⁻ 103 [M-H-3CO ₂ -H ₂ O] ⁻	253.9991	0.79	$C_{10}H_5O_8$ 
K3	9.7	505	487 [M-H-H ₂ O] ⁻ 461 [M-H-CO ₂] ⁻ 443 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 417 [M-H-2CO ₂] ⁻ 299 [^{0,1} X-H-CO ₂] ⁻ 255 [^{0,1} X-H-2CO ₂] ⁻ 227 [^{0,1} X-H-2CO ₂ -CO] ⁻	505.0621	0.59	$C_{22}H_{17}O_{14}$ 
K4	10.2	475	457 [M-H-H ₂ O] ⁻ 431 [M-H-CO ₂] ⁻ 413 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ 341 [^{0,3} X-H-CO ₂] ⁻ 311 [^{0,2} X-H-CO ₂] ⁻ 283 [^{0,1} X-H-CO ₂] ⁻ 282 [^{0,1} X-H-CO ₂] ⁻ 255 [^{0,1} X-H-CO ₂ -CO] ⁻	475.0882	0	$C_{22}H_{19}O_{12}$ 

Produkty fotodegradacji w ekstrakcie z jagody perskiej

W ekstrakcie z jagody perskiej poddanym ekspozycji na promieniowanie zidentyfikowane zostały cztery nowe produkty. Związek **Jag4** pojawił się już po 6 godzinach naświetlania, z kolei substancje **Jag1**, **Jag2** i **Jag3** wykryte zostały dopiero po 38 godzinach. W widmie mas związku **Jag4** widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 183 wraz z jonami fragmentacyjnymi m/z: 165, 139, 121 tworzącymi się w wyniku utraty odpowiednio cząsteczki wody, dwutlenku węgla oraz ponownie wody. Jony o wartościach m/z 150 oraz 124 wskazują odpowiednio na odejście rodnika metylowego i cząsteczki wody [M-H-H₂O-CH₃]⁻ oraz dwutlenku węgla i rodnika metylowego [M-H-CO₂-CH₃]⁻. Jest to charakterystyczna reakcja fragmentacji związków zawierających w swojej strukturze grupy metoksylowe. Związek **Jag4** zidentyfikowany został jako metoksylowa pochodna kwasu galusowego (Tab. 28). Substancja **Jag1** eluowała z kolumny chromatograficznej jako pierwsza. W jej widmie mas obecny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 197 oraz jony fragmentacyjne m/z: 169, 153, 151, 133, 125 i 109 powstałe w wyniku utraty cząsteczek tlenku węgla, dwutlenku węgla oraz wody. Jony o wartościach m/z 153 i 109 tworzące się w wyniku utraty cząsteczek dwutlenku węgla świadczą o obecności dwóch grup karboksylowych. Substancja ta

zidentyfikowana została jako kwas dihydroksyftalowy. Kolejny produkt fotodegradacji **Jag2** posiada widmo mas, w którym widoczny jon pseudocząsteczkowy m/z 153 oraz jeden główny jon fragmentacyjny o wartości m/z 109. Tworzy się on w wyniku dekarboksylacji jonu macierzystego. Związek **Jag2** to kwas dihydroksybenzoesowy. Został on również wykryty w XVI-wiecznych tkaninach barwionych ekstraktem z jagody perskiej [133]. W widmie mas związku **Jag3** widoczna jest charakterystyczna dla C-glukozydów ścieżka fragmentacji. Jon macierzysty o wartości m/z 393 ulega fragmentacji w wyniku utraty 90 Da i 120 Da tworząc odpowiednio jony potomne o wartościach m/z: 303 $^{0,3}X^-$ i 273 $^{0,2}X^-$. Widoczne są również jony m/z: 245 [$^{0,2}X-H-CO$] $^-$, 231 [M-H-Glu] $^-$, 203 [M-H-Glu-CO] $^-$ oraz [M-H-Glu-CO₂] $^-$. Związek ten posiada maksima absorpcji przy długościach fali 255 i 300 nm. Analiza QTOF pozwoliła na wyznaczenie dokładnej masy tego związku i ustalenie jego wzoru sumarycznego (Tab. 28). Niestety nie udało się jednak określić jego struktury chemicznej.

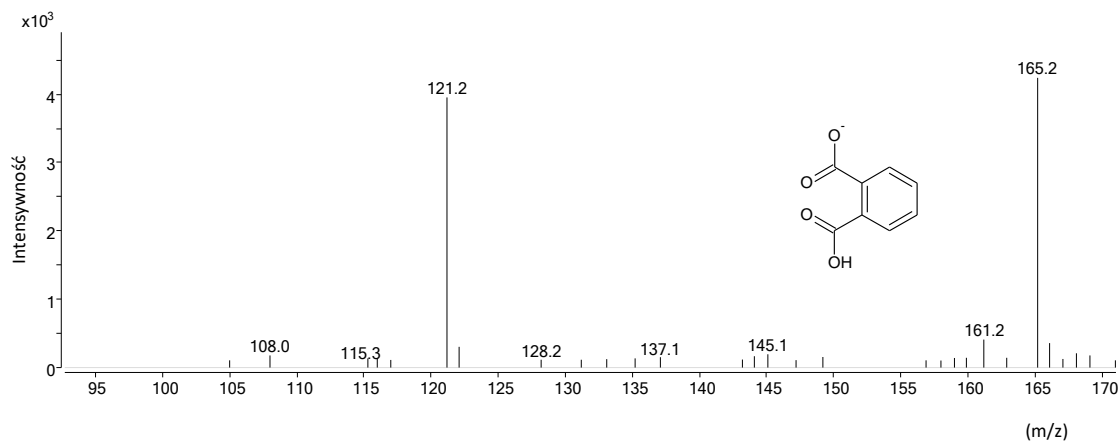
Tabela 28. Dane spektrometryczne produktów fotodegradacji zidentyfikowanych w ekstrakcie z jagody perskiej.

Pik	t_R min	[M-H] $^-$ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	Masa monoizotopowa Da	Błąd ppm	Wzór sumaryczny i struktura
Jag1	3.6	197	169 [M-H-CO] $^-$ 153 [M-H-CO ₂] $^-$ 151 [M-H-CO-H ₂ O] $^-$ 133 [M-H-CO-2H ₂ O] $^-$ 125 [M-H-CO ₂ -CO] $^-$ 109 [M-H-2CO ₂] $^-$	197.0088	2.03	C ₈ H ₆ O ₆ 
Jag2	4.7	153	109 [M-H-CO ₂] $^-$	153.0190	1.96	C ₇ H ₆ O ₆ 
Jag3	8.0	393	303 $^{0,3}X^-$ 273 $^{0,2}X^-$ 245 [$^{0,2}X-H-CO$] $^-$ 231 [[M-H-Glu] $^-$] 203 [M-H-Glu-CO] $^-$ 187 [M-H-Glu-CO ₂] $^-$	393.1185	-	C ₁₉ H ₂₂ O ₉ ?
Jag4	10.1	183	165 [M-H-H ₂ O] $^-$ 150 [M-H-H ₂ O-CH ₃] $^-$ 139 [M-H-CO ₂] $^-$ 124 [M-H-CO ₂ -CH ₃] $^-$ 121 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] $^-$ 109	183.0299	0.54	C ₈ H ₈ O ₅ 

Produkty fotodegradacji w roztworze purpuryny i ekstrakcie kraplaku

W roztworze purpuryny jak i ekstrakcie kraplaku, które poddane zostały ekspozycji na promieniowanie UV zidentyfikowano jeden produkt fotodegradacji. Związek **Pur1** pojawił się po 48 godzinach naświetlania. W widmie mas tego związku obecny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 165 wraz z jonem fragmentacyjnym m/z 121, tworzącym

się w wyniku utraty dwutlenku węgla (Rys.57). Substancja **Pur1** zidentyfikowana została jako kwas fiałowy, powstały prawdopodobnie w wyniku utlenienia cząsteczki purpuryny. Związek ten został już zidentyfikowany jako produkt fotodegradacji związków należących do grupy antrachinonów [134-135].



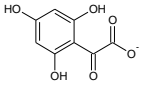
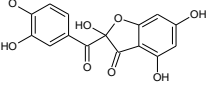
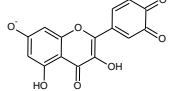
Rysunek 57. Widmo mas i zaproponowana struktura chemiczna związku **Pur1**.

Produkty fotodegradacji w roztworze kwercetyny

W roztworze kwercetyny wykryte zostały trzy produkty fotodegradacji. Pierwszy zidentyfikowany produkt **Q1** pojawił się po 24 godzinach naświetlania. W jego widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 197 wraz z jonami fragmentacyjnymi o wartościach m/z: 179 [M-H-H₂O]⁻ oraz 153 [M-H-CO₂]⁻. Intensywności tych sygnałów są porównywalne. W widmie mas obecne są również sygnały o mniejszej intensywności, które tworzą się w wyniku odczepienia cząsteczek tlenu węgla czy też karbenu. Na podstawie ścieżki fragmentacji i dokładnej masy monoizotopowej związek ten został wstępnie zidentyfikowany jako kwas okso-trihydroksyfenylooctowy (Tab. 29). Substancja wymywana z kolumny chromatograficznej w czasie 9.8 min. oznaczona została symbolem **Q2**. Powstała ona najprawdopodobniej w wyniku utlenienia cząsteczki kwercetyny powodując przy tym rozpad pierścienia C. W widmie mas tego związku widoczny jest jon deprotonowanej cząsteczki o wartości m/z 317, który ulega fragmentacji dając jony m/z: 299 [M-H-H₂O]⁻, 273 [M-H-CO₂]⁻, 271 [M-H-H₂O-CO]⁻, 255 [M-H-H₂O-CO₂]⁻, 231 [M-H-CO₂-C₂H₂O]⁻ oraz 207 i 191. Szczególnie charakterystyczne są jony m/z 191 i 207 tworzące się w wyniku odszczepienia odpowiednio pierścieni A i B. Ostatnim zidentyfikowanym produktem degradacji kwercetyny jest związek **Q3**. Wartość jego jonu pseudocząsteczkowego (m/z 299) jest mniejsza jedynie o 2 Da od jonu kwercetyny. Substancja ta powstała w wyniku utlenienia dwóch grup hydroksylowych (prawdopodobnie w pierścieniu B) analizowanego flawonoidu. Wskazuje na to obecność jonu m/z 151 ^{1,3}A⁻ tworzącego się w wyniku przegrupowania RDA w obrębie

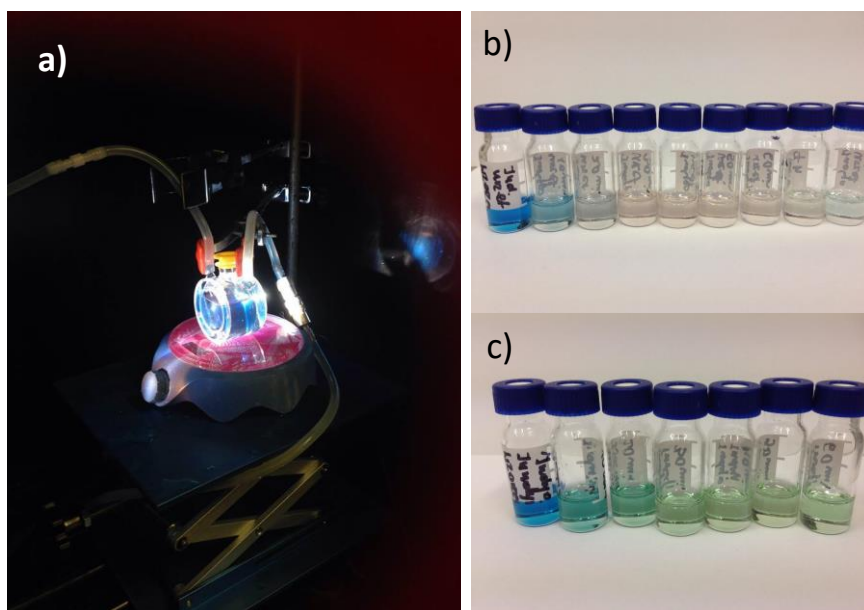
pierścienia C cząsteczki **Q3**. Związki te były już opisane w literaturze jako produkty fotodegradacji kwercetyny [136]. Czasy retencji, wartości m/z jonu pseudocząsteczkowego i jonów fragmentacyjnych, wzory sumaryczne i struktury produktów fotodegradacji kwercetyny przedstawione są w Tabeli 29.

Tabela 29. Dane spektrometryczne produktów fotodegradacji zidentyfikowanych w roztworze kwercetyny.

Pik	t_R min	[M-H] ⁻ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	Masa monoizotopowa Da	Błąd ppm	Wzór sumaryczny i struktura chemiczna
Q1	9.0	197	179 [M-H-H ₂ O] ⁻ 169 [M-H-CO] ⁻ 153 [M-H-CO ₂] ⁻ 137 [M-H-H ₂ O-C ₂ H ₂ O] ⁻ 125 [M-H-CO ₂ -CO] ⁻ 109 [M-H-H ₂ O-C ₂ H ₂ O- CO] ⁻	197.0088	2.03	C ₈ H ₆ O ₆ 
Q2	9.7	317	299 [M-H-H ₂ O] ⁻ 273 [M-H-CO ₂] ⁻ 271 [M-H-H ₂ O-CO] ⁻ 255 [M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ 245 [M-H-CO ₂ -CO] ⁻ 227 [M-H-H ₂ O-CO-CO ₂] ⁻ 217 [M-H-CO ₂ -2CO] ⁻ 207 [M-H-110] ⁻ 191 [M-H-126] ⁻	317.0301	0.63	C ₁₅ H ₁₀ O ₈ 
Q3	10.6	299	271 [M-H-CO] ⁻ 255 [M-H-CO ₂] ⁻ 243 [M-H-2CO] ⁻ 151 ^{1,3} A	299.0200	-1.00	C ₁₅ H ₈ O ₇ 

Produkty fotodegradacji w ekstrakcie indygo (indygowiec barwierski i urzet barwierski).

Niebieskie ekstrakty z indygowca i urzetu barwierskiego naświetlane były przez 1 godzinę, a próbki pobierano w 10 minutowych odstępach. Zaobserwowano bardzo szybką zmianę barwy tych ekstraktów, co obrazują zdjęcia na Rysunku 58.



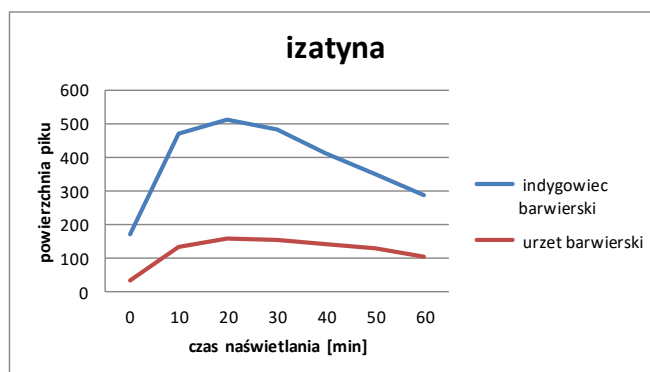
Rysunek 58. Zdjęcia a) fotoreaktora w trakcie naświetlania ekstraktu indygo oraz próbek ekstraktów pobieranych w 10 minutowych odstępach b) z urzetu barwierskiego i c) z indygowca barwierskiego.

W próbce ekstraktu z indygowca barwierskiego zidentyfikowanych zostało pięć produktów fotodegradacji, natomiast w ekstrakcie z urzetu wykryto tylko jeden (Tab. 30).

Tabela 30. Dane spektrochromatograficzne produktów fotodegradacji zidentyfikowanych w ekstrakcie z indygowca barwierskiego.

Pik	t_R min	[M-H] ⁻ m/z	Jony fragmentacyjne m/z	Masa monoizotopowa Da	Błąd ppm	Wzór sumaryczny
In1	9.4	146	118 [M-H-CO] ⁻	146.0243	2.74	$C_8H_4NO_2$
In2	10.1	162	118 [M-H-CO ₂] ⁻	162.0191	3.08	$C_8H_4NO_3$
In3	11.2	164	136 [M-H-CO] ⁻ 120 [M-H-CO ₂] ⁻	164.0350	1.83	$C_8H_6NO_3$
In4	11.9	178	134 [M-H-CO ₂] ⁻	178.0507	1.68	$C_9H_8NO_3$
In5	14.7	194	176 [M-H-H ₂ O] ⁻ 162 [M-H-CH ₃ OH] ⁻ 150 [M-H-CO ₂] ⁻ 118 [M-H-CH ₃ OH-CO ₂] ⁻	194.0455	2.06	$C_9H_8NO_4$

W obu ekstraktach zaobserwowano szybki rozkład indygotyny. W ekstrakcie z indygowca barwierskiego już po 10 minutach była ona niewykrywalna, z kolei w ekstrakcie z urzetu jej zawartość zmniejszyła się o 70%, a po 20 min. uległa całkowitej degradacji. Głównym produktem fotodegradacji wykrytym w obu ekstraktach jest izatyna **In1**. W jej widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy o wartości m/z 146 oraz jon fragmentacyjny m/z 118 powstały w wyniku utraty cząsteczki tlenku węgla. Stężenie izatyny początkowo wzrastało w miarę naświetlania, jednakże po 20 minutach zaczęło stopniowo się zmniejszać (Rys. 59).



Rysunek 59. Wykres przedstawiający zmiany stężenia izatyny w obu ekstraktach indygo w trakcie ich naświetlania.

Kolejnym wykrytym produktem fotodegradacji jest związek **In2**, w którego widmie mas obserwuje się jon pseudocząsteczkowy m/z 162 oraz jon fragmentacyjny m/z 118 powstały w wyniku odejścia cząsteczki CO₂. Zaproponowana struktura chemiczna substancji **In2** przedstawiona została w Tabeli 30. W widmie mas związku **In3** o masie jonu pseudocząsteczkowego m/z 164 obserwuje się jony fragmentacyjne m/z 136 [M-H-CO]⁺ i 120 [M-H-CO₂]⁺. Masie tej odpowiada wzór sumaryczny C₈H₆NO₃ i może to być kwas 2-aminofenylo-1-oksooctowy. Substancja **In4** o masie cząsteczkowej 179 Da ulega fragmentacji w wyniku odejścia dwutlenku węgla tworząc jon o wartości m/z 134. Substancją tą jest przypuszczalnie kwas 2-(acetyloamino)benzoesowy. Ostatnim produktem fotodegradacji zidentyfikowanym w ekstrakcie z indygowca barwierskiego jest związek **In5**. W jego widmie mas widoczny jest jon pseudocząsteczkowy m/z 194 (C₉H₈NO₄, błąd pomiaru 2.06 ppm) oraz jony fragmentacyjne o wartościach m/z 176, 162, 150 i 118. Jony te tworzą się w wyniku odejścia odpowiednio cząsteczki wody, metanolu, dwutlenku węgla oraz metanolu wraz z dwutlenkiem węgla. Wszystkie zidentyfikowane produkty fotodegradacji indygo znane są już w literaturze [137].

W ekstrakcie z urzetu barwierskiego, oprócz indygotyny, obecne są także śladowe ilości indyrubiny, apigeniny oraz chryzoeriolu. Stężenia tych substancji zmniejszyły się w trakcie naświetlania, a po 30 minutach nie były już wykrywalne.

8.2. Identyfikacja produktów fotodegradacji barwników w farbach

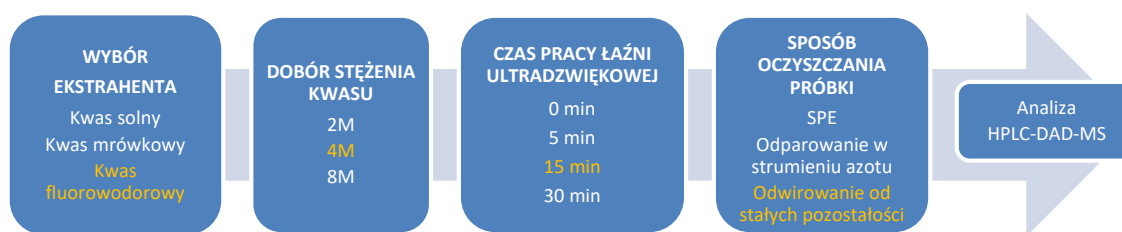
Fotodegradacji poddane zostały farby wykonane z rezedy żółtawej, kraplaku, lac dye, koszenili, jagody francuskiej, janowca barwierskiego i drzewa brazylijskiego. Farby te okazały się być wysoce fotostabilne. Jedynie w tych na bazie ekstraktu z drzewa brazylijskiego oraz lac dye zaobserwowano zauważalne zmiany w składzie substancji barwiących. W farbie z drzewa brazylijskiego wyraźnie wzrastało stężenie urolityny (związku typu C), która obecna była również w próbce farby nie poddanej sztucznemu naświetlaniu. Tworzyła się ona już najprawdopodobniej na etapie długotrwałego suszenia farby na powietrzu z dostępem światła. Stężenie tego związku wzrosło trzykrotnie po dwóch tygodniach ekspozycji na promieniowanie lampą ksenonową, z kolei stężenie brazyleiny oraz protosappaniny B nieznacznie się zmniejszyło.

W ekstrakcie farby na bazie lac dye po dwóch tygodniach naświetlania utworzył się związek **Lac1** o masie cząsteczkowej 553 Da. Związek ten wykryty został również w ekstrakcie tego barwnika poddanemu procesowi fotodegradacji, jak i w ekstrakcie z włókna pochodzącego z XVI-wiecznego kobierca (Rozdz. 7.1.1 i 8.1).

9. Podsumowanie i wnioski końcowe

W ramach badań naukowych prowadzonych w trakcie Studium Doktoranckiego zrealizowano następujące zadania badawcze:

- Opracowana została metoda izolacji i identyfikacji substancji barwiących obecnych w surowcach barwierskich, historycznych farbach artystycznych oraz tkaninach. Optymalizacja metody izolacji barwników organicznych polegała na doborze takich parametrów jak: rodzaj ekstrahenta i jego stężenie, czas pracy łaźni ultradźwiękowej, temperatura procesu ekstrakcji oraz sposób oczyszczania analizowanych próbek. Wybór odpowiedniego ekstrahenta umożliwiającego izolację barwników okazał się parametrem kluczowym i mającym zasadniczy wpływ na ich prawidłową identyfikację. Kwas fluorowodorowy okazał się być ekstrahentem najbardziej efektywnym w izolacji barwników należących do różnych klas związków. Umożliwia on ich izolację w niezmienionej formie. Oczyszczanie ekstraktów z wykorzystaniem techniki SPE okazało się etapem niekorzystnym, ze względu na straty substancji barwiących o wysokiej polarności. Etap ten uznany został za zbędny z uwagi na ograniczone ilości dostępnych próbek historycznych. Ogólny schemat izolacji barwników z farb, włókien, jak i surowców barwierskich przedstawiony został na Rysunku 60. Kolorem żółtym zaznaczono parametry, które okazały się być optymalnymi. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów opracowana została uniwersalna metoda izolacji substancji barwiących z różnego typu matryc.



Rysunek 60. Ogólny schemat izolacji substancji barwiących.

- Zoptymalizowane zostały parametry pracy układu chromatograficznego oraz spektrometru mas umożliwiające rozdzielenie substancji barwiących na pojedyncze składniki i ich detekcję. Optymalizacji poddane zostały takie parametry jak: program elucji, temperatura kolumny, objętość nastrzyku, skład fazy ruchomej oraz warunki pracy spektrometru mas.
- Opracowana metodyka analityczna zastosowana została w pierwszym etapie do identyfikacji substancji barwiących obecnych w różnego typu surowcach barwierskich. Uzyskane dane spektrochromatograficzne stanowią swego rodzaju „chemiczne odciski palca” badanych ekstraktów. Wśród analizowanych surowców barwierskich znalazły się:

janowiec barwierski, galasówki, kurkuma, trzy odmiany marzanny barwierskiej, krokosz barwierski, koszenila, drzewo brazylijskie, kampsz, urzet barwierski, indygowiec barwierski, rezedza żółtawa oraz jagoda perska. W surowcach tych zidentyfikowanych zostało kilkadziesiąt substancji barwiących należących do różnych klas związków. Otrzymane widma mas i widma UV-Vis zgromadzone zostały w bibliotece utworzonej w oprogramowaniu NIST MS Search oraz Agilent.ChemStation. Dane te ułatwiają analizę próbek o nieznanym składzie.

- Szczegółowej analizie spektrometrycznej poddane zostały również próbki pobrane z tubek farb i palet malarskich Jana Matejki, Leona Wyczółkowskiego i Jacka Malczewskiego oraz obrazów Józefa Pankiewicza (*Targ na kwiaty przed kościołem Św. Magdaleny w Paryżu, Lato, Wóz z sianem*), Maksymiliana Gierymskiego (*Studium konia kasztana*) i Henryka Siemiradzkiego (*Pochodnie Nerona, Przyszłe ofiary Koloseum, Cyganka, Pólakt kobiety, Z wiatykiem, Chrystus i Samarytanka, U źródła, Odpoczynek*), Marcellego Bacciarellego (*Portret Stanisława Augusta Poniatowskiego w stroju koronacyjnym*). W materiałach malarskich tych artystów zidentyfikowane zostały substancje barwiące występujące naturalnie w marzannie barwierskiej, koszenili, rezedzie żółtawej, żółcieni indyjskiej, indygo, galasówkach oraz jagodzie perskiej.
- Przebadane zostały także próbki włókien pochodzących ze średniowiecznego arrasu oraz XVI-wiecznego kobierca. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że do barwienia włókien na kolor żółty i pomarańczowy zastosowane zostały ekstrakty z rezedzy żółtawej oraz drzewa brazylijskiego i perukowca podolskiego; do uzyskania czerwonej i fioletowej barwy nici użyto ekstraktów lac dye oraz marzanny barwierskiej; natomiast niebieskie włókna farbowane były wyciągiem z indygo; w celu uzyskania barwy zielonej użyto mieszaninę indygo i rezedzy żółtawej; z kolei barwę brązową włókien osiągnięto w wyniku ich kąpieli w wyciągu z rezedzy i tanin.
- Z wykorzystaniem technik SEM-EDS oraz FT-IR przeprowadzone zostały także badania morfologii włókien oraz składu zapraw barwierskich oraz laków barwnych.
- Przeprowadzono proces fotodegradacji naturalnych substancji barwiących. W tym celu ekstrakty surowców barwierskich oraz farby modelowe poddano naświetlaniu lampą ksenonową emitującą skondensowane promieniowanie, którego zakres pokrywa się z zakresem promieniowania słonecznego. Badania prowadzone były w fotoreaktorze SUNTEST XLS. Fotodegradacji poddane zostały ekstrakty z drzewa brazylijskiego, rezedzy żółtawej, jagody francuskiej, koszenili, lac dye, janowca barwierskiego oraz marzanny barwierskiej. Farby malarskie charakteryzowały się znacznie większą fotostabilnością niż ekstrakty surowców barwierskich. Jedynie w farbach na bazie drzewa brazylijskiego oraz lac dye zaobserwowano niewielkie zmiany w ich składzie. W obu farbach wykryto po jednym produkcie fotodegradacji. W farbie z drzewa brazylijskiego zidentyfikowano

urolitynę, natomiast w farbie z lac dye pochodną kwasu lakkainowego A z dodatkową grupę hydroksylową. W ekstraktach surowców barwierskich zidentyfikowano szereg produktów fotodegradacji. W ekstrakcie z rezedy żółtawej wykryto dwa produkty rozkładu glukozydu luteoliny o masach cząsteczkowych 340 i 222 Da. Z kolei w wyciągu z koszenili wykryto cztery nowe związki. W ekstrakcie z jagody perskiej już po sześciu godzinach naświetlania pojawił się pierwszy produkt fotodegradacji, a po 38 godzinach wykryto kolejne trzy. Dwudziestoczegodzinna ekspozycja roztworu kwercetyny na promieniowanie spowodowała utworzenie się trzech produktów rozkładu tej substancji. Roztwór indygo okazał się być najmniej odporny na promieniowanie. Już po 10 minutach zaczął blaknąć, a po 60 minutach uległ praktycznie całkowitemu odbarwieniu. W ekstrakcie tym wykryto pięć produktów rozkładu indygotyny. Większości nowopowstałym związkom udało się przypisać strukturę chemiczną oraz zaproponować ścieżki ich fragmentacji. W rezultacie zidentyfikowano i zaproponowano strukturę chemiczną ponad dwudziestu związków powstałych w wyniku naturalnego lub wymuszonego procesu fotodegradacji. Kilka z nich zostało już opisanych w literaturze, co potwierdza poprawność opracowanej metodyki. **Pozostałe produkty fotodegradacji zidentyfikowane zostały po raz pierwszy.** Dwie substancje powstałe w wyniku sztucznego naświetlania wykryte zostały także w włóknach historycznych tkanin.

Zrealizowane cele badawcze pozwoliły na utworzenie uniwersalnej metody izolacji i identyfikacji różnego typu barwników organicznych oraz produktów ich fotodegradacji. Wyniki analiz stanowią cenne informacje dla szerokiego grona specjalistów zajmujących się dziełami sztuki. Wiele z nich zostało już wykorzystanych przez kustoszy do opracowania katalogów muzealnych oraz do wdrożenia odpowiedniej procedury konserwatorskiej.

10. Dorobek naukowy

Publikacje:

1. **Olga Otłowska**, Marek Ślebioda, Agata Kot-Wasik, Jakub Karczewski, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, *Chromatographic and Spectroscopic Identification and Recognition of Natural Dyes, Uncommon Dyestuff Components, and Mordants: Case Study of a 16th Century Carpet with Chintamani Motifs.*, *Molecules*, 23 (2018) 1-15; ISSN: 1420-3049
2. **Olga Otłowska**, Marek Ślebioda, Mirek Wachowiak, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, *Multi-analytical approach to the characterization of natural organic dyestuffs and inorganic substrates present in the 19th century artistic oil paints manufactured by a French art materials supplier Richard Ainès.*, *Anal. Methods*, 1 (2017) 94-102; DOI: 10.1039/c6ay02959k
3. **Olga Otłowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Aleksander Kołodziejczyk, „*Izolacja i identyfikacja naturalnych substancji barwiących obecnych w próbkach farb artystycznych i tkaninach pochodzenia historycznego*” *Wiadomości Chemiczne*, 24 (2016) 163-187; ISSN 0043-5104
4. **Olga Otłowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Aleksander Kołodziejczyk, „*Identyfikacja naturalnych substancji barwiących obecnych w farbach malarskich pochodzenia historycznego*”, *Analityka* 2 (2015) 52-56; ISSN 1509-4650
5. **Olga Otłowska**, Marek Ślebioda, Mirosław Wachowiak, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, „*Identification and characterization of the Indian Yellow dyestuff and its degradation products in historical oil paint tube by liquid chromatography mass spectrometry*” *RSC Adv.*, 5 (2015) 48786-48792; DOI 10.1039/c5ra06781b
6. **Olga Otłowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Mirosław Wachowiak, Grzegorz Trykowski „*Żółte barwniki organiczne w XIX-wiecznych farbach Jana Matejki - identyfikacja substancji barwiących, nośników, oraz wypełniaczy*” *Zabytkoznawstwo i Konserwatorstwo* 46 (2015) 287-314. ISSN 0208-533X

Skrypt:

1. **Olga Otłowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Janusz Rachoń, „*Naturalne organiczne substancje barwiące*” Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej (2016) ISBN: 978-83-7348-673-7

Konferencje:

1. **Olga Otłowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Marek Ślebioda, „*Identyfikacja barwników naturalnych w tubkach farb Jana Matejki przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas*”, sesja posterowa, 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Częstochowa, 14-18. 09. 2014
2. **Olga Otłowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Mirosław Wachowiak, Grzegorz Trykowski, *Red organic dyestuff analyses of the Jan Matejko (1839-1893) preserved historical paints from tubes by means of HPLC-DAD-MS broadened by XRF and SEM-EDX techniques*, sesja posterowa, 8th International Congress on the Application of Raman Spectroscopy in Art and Archaeology, Warszawa, 1-5. 09. 2015



3. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Mirosław Wachowiak „*Identyfikacja naturalnych barwników organicznych w farbach Jana Matejki za pomocą LC-ESI-MS/MS*”, sesja posterowa, XV konferencja Analiza Chemiczna w Ochronie Zabytków, Warszawa, 03-04.12.2015.
4. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Mirosław Wachowiak, Grzegorz Trykowski, „*Nieorganiczne składniki farb na bazie barwników organicznych*” sesja posterowa, XV konferencja Analiza Chemiczna w Ochronie Zabytków, Warszawa, 03-04.12.2015
5. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, „*An analytical protocol for the isolation and identification of natural organic dyestuffs present in historical artistic paints*” (wystąpienie ustne), 6th Meeting X-ray and other Techniques in Investigation of the Objects of Cultural Heritage, Kraków, 18-21.05.2016
6. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, „*An analytical protocol for the isolation and identification of natural organic dyestuffs present in historical artistic paints*”, Progress in Organic Synthesis, Gdańsk, 23-25.06.2016
7. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Antoni Marciniak, „*Procedura analityczna izolacji i identyfikacji naturalnych barwników organicznych obecnych w surowcach barwierskich i historycznych farbach artystycznych*”, 59 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań, 19-23.09.2016.
8. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, Justyna Jama, „*Opracowanie metody izolacji substancji barwiących z próbek farb historycznych. Wpływ rodzaju ekstrahenta na wydajność procesu i stan zachowania barwników*” XVI Konferencja Naukowa: Analiza Chemiczna w Ochronie Zabytków, Warszawa, 01-02.12.2016.
9. **Olga Otlowska**, Magdalena Śliwka-Kaszyńska, „*HPLC-DAD-MS analysis of 19th century artistic paints belonged to a famous Polish painter Jan Matejko*” Dyes in History and Archaeology, Londyn, 26-28.10.2017.

Granty:

1. Projekt badawczy Preludium 9 nr 2015/17/N/HS2/03310, „*Identyfikacja organicznych substancji barwiących stosowanych przez XIX-wiecznych polskich artystów. Badanie wpływu promieniowania UV na proces starzenia się barwników, identyfikacja ich rozkładu.*” Termin realizacji 02.2016-02.2018

LITERATURA

- [1] *Pigments through the Ages, Prehistory*, dostępne w Internecie:
<http://www.webexhibits.org/pigments/intro/early.html>
- [2] K.A. Bard, *Encyclopedia of the Archaeology of Ancient Egypt*, Londyn, Nowy Jork: Routledge (1999).
- [3] B. Bravo, E. Wipszycka, *Historia starożytnych Greków*, Warszawa: PWN (1988).
- [4] O. Otłowska, M. Śliwka-Kaszyńska, J. Rachoń, *Naturalne organiczne substancje barwiące*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej (2016).
- [5] A. Kieciń, *Krótką historią barwników syntetycznych*, dostępne w Internecie:
<http://barwniki.wordpress.com/2009/10/20/krotka-historia-barwnikow-syntetycznych/>
- [6] O. Otłowska, M. Śliwka-Kaszyńska, A. Kołodziejczyk, *Wiad. Chem.*, **70** (2016) 163-187.
- [7] I. Karapanagiotis, E. Minopoulou, L. Valianou, S. Daniilia, Y. Chryssoulakis, *Anal. Chim. Acta*, **647** (2009) 231-242.
- [8] M. Doerner, *Materiały malarskie i ich zastosowanie*. Warszawa: Arkady (1975) 16-138.
- [9] J. Łyszkiewicz, *Teoria koloru – kolory przedmiotów. Czy świat jest bezbarwny ? Czarne światło !*, dostępne w Internecie:
<http://www.realcolortheory.pl/koloryprzedmiotow-colorobject.pdf>
- [10] J.D. Roberts, M.C. Caserio, *Chemia organiczna*. Warszawa: PWN (1969) 1036-1038.
- [11] B.I. Stiepanow, *Podstawy chemii technologii barwników organicznych*. Warszawa: WNT (1980) 29-108.
- [12] J. Sokołowski, G. Kupryszewski, *Teoretyczne podstawy chemii organicznej*. Warszawa: PWN (1972) 114-120.
- [13] Norma PN-EN ISO 4618:2007
- [14] V. Pauk, P. Bartak, K. Lemr, *J. Sep. Sci.*, **37** (2014) 3393-3410.
- [15] E. Rossenberg, *Anal. Bioanal. Chem.*, **391** (2008) 33-57.
- [16] K. Blus, *Odporności użytkowe wybarwień*, *Informator chemika kolorysty*, **17** (2011) 1-51.
- [17] Międzynarodowy Indeks Barw, dostępne w Internecie:
http://www.exit.johnsnow.com.pl/Mi%C4%99dzynarodowy_Indeks_Barw.html
- [18] J.A. Kiernan, *Biotech. Histochem.*, **76** (2001) 261-277.
- [19] P.S. Vankar, *Resonance*, **5** (2000) 73-80.
- [20] A. Kołodziejczyk, *Naturalne związki organiczne*, Warszawa: PWN, (2013) 608-609.

- [21] C. Brunetti, M. Di Ferdinando, A. Fini, S. Pollastri, M. Tattini, *Int. J. Mol. Sci.*, **14** (2013) 3540-3555.
- [22] A. Kobylińska, K.M. Janas, *Postę. Hig. Med. Dosw.*, **69** (2015) 51-62.
- [23] M. Stobiecki, P. Kachlicki, A. Wojakowska, Ł. Marczak, *Phytochem. Lett.*, **11** (2015) 358-367.
- [24] R.E. March, E.G. Lewars, C.J. Stadey, X.S. Miao, X. Zhao, C.D. Metcalfe, *Intern. J. Mass Spectr.*, **248** (2006) 61-85.
- [25] M. Stobiecki, *Phytochem.*, **54** (2000) 237-256
- [26] E.S.B. Ferreira, A.N. Hulme, H. McNab, A. Quye, *Chem. Soc. Rev.*, **33** (2004) 329-336.
- [27] K.M. Frei, I.V. Berghe, R. Frei, U. Mannering, H. Lyngstrom, *J. Archaeol. Sci.*, **37** (2010) 2136-2145.
- [28] R. Marques, M.M. Sousa, M.C. Oliveira, M.J. Melo, *J. Chromatogr. A*, **1216** (2009) 1395-1402.
- [29] L. Valianou, I. Karapanagiotis, Y. Chrysoulakis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **395** (2009) 2175-2189.
- [30] J. Wouters, *Dyes Hist. Archaeol.* **13** (1994) 38-45.
- [31] A. Timar-Balazsy, W. Roelofs, *Textile History*, **18** (1987) 87-96.
- [32] I. Petroviciu, I. Cretu, I. V. Berghe, J. Wouters, A. Medvedovici, F. Albu, *Flavonoid Dyes Detected In Historical Textiles, e-PS*, **11** (2014) 84-90.
- [33] J.H. Hofenk de Graaff, *The Colourful Past: Origins, Chemistry and Identityfication of Natural Dyestuffs*, Archetype Publications (2004).
- [34] G. Cuoco, C. Mathe, C. Vieillescazes, *Microchem. J.*, **115** (2014) 130-137.
- [35] M.M. Sousa, M.J. Melo, A.J. Parola, J. S. S. Melo, F. Catarino, F. Pina, F.E.M. Cook, M.S.J. Simmonds, J.A. Lopes, *J. Chromatog. A*, **1209** (2008) 153-161.
- [36] K. Blaim, *Barwniki roślinne*, Warszawa: PWRiL (1967) 106-108.
- [37] *Pigments through the Ages, Madder lake (Alizarin)*, dostępne w Intrenecie: <http://www.webexhibits.org/pigments/indiv/history/alizarin.html>
- [38] C. Clementi, W. Nowik, A. Romani, F. Cibir, G. Favaro, *Anal. Chim. Acta*, **596** (2007) 46-54.
- [39] I. Boldizsar, Z. Szucs, Zs. Fuzfai, I. Molnar-Perl, *J. of Chromatogr.*, **1133** (2006) 259-274.
- [40] J. Sanyova, J. Reisse, *J. Cult. Herit.*, **7** (2006) 229.
- [41] C. Mouri, R. Laursen, *Microchim. Acta*, **179** (2012) 105-113.

- [42] *Zagłada kolorowych mundurów*, dostępne w Internecie:
<http://bywajtu.pl/strony/historia-cywilizacji/notatka/zaglada-kolorowych-mundurow/>
- [43] J. Berlinerblau, *Chemik Polski*, **28** (1905) 545.
- [44] M. Sequin-Frey, J. *Chem. Educ.*, **58** (1981) 301-306.
- [45] A. Trojanowska, *Analecta*, **17** (2008) 15-31.
- [46] L. Bogacz-Radomska, J. Harasym, *Rośliny w medycynie, farmacji i przemyśle*, Lublin: Tygiel (2016) 67-69.
- [47] D. Rotkiewicz, I. Konopka, M. Tańska, *Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe olejów roślinnych oraz ich funkcje*, *Roślinny Oleiste*, **23** (2002) 561-579.
- [48] A. Adamska, J. Rutkowska, M. Białek, *Probl. Hig. Epidemiol.*, **95** (2014) 36-40.
- [49] L. Degani, C. Riedo, O. Chiantore, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407** (2015) 1696-1704.
- [50] K. Kacprzak, *Kolorowy świat barwników organicznych*. Wydział Chemii UAM, dostępne w Internecie:
<http://www.poczujchemie.amu.edu.pl/zalaczniki/chemia/barwniki2.0.pdf>
- [51] C. Miliani, A. Romani, G. Favaro, *Spectrochim. Acta Part A*, **54** (1998) 582.
- [52] D. Mantzouris, I. Karapanagiotis, *Dyes Pigm.*, **104** (2014) 194-196.
- [53] J. Glanc, *Sekrety purpury tyryjskiej.*, dostępne w Internecie:
<http://muszle.concha.pl/artykuly/sekrety-purpury-tyryjskiej/>
- [54] J.L. Wolk, A. Frimer, *Molecules*, **15** (2010) 5473-5508.
- [55] M. Sato, Y. Sasaki, *Dyes Hist. Archaeol.*, **19** (2003) 19-23.
- [56] J.S. Negi, V.K. Bisht, P. Singh, M.S. M. Rawat, G.P. Joshi, *J. Appl. Chem.*, **2013** (2013) 1-9.
- [57] J. Cui, W. Hu, Z. Cai, Y. Liu, S. Li, W. Tao, H. Xiang, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **95** (2010) 166-72.
- [58] N.S. Baer, A. Joel, R.L. Feller, N. Indictor, *Artist's Pigments: A handbook of Their History and Characteristic*, **1** (1986) 17-23.
- [59] K. Schmidt-Przewoźna, *Barwienie metodami naturalnymi*. dostępne w Internecie
[<http://studylibpl.com/doc/1369662/barwienie-2.indd>]
- [60] J. Miłobędzka, S.V. Kostanecki, V. Lampe. *Zur Kenntnis des Curcumins.*, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **43** (1910) 2163-2170.
- [61] A. Kot-Wasik, D. Dąbrowska, J. Namieśnik, *Degradacja związków organicznych w środowisku*. CEEAM Wydział Chemiczny PG, Gdańsk (2003) 700-722.
- [62] M. Włodarczyk-Makuła, A. Obstój, *L.A.B.*, **3** (2018) 20-27.

- [63] D. Cristea, G. Vilarem, *Dyes Pigm.*, **70** (2006) 238-245.
- [64] S. Dall'Acqua, G. Miolo, G. Innocenti, S. Caffieri, *Molecules*, **17** (2012) 8898-8907.
- [65] L. Degani, M. Gulmini, G. Piccablotto, P. Iacomussi, D. Gastaldi, F. Dal Bello, O. Chiantorre, *J. Cult. Herit.*, **26** (2017) 12-21.
- [66] J. Poulin, *Stud. Conserv.*, **63** (2018) 36-61.
- [67] C. Miliani, L. Monico, M.J. Melo, S. Fantacci, E.M. Angelin, a. Romani, k. Janssens, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **57** (2018) 7324-7334.
- [68] F. Gosetti, U. Chiuminatto, E. Mazzucco, R. Mastroianni, E. Marengo, *Food Chem.*, **167** (2015) 454-462.
- [69] H. Chaaban, I. Ioannou, C. Paris, C. Charbonnel, M. Ghoul, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **336** (2017) 131-139.
- [70] Cooperative Patent Classification CPC-C09B-2014.06., dostępne w Internecie: <http://www.uspto.gov/web/patents/classification/cpc/pdf/cpc-definition-C09B.pdf>
- [71] C. Clementi, B. Doherty, P.L. Gentili, C. Miliani, A. Romani, B. G. Brunetti, A. Sgamellotti, *Appl. Phys. A*, **92** (2008) 25-33.
- [72] H. Kunkley, A. Vogler, *Inorg. Chem. Commun.*, **14** (2011) 1153-1155.
- [73] J.T. Smith, *Antiquities of Westminster*, London, (1807).
- [74] S.G. Ree-Jones, *Stud. Conserv.*, **35** (1990) 93-101.
- [75] J. Wouters, *Stud. Conserv.*, **30** (1985) 119-128.
- [76] A. Singh, V. Bajpai, S. Kumar, A. Kumar Singh Rawat, B. Kumar, *J. Pharm. Anal.*, **7** (2017) 77-86.
- [77] D. Jemo, D., Parac-Osterman, *Fibers Text. East. Eur.*, **25** (2017) 113-120.
- [78] L. Ford, C. M. Rayner, R. S. Blackburn, *Dyes Pigm.*, **154** (2018) 290-295.
- [79] L. Zhang, K. Tian, Y. Wang, J. Zou, Z. Du, *Int. J. Mass Spectrom.*, **421** (2017) 61-70.
- [80] J. Han, J. Wanrooij, M. Bommel, A. Quye, *J. Chromatogr. A*, **1479** (2017) 87-96.
- [81] A.E. Kramell, P. Wertmann, D. Hosner, R. Kluge, F. Oehler, C.H. Wunderlich, P.E. Tarasov, M. Wagner, R. Csuk, *J. Archaeol. Sci.*, **10** (2016) 464-473.
- [82] L. Ford, R.L. Henderson, C.M. Rayner, R.S. Blackburn, *J. Chromatogr. A*, **1487** (2017) 36-46.
- [83] B. Witkowski, M. Ganeczko, H. Hryszko, M. Stachurska, T. Gierczak, M. Biesaga, *Microchem. J.*, **133** (2017) 370-379.
- [84] H.E. Ahmed, I.F. Tahoun, I. Elkholy, A.B. Shehata, Y. Ziddan, *Dyes Pigm.*, **145** (2017) 486-492.

- [85] B. Campanella, E. Grifoni, M. Hidalgo, S. Legnaioli, G. Lorenzetti, S. Pagnotta, F. Poggialini, L. Ripoll-Seguer, V. Palleschi, *J. Cultur. Herit.* (2017) DOI: 10.1016/j.culher.2018.01.013.
- [86] A.L. Tenorio, F. Parlanti, I. Degano, G. Lorenzetti, D. Demosthenous, M.P. Colombini, K.L. Rasmussen, *Microchem. J.*, **131** (2017) 112-119.
- [87] J. Liu, L. Ji, L. Chen, K. Pei, P. Zhao, Y. Zhou, F. Zhao, *Dyes Pigm.*, **153** (2018) 137-143.
- [88] I. Petroviciu, F. Albu, I. Cretu, M. Virgolici, A. Medvedovici, *J. Cultur. Herit.*, **28** (2017) 164-171.
- [89] L. Pronti, J.B. Mazzitelli, M.P. Bracciale, L.M. Rosati, C. Vieillescazes, M.L. Santarelli, A.C. Felici, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, **200** (2018) 10-19.
- [90] J. Kirby, *Back to the roots- Workshop on the preparation of historical lake pigments*, Munich Doerner Institut, 23-25 March (2011)
- [91] M. Papanastasiou, N. Allen, A. McMahon, L. Naegel, M. Edge, S. Protopappas, *Dyes Pigm.*, **92** (2012) 1192-1198.
- [92] C. Westley, K. Benkendorff, *J. Chem. Ecol.*, **34** (2008) 44-56.
- [93] J. Orska-Gawrys, I. Surowiec, J. Kehl, H. Rejniak, K. Urbaniak-Walczak, M. Trojanowicz, *J. Chromatog. A*, **989** (2003) 239-248.
- [94] O. Otłowska, M. Ślebioda, M. Wachowiak, M. Śliwka-Kaszyńska, *RSC Adv.*, **5** (2015) 48786-48792.
- [95] J. Sanyova, *Microchim. Acta.*, **162** (2008) 361-370.
- [96] A. Kot-Wasik, A. Wasik, J. Namieśnik, *Wykorzystanie technik LC-MS do oznaczania słodzików w produktach spożywczych*, Dostępne w Internecie: [https://chem.pg.edu.pl/documents/175289/4241474/Wykorzystanie%20techniki%20LC MS.pdf](https://chem.pg.edu.pl/documents/175289/4241474/Wykorzystanie%20techniki%20LC%20MS.pdf)
- [97] D.P. Demarque, A.E.M. Crotti, R. Vessecchi, J.L.C. Lopes, N.P. Lopes, *Nat. Prod. Rep.*, **33** (2016) 432-455.
- [98] A. Jakimska, W. Hewelt-Belka, K. Wilczewska, A. Kot-Wasik, *Nowoczesna chromatografia cieczowa*, Gdańsk: Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej (2014).
- [99] O. Otłowska, M. Ślebioda, A. Kot-Wasik, J. Karczewski, M. Śliwka-Kaszyńska, *Molecules*, **23** (2018) 339.
- [100] P. Truchado, P. Vit, F. Ferreres, F. Tomas-Barberan, *J. Chromatogr. A*, **1218** (2011) 7601-7607.
- [101] Y. Quin, B. Gao, H. Shi, J. Cao, C. Yin, W. Lu, L. Yu, Z. Cheng, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **142** (2017) 113-124.
- [102] L.G. Troalen, A.S. Phillips, D.A. Pegg, P.E. Barran, A.N. Hulme, *Anal. Methods*, **6** (2014) 8915-8923.

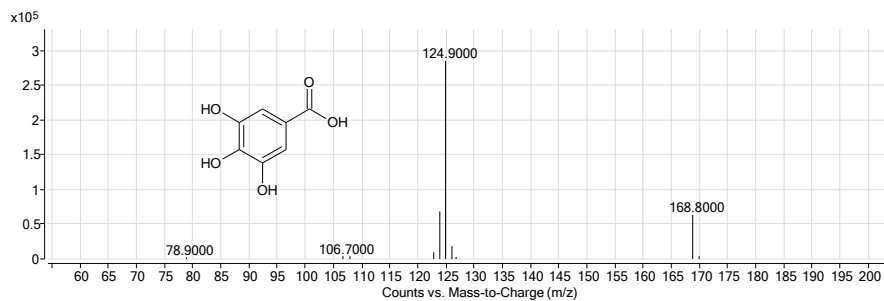
- [103] Y.I. Ma, Q.M. Li, H. Van den Heuvel, M. Claeys, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11** (1997) 1357-1364.
- [104] M.J. Jin, I.S. Kim, S.U. Rehman, M.S. Dong, C.S. Na, H.H. Yoo, *J. Chromatogr. Sci.*, **54** (2016) 390–396.
- [105] L. Valianou, K. Stathopoulou, I. Karapanagiotis, P. Magiatis, E. Pavlidou, A.L. Skaltsounis, Y. Chryssoulakis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394** (2009) 871–882.
- [106] J. Guo, D. Liu, D. Nikolic, D. Zhu, J.M. Pezzuto, R.B. van Breemen, *Drug MeTab. Dispos.*, **36** (2008) 461–468.
- [107] D.A. Peggie, J. Kirby, J. Poulin, W. Geniut, J. Romanuka, D.F. Wills, A. De Simone, A.N. Hulme, *Anal. Methods*, **10** (2018) 617-623.
- [108] A. Manhita, L. Balcaend, F. Vanhaecked, T. Ferreira, A. Candeias, C. B. Dias, *J. Cult. Herit.*, **15** (2014) 292–299.
- [109] A.N. Hulme, H. McNab, D.A. Peggie, A. Quye, *Phytochem.*, **66** (2005) 2766–2770.
- [110] R. Santos, J. Hallet, M. Conceicao Oliveira, J. Saraguca, M.S.J. Simmonds, M. Nebitt, *Dyes Pigm.*, **118** (2015) 129-136.
- [111] B. Szostek, J. Orska-Gawrys, I. Surowiec, M. Trojanowicz, *J. Chromatogr. A*, **1012** (2003) 179–192.
- [112] H.S. Choi, J.K. Kim, E.H. Cho, J.C. Kim, J.I. Kim, S.W. Kim, *BBRC*, **306** (2003) 930-936.
- [113] P. Peets, I. Leitoa, J. Pelt, S. Vahur, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **173** (2017) 175–181.
- [114] K. Długosz-Rygiel, *Studia i Materiały Archeologiczne*, **11** (2003) 105-139.
- [115] A. Restivo, I. Degano, E. Ribechini, J. Perez-Arantegui, M.P. Colombini, *Microsc. Microanal.*, **20** (2014) 1534-1543.
- [116] A. K. Samanta, A. Konar, *Dyeing of Textiles with Natural Dyes*, *Natural Dyes*, Edytor: E. A. Kumbasar, (2011), dostępne w Internecie: <http://www.intechopen.com/books/natural-dyes/dyeing-of-textiles-with-natural-dyes>
- [117] S. Akyuz, T. Akyuz, B. Cakan, S. Basaran, *J. Mol. Struct.*, **1073** (2014) 37–43.
- [118] P. Kakkar, B. Madhan, G. Shanmugamet, *SpringerPlus*, **596** (2014) 1-9.
- [119] A. Kicińska-Jakubowska, E. Bogacz, *Analysis of natural fibers with SEM application*, dostępne w Internecie: http://www.t-pot.eu/docs/Workshops/INFMP_3_Kicinska_SEM.pdf
- [120] I. Joosten, M.R. van Bommel, *Microchim. Acta*, **162** (2008) 433–446.
- [121] K. Pietrzak, M. Puchalski, A. Otlewska, H. Wrzosek, P. Guiamet, M. Piotrowska, B. Gutarowska, *J. Cult. Herit.*, **23** (2017) 138-147.

- [122] M. Wachowiak, *Pigmenty w historycznych farbach Jana Matejki z zachowanych tubek, palet i obrazów* [w:], D. Markowski, S. Kamiński, M. Wachowiak, Wybrane zagadnienia konserwacji i restauracji sztuki nowoczesnej, Toruń (2010) 103-116.
- [123] F. Carta, D. Vullo, A. Maresca, A. Scozzafava, C. Supuran, *Bioorg. & Med. Chem.*, **21** (2013) 1564-1569.
- [124] G.N. Patel, K.N. Triedi, *Synthetic Commun.*, **19** (1989) 1641-1647.
- [125] O. Otłowska, M. Ślebioda, M. Wachowiak, M. Śliwka-Kaszyńska, *Anal. Methods*, **1** (2017) 94-102.
- [126] L. Barros, M. Duenas, I. Ferreira, A.M. Carvalho, C. Santos Buelga, *Food Chem.*, **127** (2011) 169-173.
- [127] K. Lech, K. Witkoś, B. Wileńska, M. Jarosz, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407** (2015) 855-867.
- [128] I. Surowiec, B. Szostek, M. Trojanowicz, *J. Sep. Sci.*, **30** (2007) 2070-2079.
- [129] Analiza warsztatu Henryka Siemiradzkiego, dostępne w Internecie:
<http://mnk.pl/artukul/analiza-warsztatu-henryka-siemiradzkiego-na-podstawie-dziel-znajdujacych-sie-w-zbiorach-mnk-i-innych>
- [130] K. Lech, M. Jarosz, *Anal. Bioanal. Chem.*, **399** (2011) 3241-3251.
- [131] W. Ostrowski, L. Śniecikowska, M. Hoffmann, R. Frański, *J. Spectr.*, **2013** (2013) 1-8.
- [132] I. Karapanagiotis, A. Lakka, L. Valianou, Y. Chryssoulakis, *Microchim. Acta*, **160** (2008) 477-483.
- [133] I. Degano, M. Biesaga, M.P. Colombini, M. Trojanowicz, *J. Chromatogr. A*, **1218** (2011) 5837-5847.
- [134] Y. Sugano, Y. Matusushima, K. Tsuchiya, H. Aoki, M. Hirai, M. Shoda, *Biodegrad.*, **20** (2009) 433-440.
- [135] S. Andyleeb, A. Naima, A. Parmar, G.D. Robson, S. Ahmed, *Environ. Monit. Assess.*, **176** (2011) 459-604.
- [136] S. Ramesova, R. Sokolova, I. Degano, J. Bulickova, J. Zabka, M. Gal, *Anal. Bioanal.*, **402** (2012) 975-982.
- [137] K. Witkoś, K. Lech, M. Jarosz, *J. Mass Spectrom.*, **50** (2015) 1245-1251.

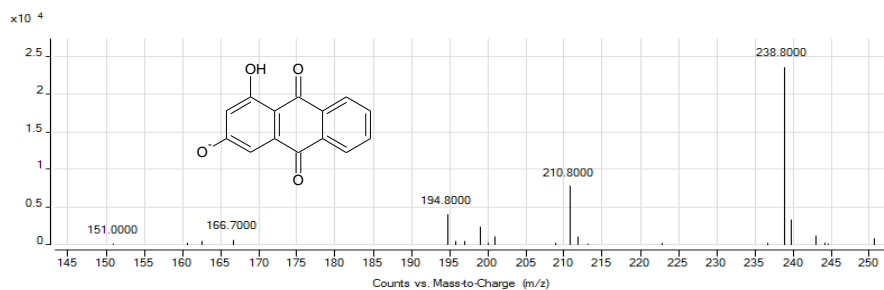
SUPLEMENT PRACY

WIDMA MAS ZIDENTYFIKOWANYCH SUBSTANCJI BARWIĄCYCH

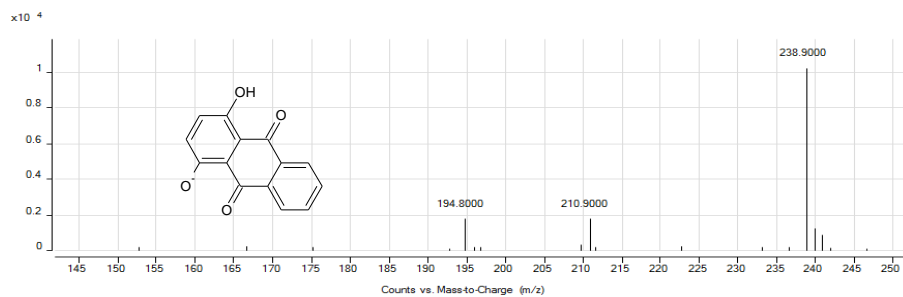
(widma zestawiono według rosnącej wartości m/z)



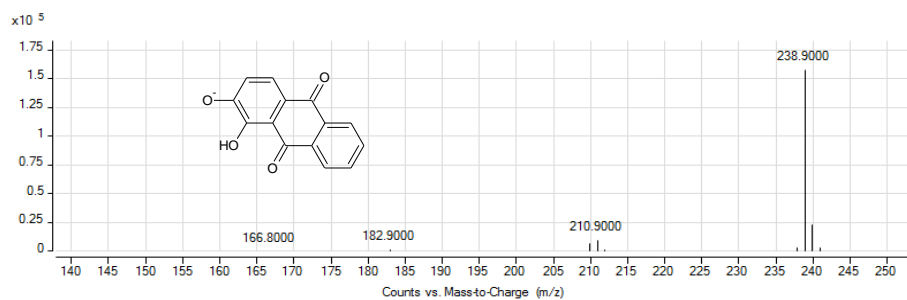
Rysunek S. 1. Kwas galusowy (m/z 169).



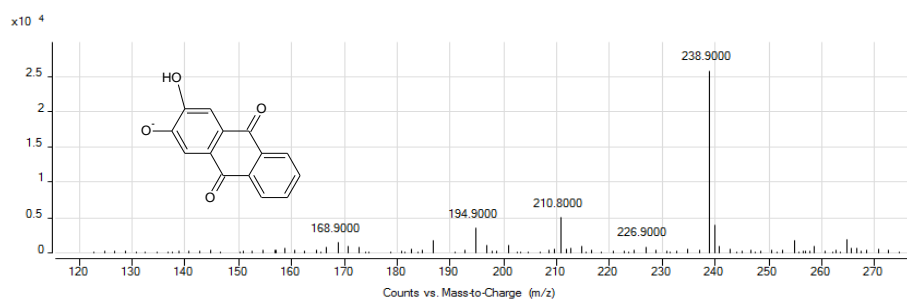
Rysunek S. 2. Ksantopurpuryna (m/z 239).



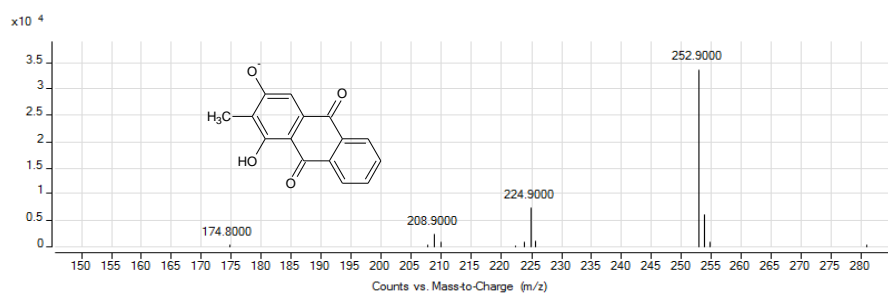
Rysunek S. 3. Chinizaryna (m/z 239).



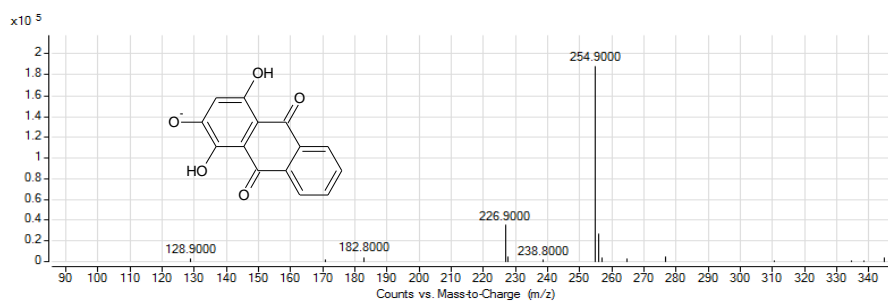
Rysunek S. 4. Alizaryna (m/z 239).



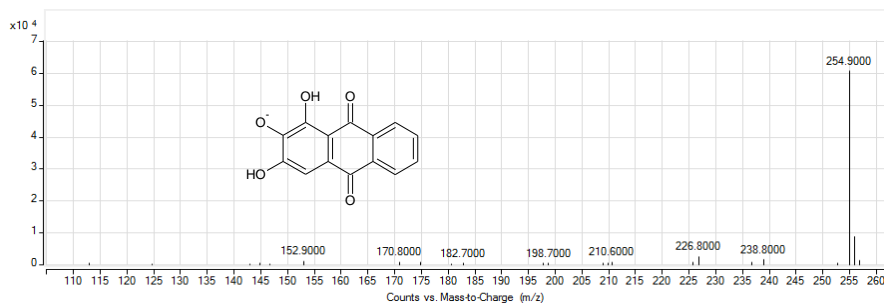
Rysunek S. 5. Hystazaryna (m/z 239).



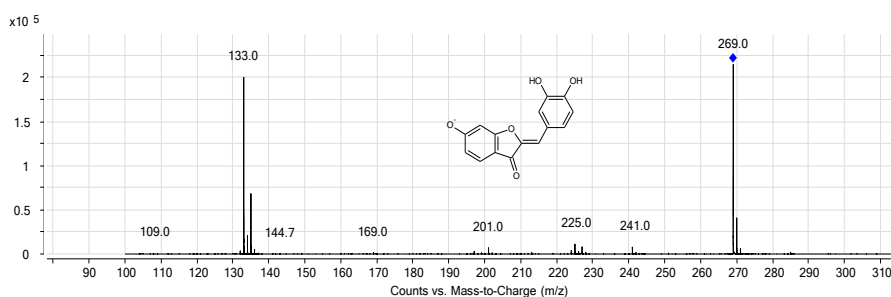
Rysunek S. 6. Rubiadyna (m/z 253).



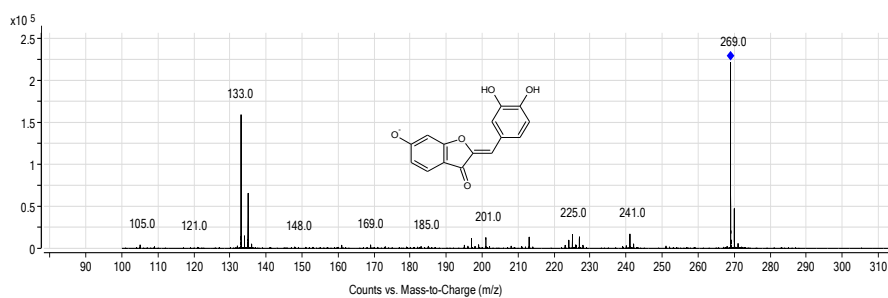
Rysunek S. 7. Purpuryna (m/z 255).



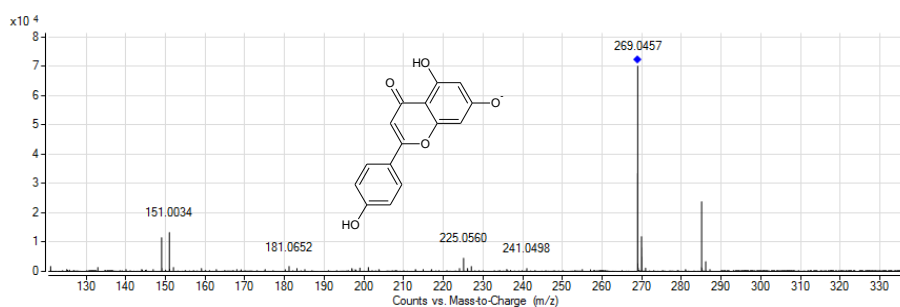
Rysunek S. 8. Antragallol (m/z 255).



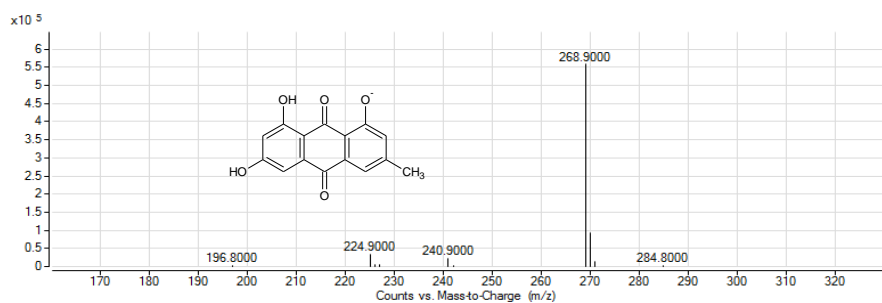
Rysunek S. 9. Izomer sulfuretyny (m/z 269).



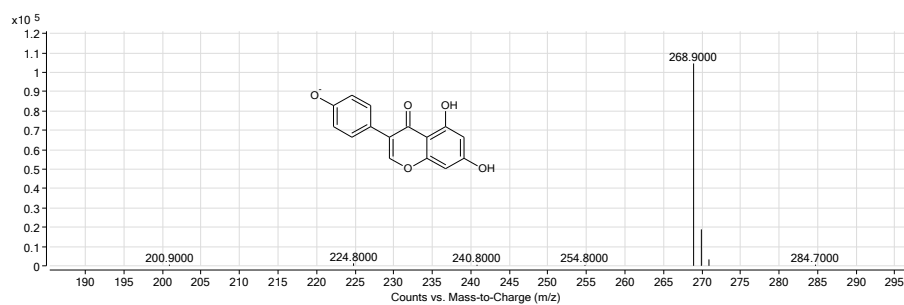
Rysunek S. 10. Sulfuretyna (m/z 269).



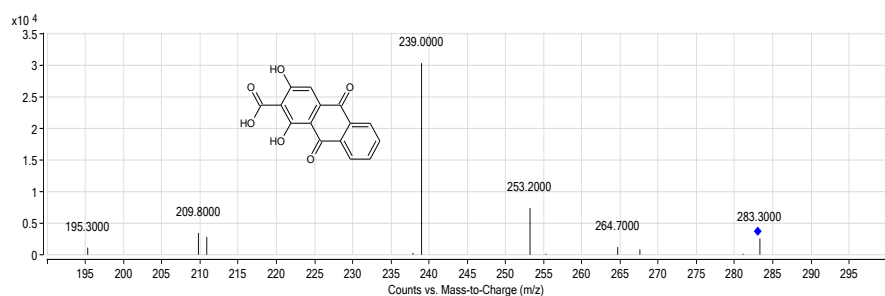
Rysunek S. 11. Apigenina (m/z 269).



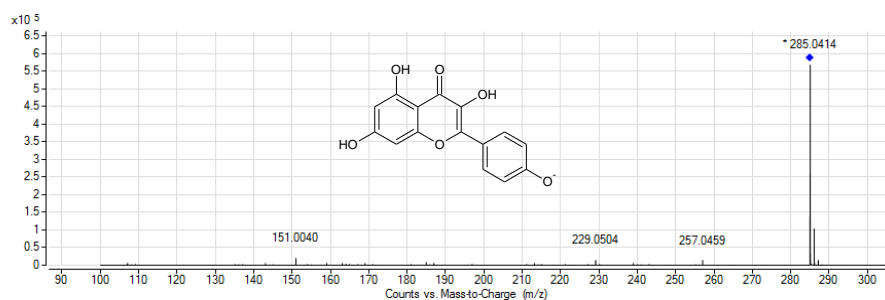
Rysunek S. 12. Emodyna (m/z 269).



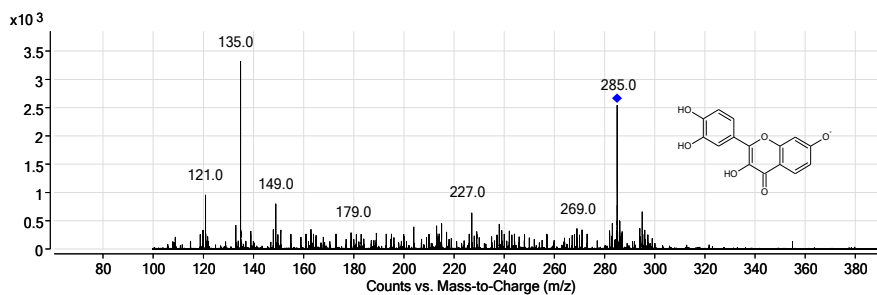
Rysunek S. 13. Genisteina (m/z 269).



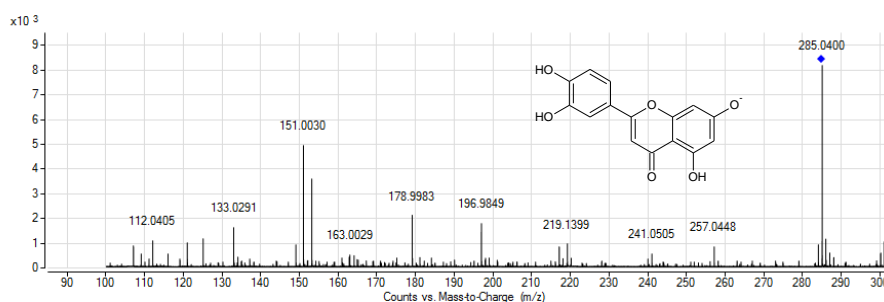
Rysunek S. 14. Munistyna (m/z 283).



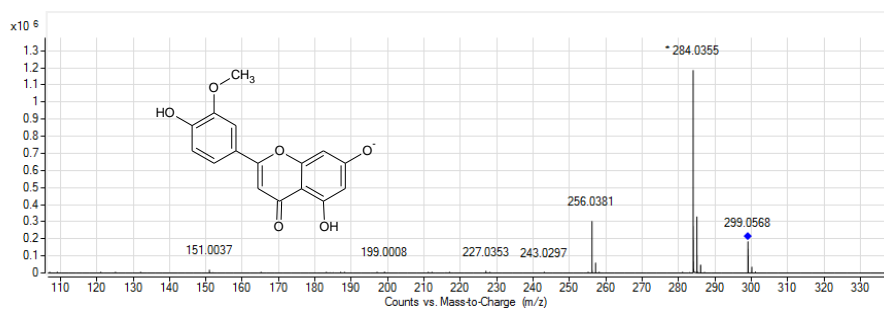
Rysunek S. 15. Kemferol (m/z 285).



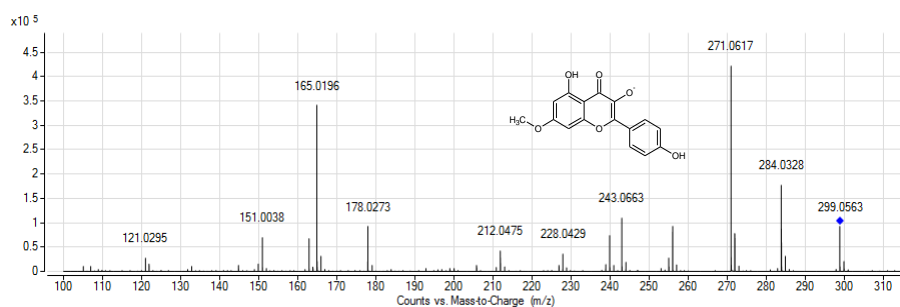
Rysunek S. 16. Fisteina (m/z 285).



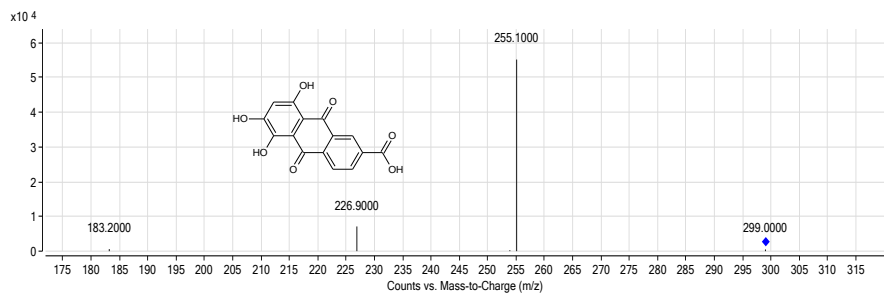
Rysunek S. 17. Luteolina (m/z 285).



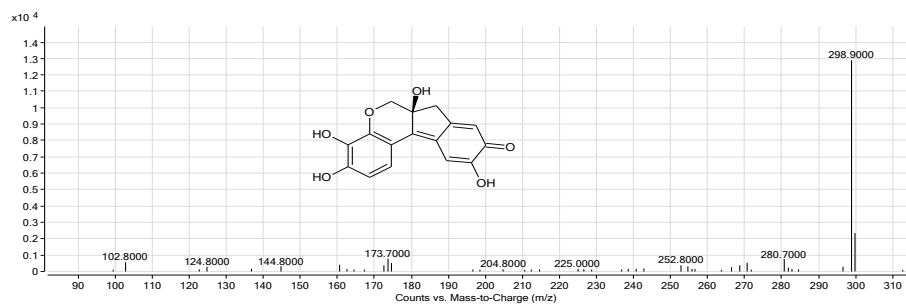
Rysunek S. 18. Chryzoeriol (m/z 299).



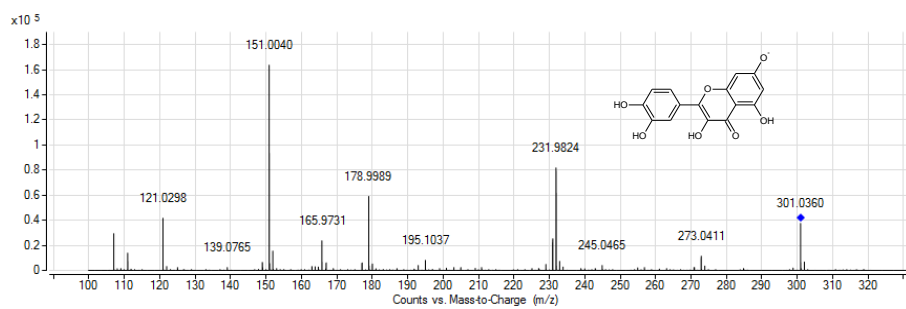
Rysunek S. 19. Ramnocytryna (m/z 299).



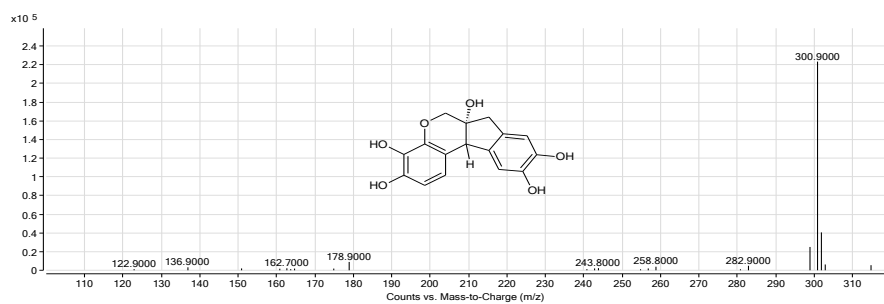
Rysunek S. 20. Pseudopurpuryna (m/z 299).



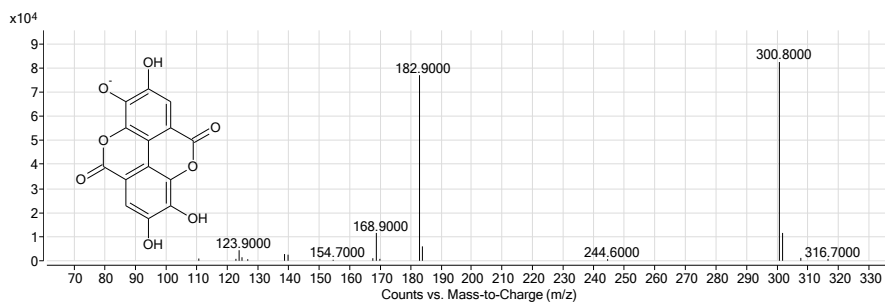
Rysunek S. 21. Hemateina (m/z 299).



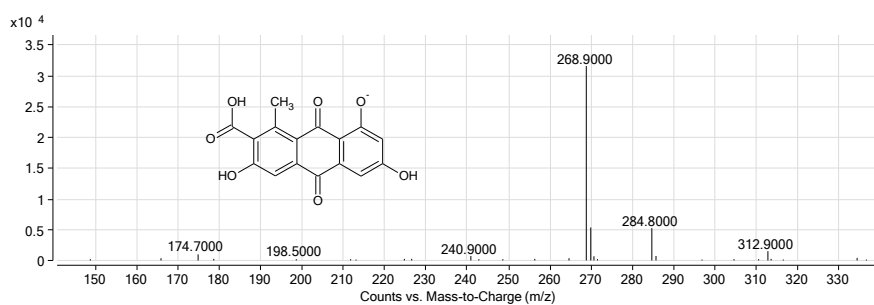
Rysunek S. 22. Kwercetyna (m/z 301).



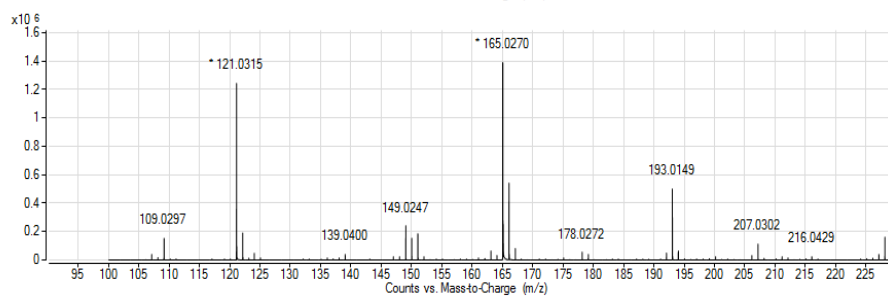
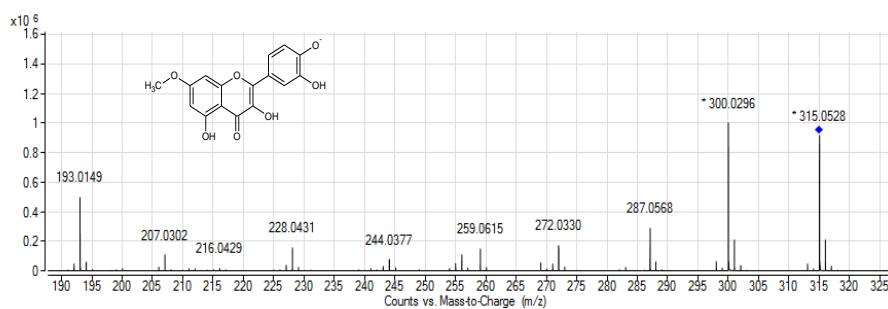
Rysunek S. 23. Hematoksylyna (m/z 301).



Rysunek S. 24. Kwas elagowy (m/z 301).

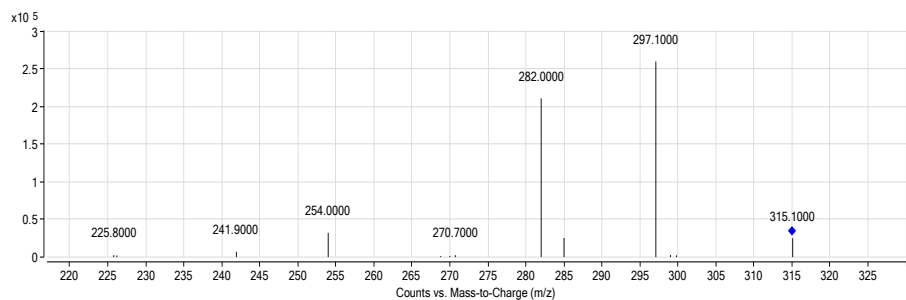


Rysunek S. 25. Kwas flawokermesowy (m/z 313).

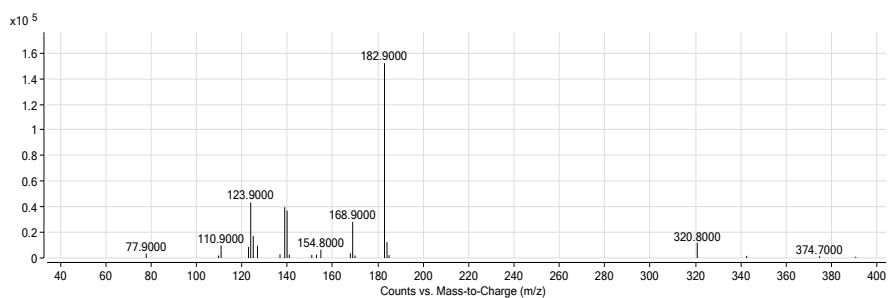


cd. widma mas

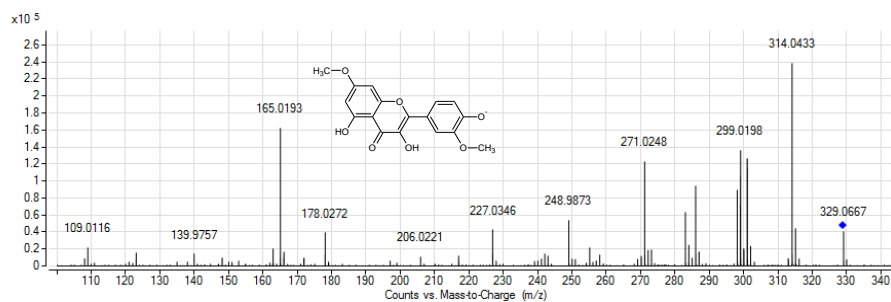
Rysunek S. 26. Ramnetyna (m/z 315).



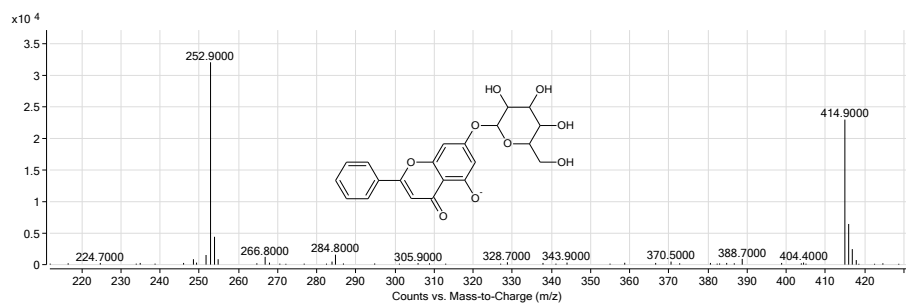
Rysunek S. 27. Niezidentyfikowany związek obecny w ekstrakcie z marzanki barwierskiej (m/z 315).



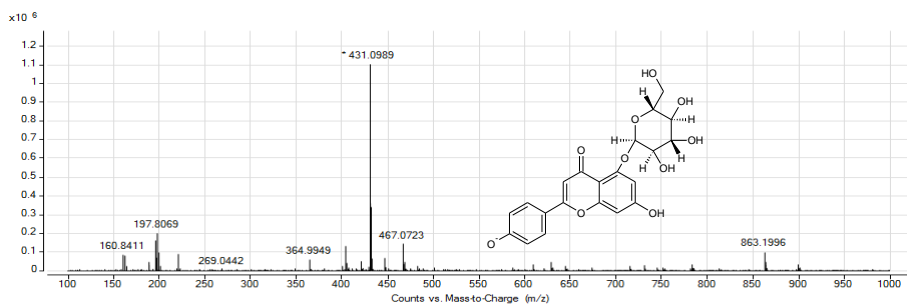
Rysunek S. 28. Produkt rozpadu polimeru kwasu galusowego (m/z 321).



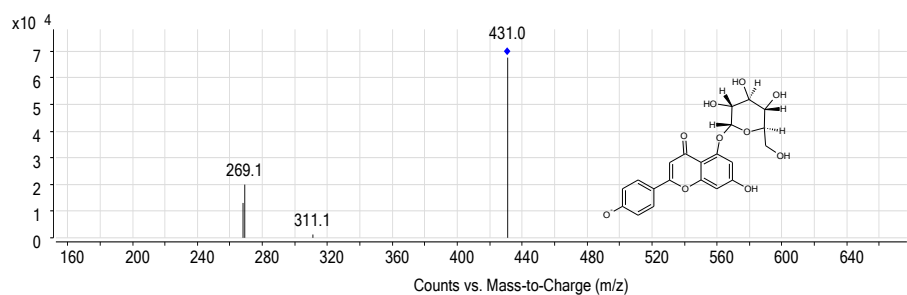
Rysunek S. 29. Ramnazyna (m/z 329).



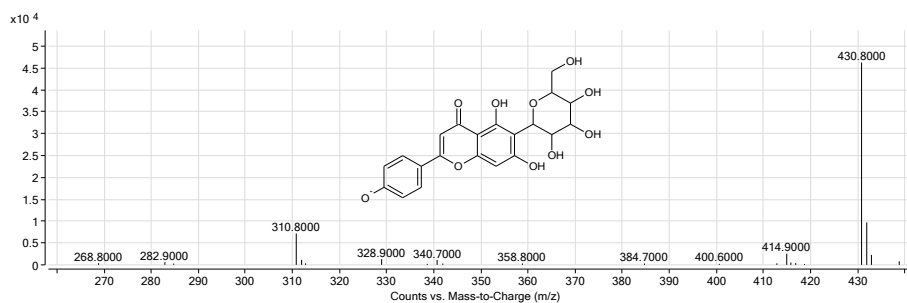
Rysunek S. 30. *O*-glukozyd chryzyny (m/z 415).



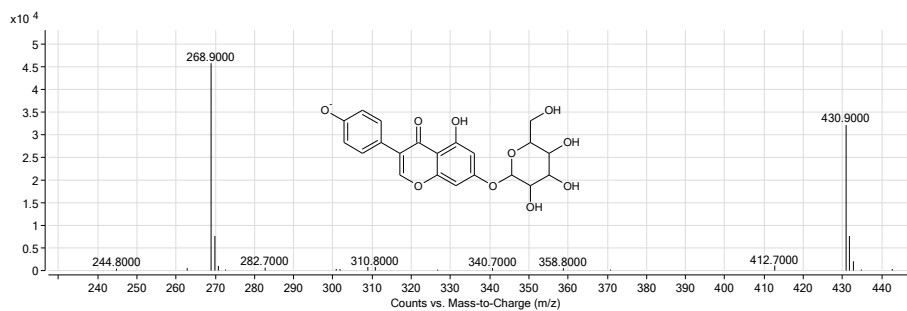
Rysunek S. 31. *O*-glukozyd genisteiny (m/z 431).



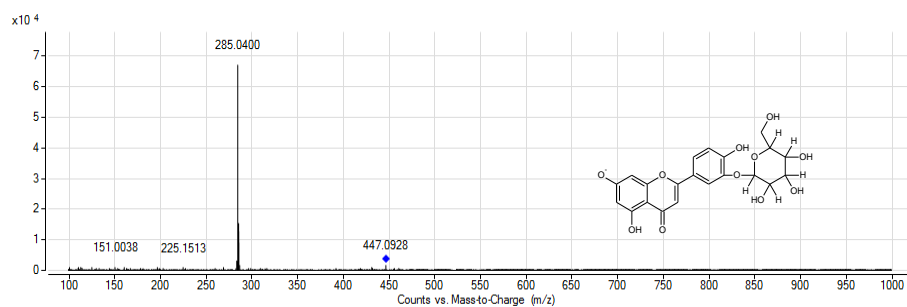
Rysunek S. 32. 7-*O*-glukozyd apigeniny (m/z 431).



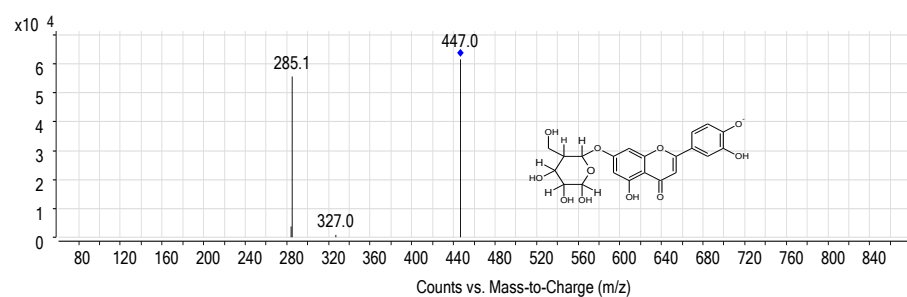
Rysunek S. 33. *C*-glukozyd apigeniny (m/z 431).



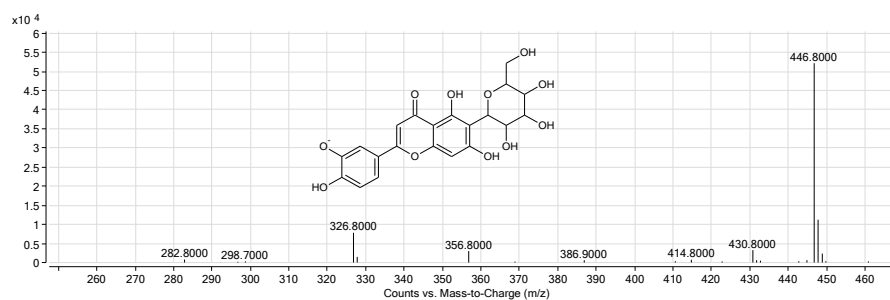
Rysunek S. 34. *O*-glukozyd genisteiny (m/z 431).



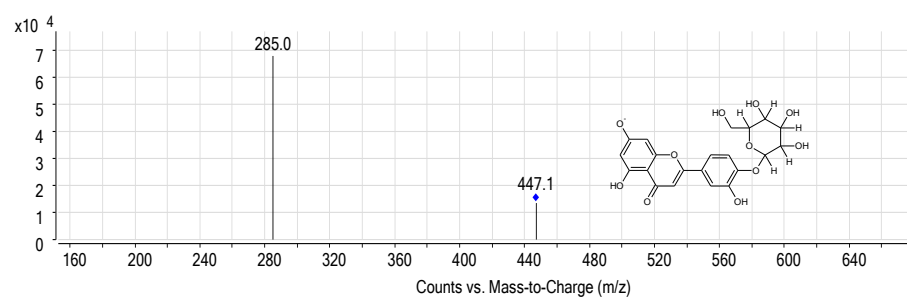
Rysunek S. 35. *O*-glukozyd luteoliny (m/z 447).



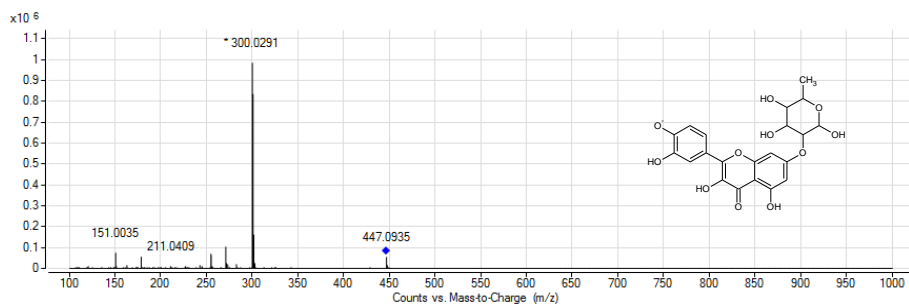
Rysunek S. 36. 7-*O*-glukozyd luteoliny (m/z 447).



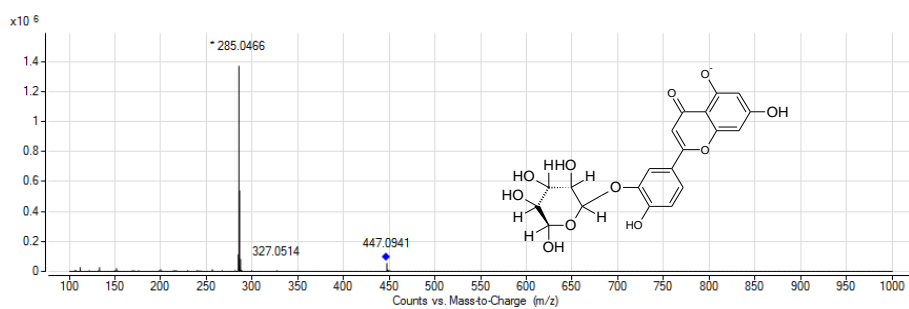
Rysunek S. 37. *C*-glukozyd luteoliny (m/z 447).



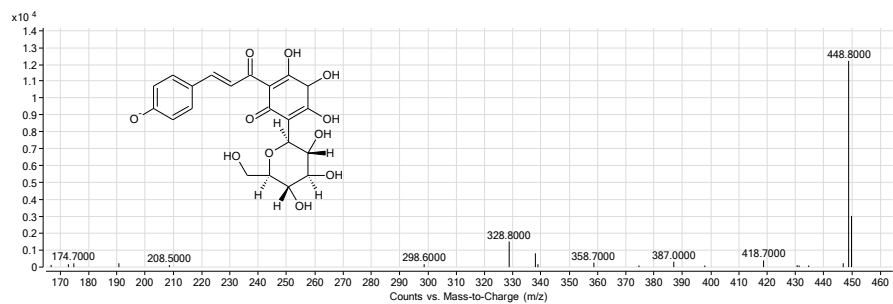
Rysunek S. 38. 4'-*O*-glukozyd luteoliny (m/z 447).



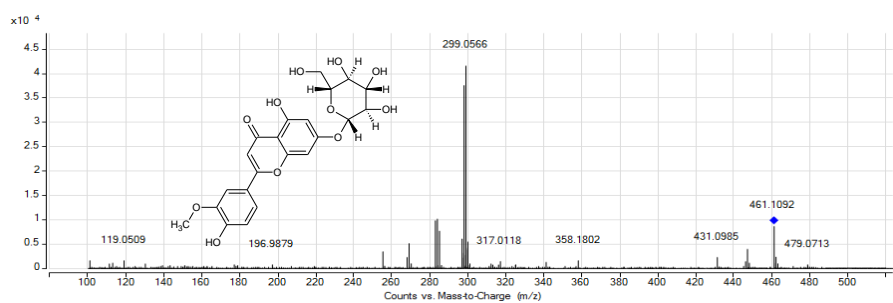
Rysunek S. 39. *O*-ramnozyd kwercetyny (m/z 447).



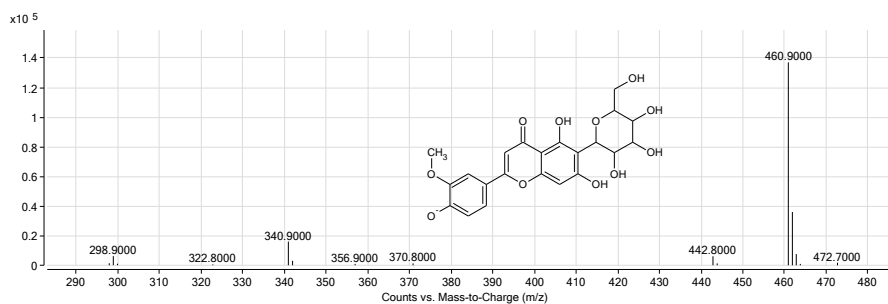
Rysunek S. 40. *O*-glukozyd luteoliny (m/z 447).



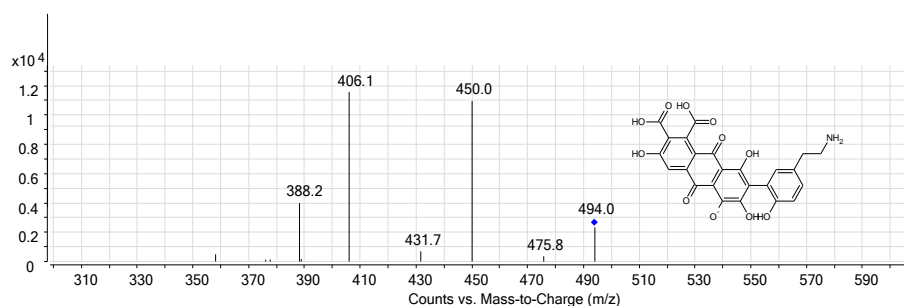
Rysunek S. 41. Hydroksysafflor pomniejszony o cząsteczkę glukozy (m/z 447).



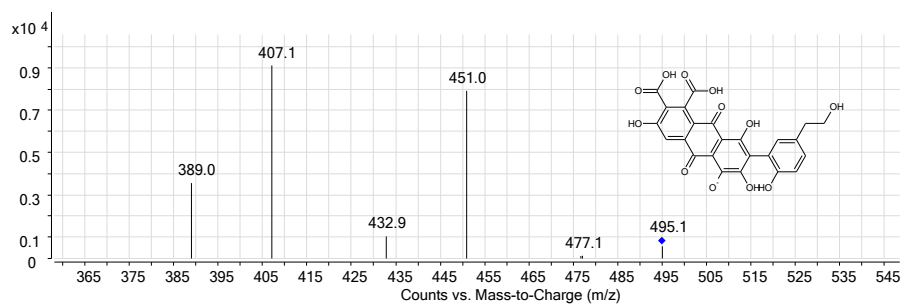
Rysunek S. 42. *O*-glukozyd chryzoeriolu (m/z 461).



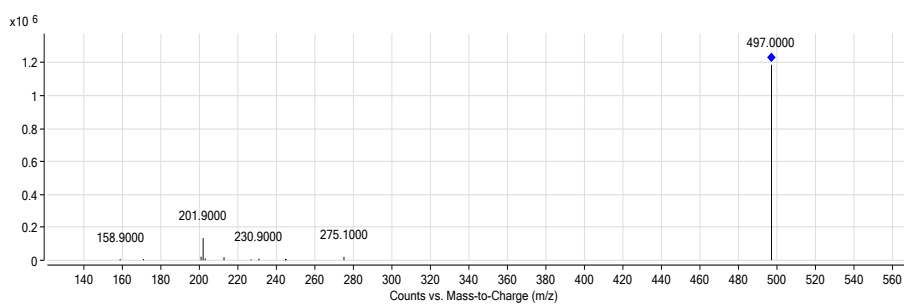
Rysunek S. 43. C-glukozyd chryzoeriolu (m/z 461).



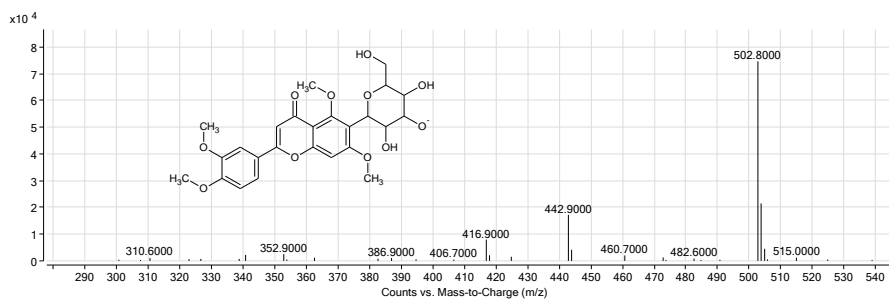
Rysunek S. 44. Kwas lakkainowy E (m/z 494).



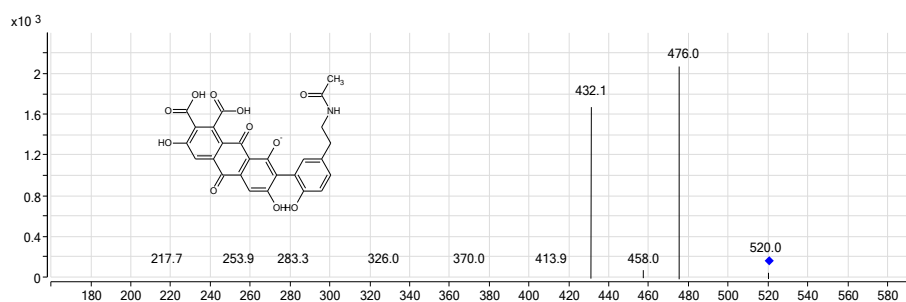
Rysunek S. 45. Kwas lakkainowy B (m/z 495).



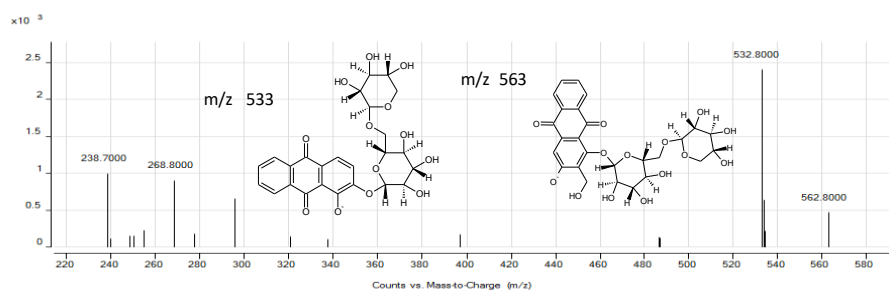
Rysunek S. 46. Niezidentyfikowany związek obecny w ekstrakcie z marzanki barwierskiej (m/z 497).



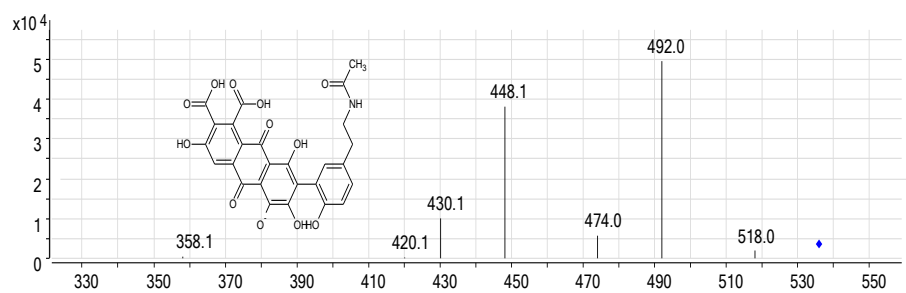
Rysunek S. 47. C-glukozyd pochodnej chryzoeriolu z trzema dodatkowymi grupami metylowymi (m/z 503).



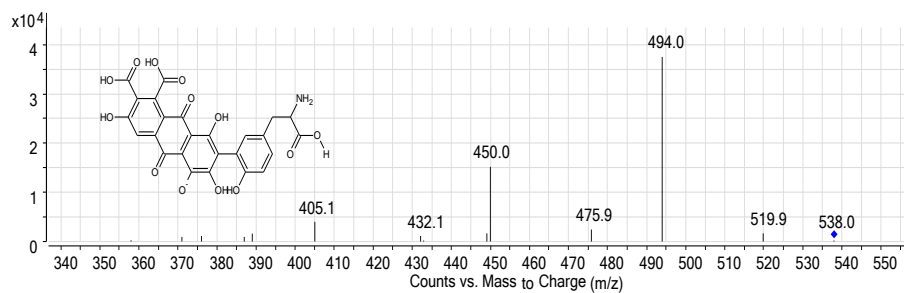
Rysunek S. 48. Kwas ksantolakkainowy A (m/z 520).



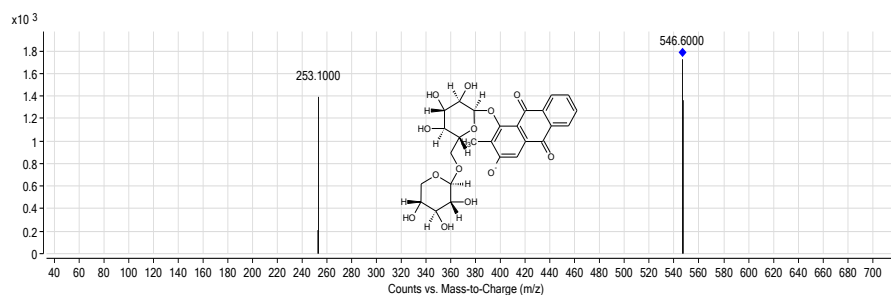
Rysunek S. 49. Prymwerozydy alizaryny (m/z 533) i lucydyny (m/z 563).



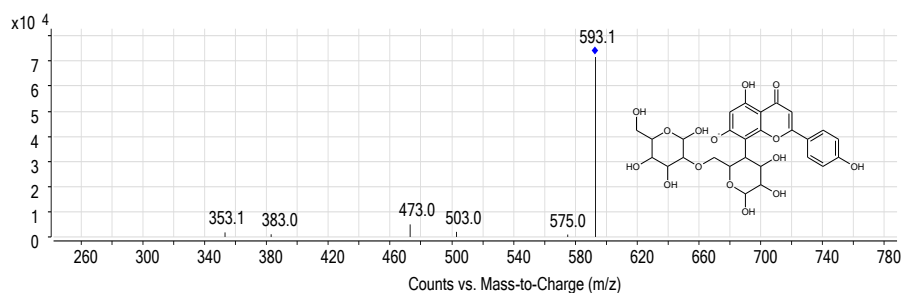
Rysunek S. 50. Kwas lakkainowy A (m/z 536).



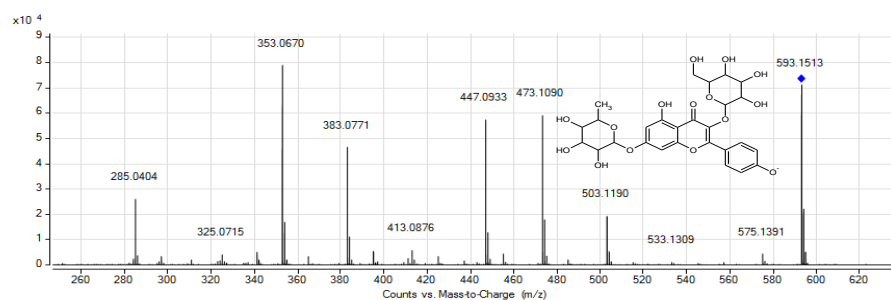
Rysunek S. 51. Kwas lakkainowy C (m/z 538).



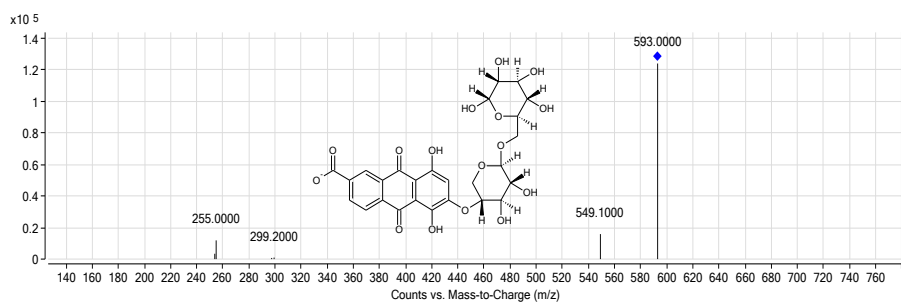
Rysunek S. 52. Prymwerozyd rubiadyny (m/z 547).



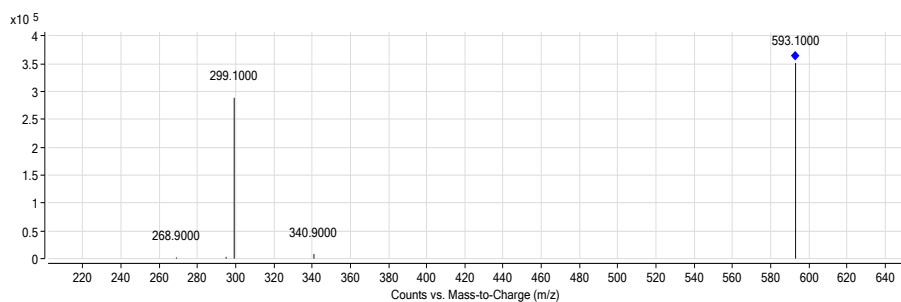
Rysunek S. 53. C-diglukozyd apigeniny (m/z 593).



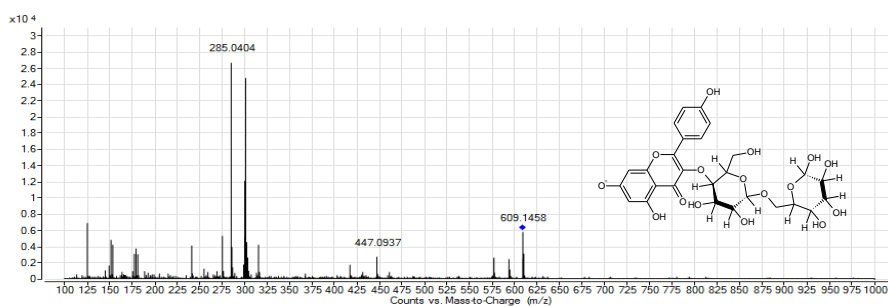
Rysunek S. 54. O-glukoza-ramnozyd kemferolu (m/z 593).



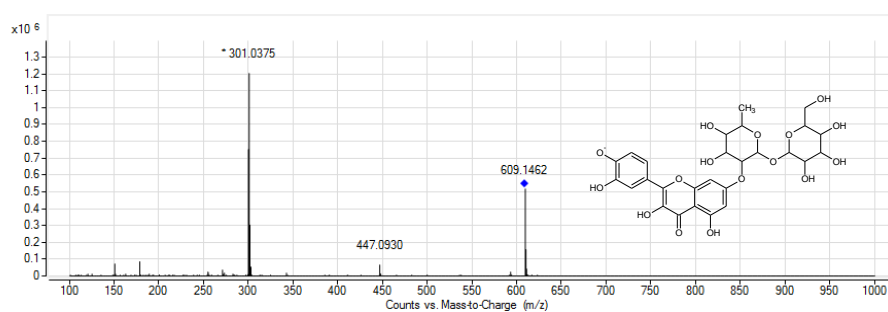
Rysunek S. 55. Prymwerozyd pseudopurpuryny (m/z 593).



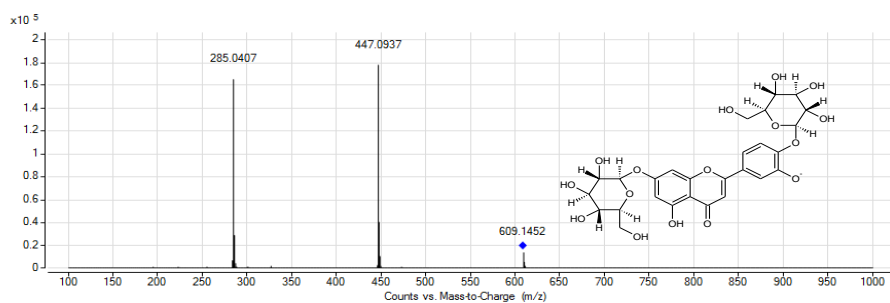
Rysunek S. 56. Prymwerozyd nieznanego antrachinonu obecny w ekstrakcie z marzanki barwierskiej (m/z 593).



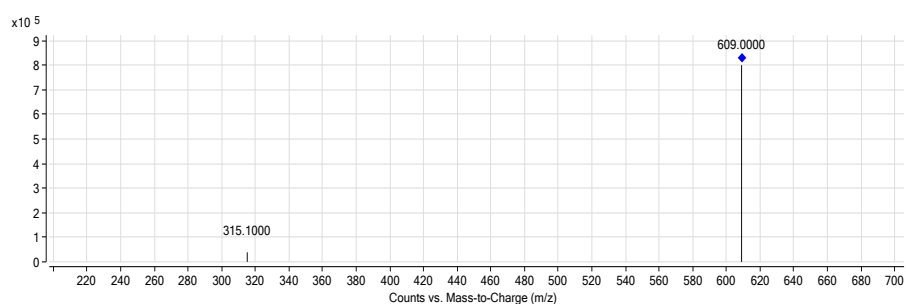
Rysunek S. 57. *O*-diglukozyd kemferolu (m/z 609).



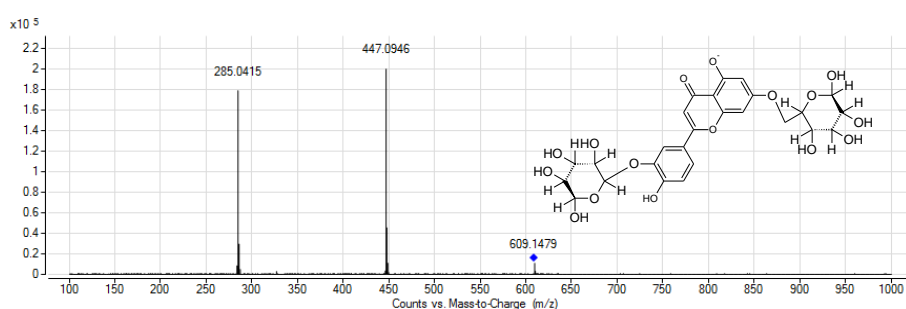
Rysunek S. 58. *O*-ramnozo-glukozyd kwercetyny (m/z 609).



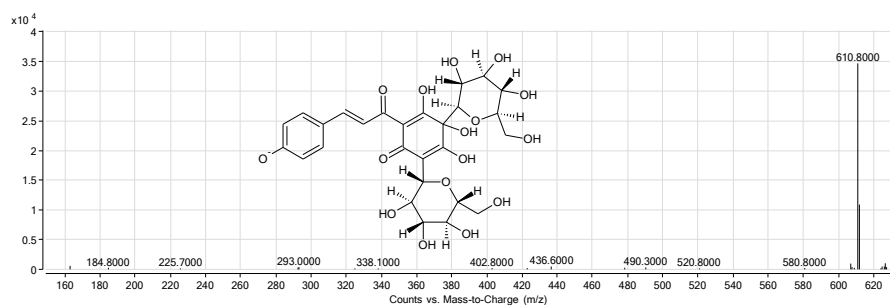
Rysunek S. 59. O-diglukozyd luteoliny(m/z 609).



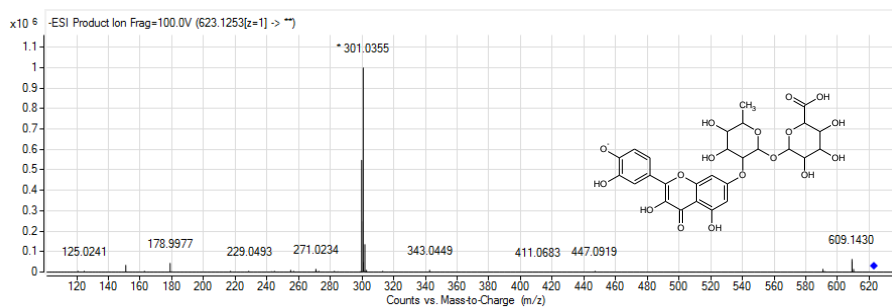
Rysunek S. 60. Prymwerozyd nieznanego flawonoidu obecny w ekstrakcie z marzanki barwierskiej (m/z 609).



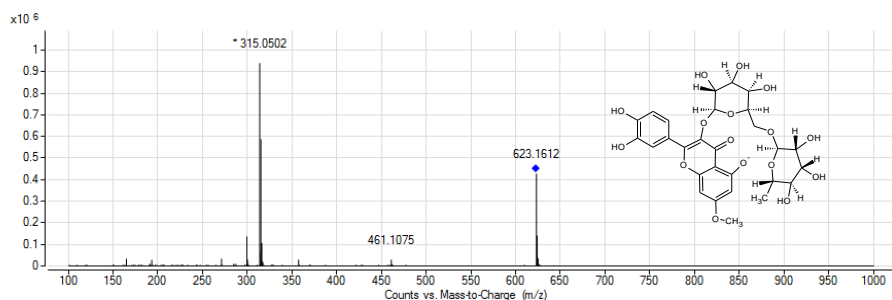
Rysunek S. 61. 3',7-diglukozyd luteoliny (m/z 609).



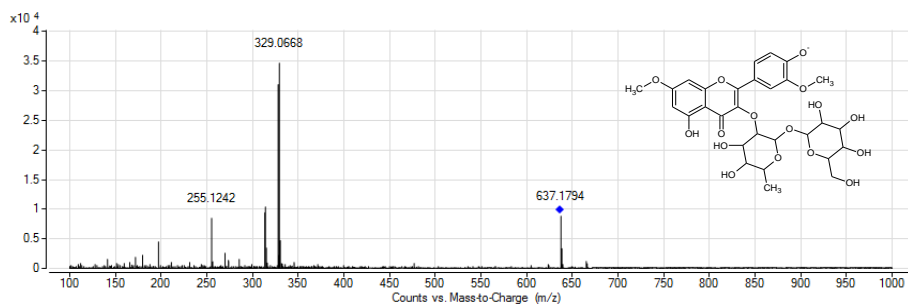
Rysunek S. 62. Hydroxysafflor A (m/z 611).



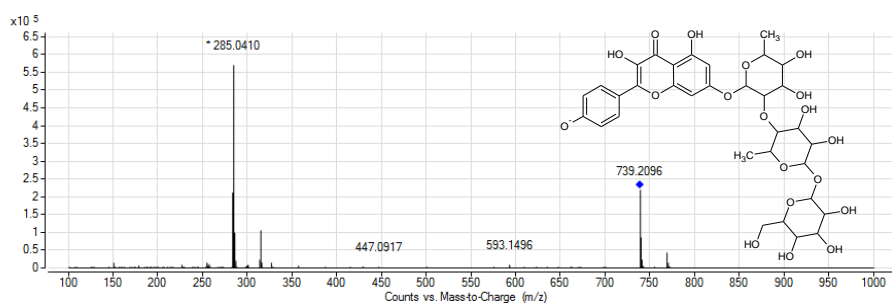
Rysunek S. 63. *O*-ramnozo-glukuronid kwercetyny (m/z 623).



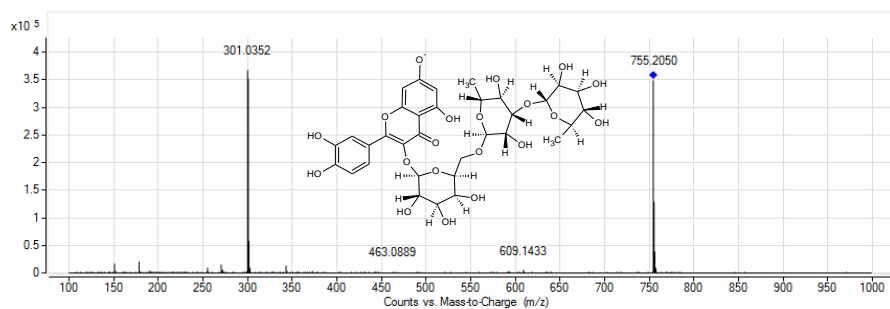
Rysunek S. 64. 3-*O*-ramnozo-glukozyd ramnetyny (m/z 623).



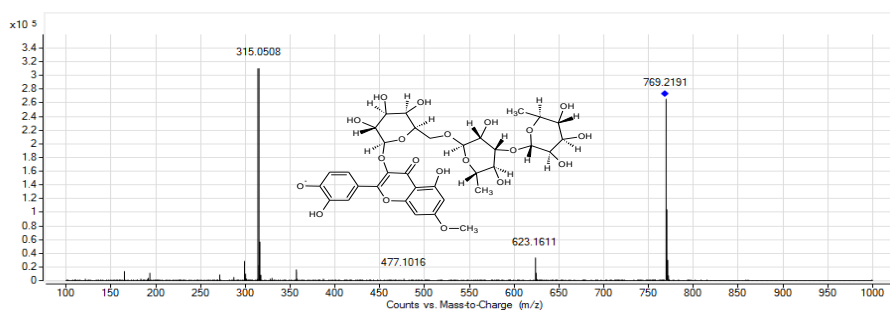
Rysunek S. 65. *O*-ramnozo-glukozyd ramnazyny (m/z 637).



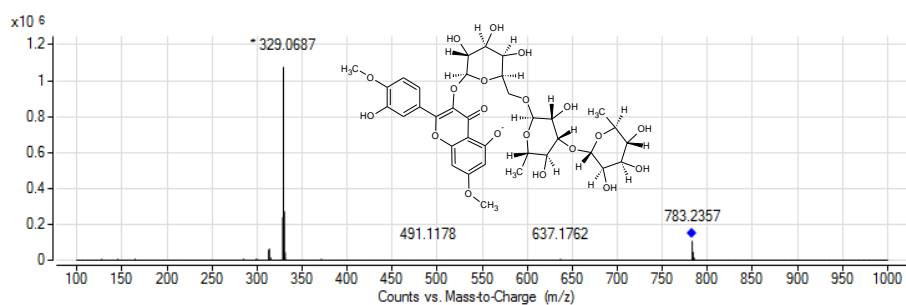
Rysunek S. 66. *O*-diramnozo-glukozyd kemferolu (m/z 739).



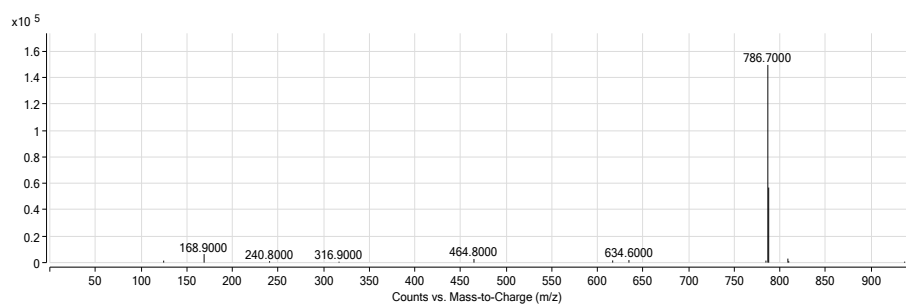
Rysunek S. 67. *O*-diramnozo-glukozyd kwercetyny (m/z 755).



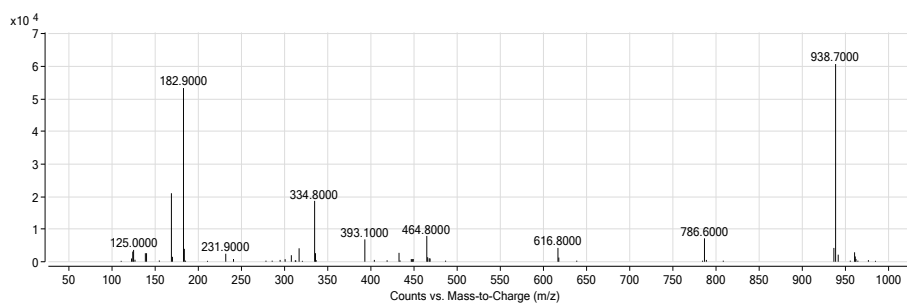
Rysunek S. 68. *O*-diramnozo-glukozyd ramnetyny (m/z 769).



Rysunek S. 69. *O*-diramnozo-glukozyd ramnazyny (m/z 783).

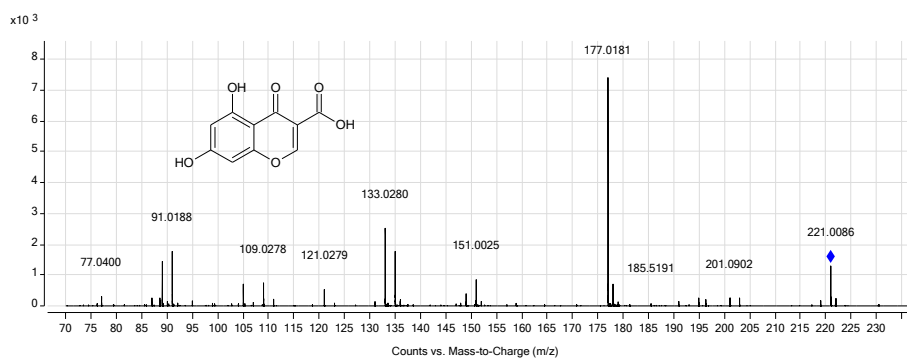


Rysunek S. 70. Produkt rozpadu polimeru kwasu galusowego (m/z 787).

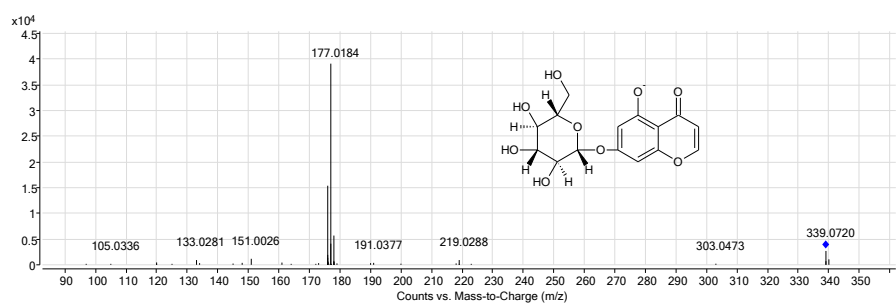


Rysunek S. 71. Produkt rozpadu polimeru kwasu galusowego (m/z 939).

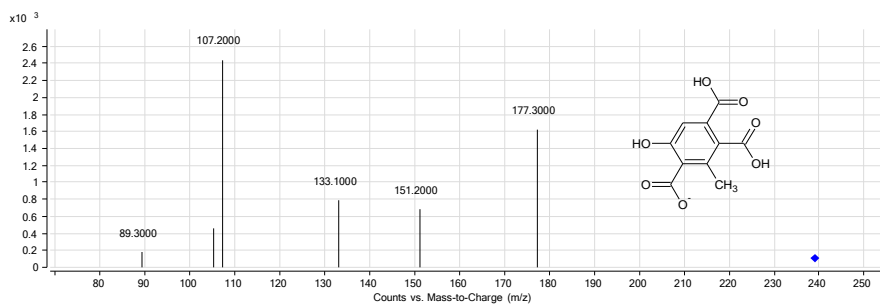
PRODUKTY FOTODEGRADACJI SUBSTANCJI BARWIĄCYCH



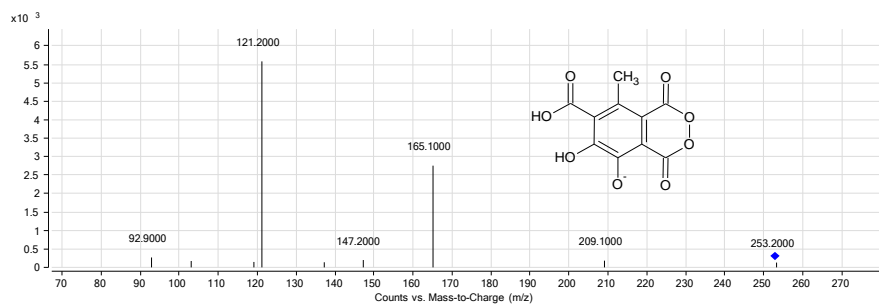
Rysunek S. 72. Produkt fotodegradacji Rez1 (m/z 221).



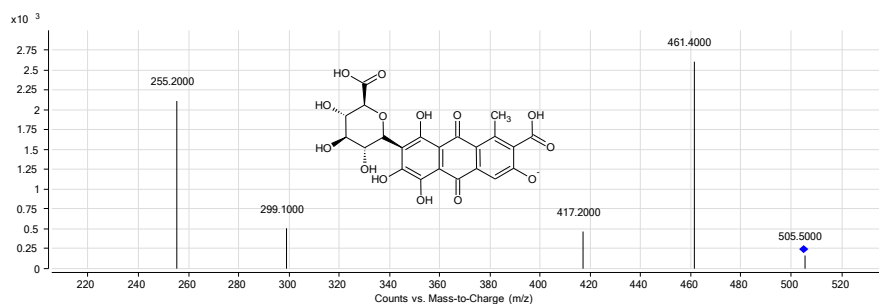
Rysunek S. 73. Produkt fotodegradacji Rez2 (m/z 339).



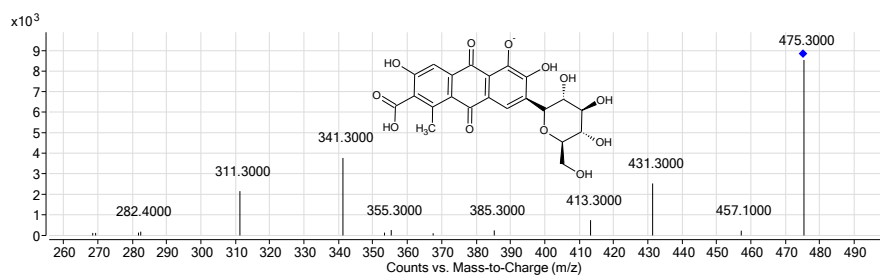
Rysunek S. 74. Produkt fotodegradacji K1 (m/z 239).



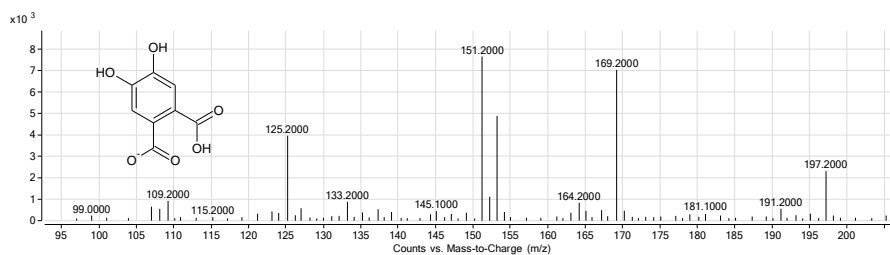
Rysunek S. 75. Produkt fotodegradacji K2 (m/z 253).



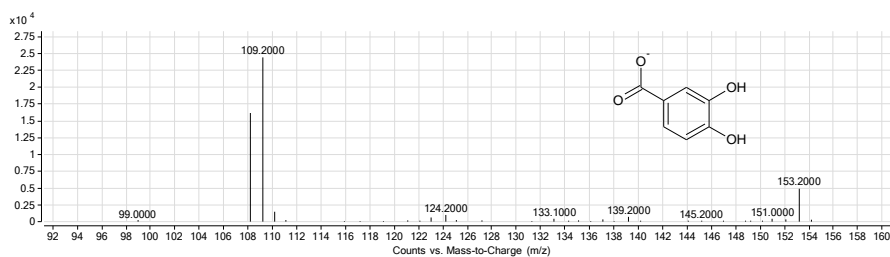
Rysunek S. 76. Produkt fotodegradacji K3 (m/z 505).



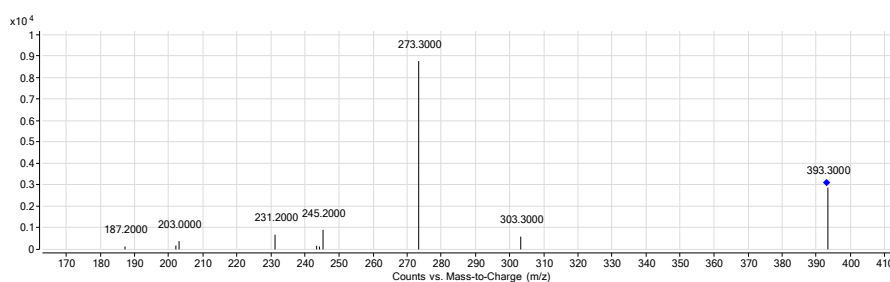
Rysunek S. 77. Produkt fotodegradacji K4 (m/z 475).



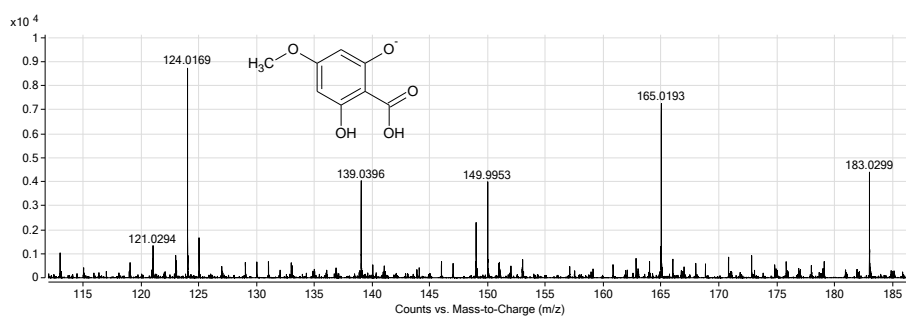
Rysunek S. 78. Produkt fotodegradacji Jag1 (m/z 197).



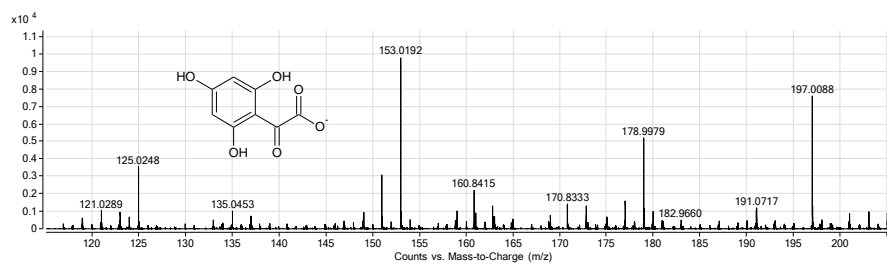
Rysunek S. 79. Produkt fotodegradacji Jag2 (m/z 153).



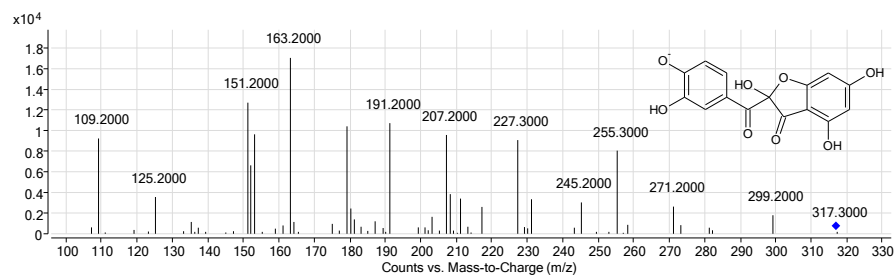
Rysunek S. 80. Produkt fotodegradacji Jag3 o nieznannej strukturze (m/z 393).



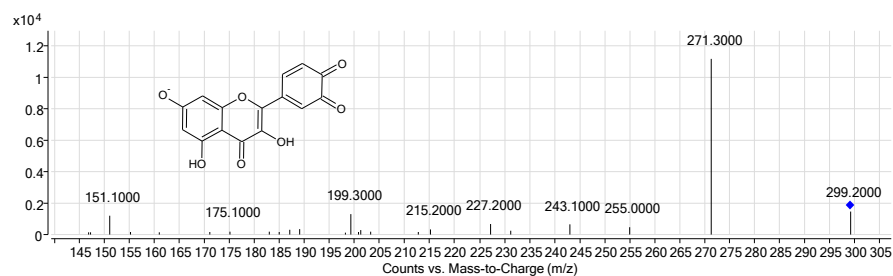
Rysunek S. 81. Produkt fotodegradacji Jag4 (m/z 183).



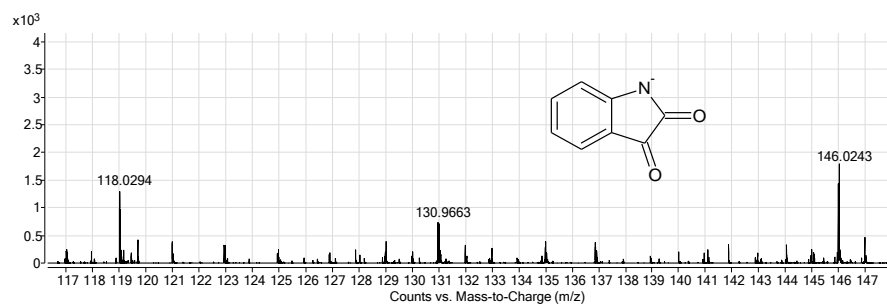
Rysunek S. 82. Produkt fotodegradacji Q1 (m/z 197).



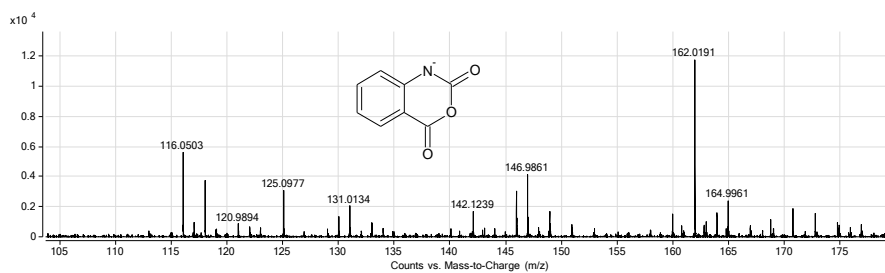
Rysunek S. 83. Produkt fotodegradacji Q2 (m/z 317).



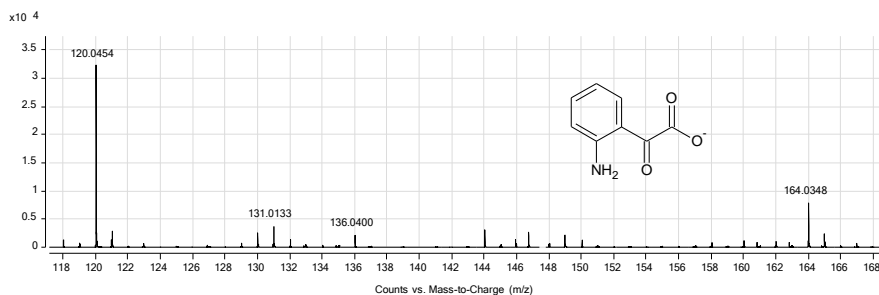
Rysunek S. 84. Produkt fotodegradacji Q3 (m/z 299).



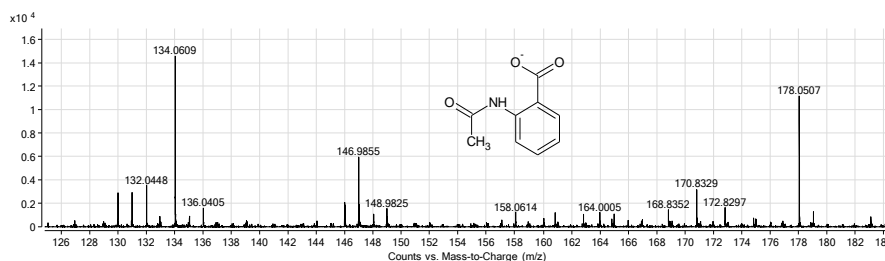
Rysunek S. 85. Produkt fotodegradacji In1 (m/z 146).



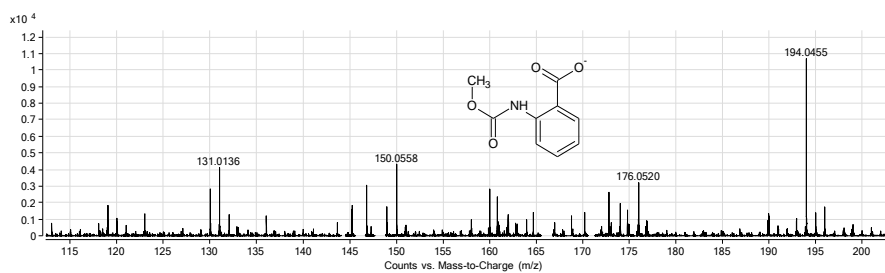
Rysunek S. 86. Produkt fotodegradacji In2 (m/z 162).



Rysunek S. 87. Produkt fotodegradacji In3 (m/z 164).



Rysunek S. 88. Produkt fotodegradacji In4 (m/z 178).



Rysunek S. 89. Produkt fotodegradacji In5 (m/z 194).