

Dr inż. Katarzyna Lech
– Wniosek w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

Załącznik nr 3:

AUTOREFERAT

***Metodologie analityczne do charakteryzowania
barwników organicznych stosowanych w
obiektach dziedzictwa kulturowego***

Warszawa, 2021

1. Dane naukowe wnioskodawcy

- 1.1. Imię i nazwisko: **Katarzyna Lech**
- 1.2. ORCID id: **0000-0003-4476-2261**
- 1.3. ResearcherID: **AAW-7496-2020**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- | | |
|-------------|--|
| 2011 | Doktor nauk chemicznych w dyscyplinie technologia chemiczna; Rada Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej; tytuł pracy: „ <i>Identyfikacja barwników stosowanych w dziełach sztuki za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrometrii mas</i> ”; promotor: prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz; rozprawa wyróżniona |
| 2006 – 2011 | Studia doktoranckie ; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny |
| 2006 | Magister inżynier technologii chemicznej; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny; tytuł pracy: „ <i>ACD/SpecDB – interaktywna baza widm i chromatogramów naturalnych barwników organicznych</i> ”; kierujący pracą: prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz |
| 2001 – 2006 | Jednolite studia magisterskie ; kierunek Technologia Chemiczna; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny |

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- | | |
|-------------|--|
| od 2012 | Adiunkt naukowo-dydaktyczny, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny |
| 2009 – 2011 | Asystent , Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny |

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

Cykl publikacji o tytule „**Metodologie analityczne do charakteryzowania barwników organicznych stosowanych w obiektach dziedzictwa kulturowego**”.

Na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe, składa się 11 prac [H1–H11] opublikowanych w latach 2013–2021 w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* (JCR) lub z listy czasopism punktowanych Ministerstwa Edukacji i Nauki, w których jestem autorem lub współautorem.

Oświadczenia, określające indywidualny wkład pracy, zarówno mój, jak i współautorów, stanowią kolejno treść Załączników 5 i 6 do wniosku.

* – autor korespondencyjny; **IF** – współczynnik Impact Factor wg roku publikacji lub w przypadku jego braku, opublikowany w roku 2021; **MEiN** – liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki wg listy czasopism z dnia 01.12.2021; **C^{WoS}** – liczba cytowań (bez autocytowań) na dzień 15.12.2021 wg bazy Web of Science; **C^S** – liczba cytowań (bez autocytowań) na dzień 15.12.2021 wg bazy Scopus

[H1] **K. Lech**, E. Wilicka, J. Witowska-Jarosz, M. Jarosz*: *Early synthetic dyes – a challenge for tandem mass spectrometry*, Journal of Mass Spectrometry 2013, 48, 141–147, DOI:10.1002/jms.3090

IF = 3,214 MEiN = 70 C^{WoS} = 25 (25) C^S = 25 (25)

[H2] **K. Lech**, K. Witkoś, M. Jarosz*: *HPLC–UV–ESI MS/MS identification of the color constituents of sawwort (Seratula tinctoria L.)*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 2014, 406, 3703–3708, DOI:10.1007/s00216-013-7589-3

IF = 3,578 MEiN = 70 C^{WoS} = 18 (15) C^S = 18 (15)

[H3] K. Witkoś, **K. Lech**, M. Jarosz*: *Identification of degradation products of indigoids by tandem mass spectrometry*, Journal of Mass Spectrometry 2015, 50, 1245–1251, DOI:10.1002/jms.3641

IF = 2,379 MEiN = 70 C^{WoS} = 10 (8) C^S = 11 (9)

[H4] **K. Lech**, K. Witkoś, B. Wileńska, M. Jarosz*: *Identification of unknown colorants in pre-Columbian textiles dyed with American cochineal (Dactylopius coccus Costa) with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 2015, 407, 855–867, DOI:10.1007/s00216-014-8107-y

IF = 3,436 MEiN = 70 C^{WoS} = 27 (23) C^S = 26 (22)

[H5] **K. Lech***, M. Jarosz: *Identification of Polish cochineal (Porphyrophora polonica L.) in historical textiles by high-performance liquid chromatography coupled with spectrophotometric and tandem mass spectrometric detection*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 2016, 408, 3349–3358, DOI:10.1007/s00216-016-9408-0

IF = 3,125 MEiN = 70 C^{WoS} = 24 (21) C^S = 26 (22)

[H6] D. Dąbrowski, **K. Lech***, M. Jarosz: *Capillary-HPLC with tandem mass spectrometry in analysis of alkaloid dyestuffs – a new approach*, Electrophoresis 2018, 39, 1276–1283, DOI:10.1002/elps.201700349

IF = 2,569 MEiN = 70 C^{WoS} = 7 (4) C^S = 7 (4)

- [H7] A. Klisińska-Kopacz*, **K. Lech**, J. M. del Hoyo-Meléndez, A. Mendys, A. Jaworucka-Drath, B. Łydzba-Kopczyńska: *Provenance studies of Kościuszko banknotes — One of the oldest paper banknotes in Europe — Using Raman spectroscopy in conjunction with other analytical techniques*, Journal of Raman Spectroscopy 2020, 51, 1903–1912, DOI:10.1002/jrs.5710
 $IF = 3,133$ $MEiN = 70$ $C^{WoS} = 1 (1)$ $C^S = 1 (1)$
- [H8] **K. Lech***: *Universal analytical method for characterization of yellow and related natural dyes in liturgical vestments from Krakow*, Journal of Cultural Heritage 2020, 46, 108–118, DOI:10.1016/j.culher.2020.04.011
 $IF = 2,955$ $MEiN = 100$ $C^{WoS} = 3 (1)$ $C^S = 3 (1)$
- [H9] **K. Lech***: *Dataset supporting the identification of natural dyes in yellow, orange, brown and green fibres from Krakow liturgical vestments*, Data in Brief 2020, 31, 105735, DOI:10.1016/j.dib.2020.105735
 $IF = brak$ $MEiN = 40$ $C^{WoS} = 3 (2)$ $C^S = 3 (2)$
- [H10] **K. Lech***, E. Fornal: *A mass spectrometry-based approach for characterization of red, blue, and purple natural dyes*, Molecules 2020, 25, 3223, 1–22, DOI:10.3390/molecules25143223
 $IF = 4,411$ $MEiN = 140$ $C^{WoS} = 4 (3)$ $C^S = 4 (3)$
- [H11] **K. Lech***, J. Nawała, S. Popiel: *Mass spectrometry for investigation of natural dyes in historical textiles: unveiling the mystery behind the safflower-dyed fibers*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2021, 32, 2552–2566, DOI:10.1021/jasms.1c00195
 $IF = 3,109$ $MEiN = 70$ $C^{WoS} = 0 (0)$ $C^S = 0 (0)$

W **8** publikacjach z cyklu jestem pierwszym autorem, w **6** pełnię funkcję autora korespondencyjnego, a **2** są w pełni mojego autorstwa.

Sumaryczne wskaźnik jednotematycznego cyklu publikacji **H1-H11** wchodzącego w skład osiągnięcia habilitacyjnego:

- Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* wg listy *Journal Citation Reports* (zgodnie z rokiem opublikowania lub w przypadku jego braku, opublikowany w roku 2021): **IF_Σ = 31,909**
- Sumaryczna liczba punktów wg listy czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki (z dnia 01.12.2021): **MEiN_Σ = 840**

- Sumaryczna liczba cytowań na dzień 15.12.2021 wg bazy *Web of Science*: $\Sigma C^{WoS} = 122$
- Sumaryczna liczba cytowań niezależnych (bez autocytowań) na dzień 15.12.2021 wg bazy *Web of Science*: $\Sigma C^{WoS}_{BA} = 103$
- Sumaryczna liczba cytowań na dzień 15.12.2021 wg bazy *Scopus*: $\Sigma C^S = 124$
- Sumaryczna liczba cytowań niezależnych (bez autocytowań) na dzień 15.12.2021 wg bazy *Scopus*: $\Sigma C^S_{BA} = 104$

Omówienie osiągnięć

Chemia analityczna jest dziedziną nauki z natury interdyscyplinarną. Charakter ten wynika nie tylko z wykorzystywania w nowoczesnych technikach pomiarowych różnych zjawisk fizykochemicznych, ale przede wszystkim z faktu udziału chemii analitycznej w rozwoju wielu dyscyplin naukowych. Trudno sobie wyobrazić ochronę środowiska, toksykologię czy materiałoznawstwo bez obecności chemii analitycznej. A zatem z jednej strony wnosi ona nowe elementy do metodologii badawczej, z drugiej zaś nie może istnieć bez praktycznych zastosowań. Skutkiem tego chemia analityczna wkroczyła także do świata sztuki, odpowiadając na zapotrzebowanie zgłaszane przez przedstawicieli nauk humanistycznych, i dała tym samym początek nowej dziedzinie wiedzy jaką jest archeometria.

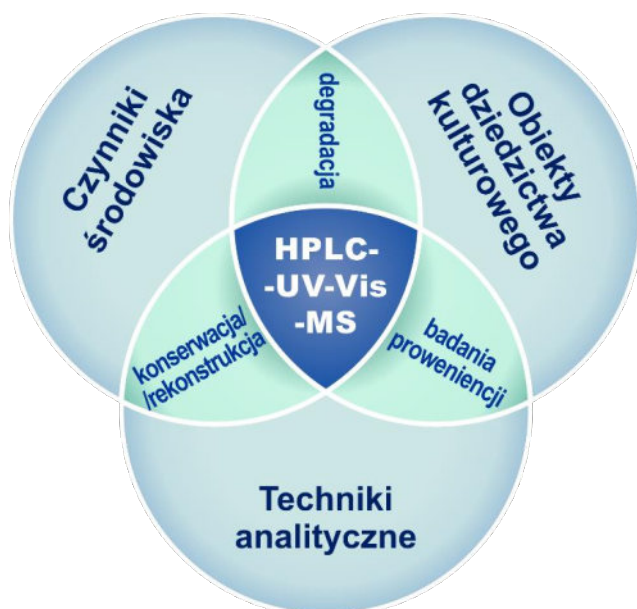
Jednym z największych wyzwań stojących przed współczesnym muzealnictwem jest systematyczne i powszechne stosowanie badań archeometrycznych w celu zgłębienia istoty obiektów, a następnie wykorzystania tak zdobytej wiedzy do przybliżenia ich masowemu odbiorcy oraz ich ochrony. Stosowanie technik instrumentalnych do badania dzieł sztuki wiąże się jednak ze zmianą spojrzenia na przedmioty zabytkowe. Dotąd były one postrzegane jako obiekty analizy historyczno-filologicznej, która oddalała badaczy od przedmiotu badań, pomijając lub nie zauważając jego materialnego kształtu. Rozwój nauk technicznych i metod badawczych pozwolił na głębsze wniknięcie w strukturę przedmiotu i na zbliżenie się do jego fizycznej istoty. Dzieło sztuki stało się nie tylko świadectwem stylu danej epoki, ale także odzwierciedleniem etapów rozwoju różnych technologii stosowanych przy jego tworzeniu. Współczesne spojrzenie na obiekty dziedzictwa kulturowego pozwala zauważyć nie tylko poziom artystyczny, wartościujący jakość dzieła, ale także jego zaawansowanie technologiczne, które często jest potwierdzeniem jakości warsztatowej, m.in. stosowanych surowców i materiałów poddawanych obróbce w procesie twórczym. Tak więc dzieło sztuki to egemplum technologiczne, zawierające w sobie, komplementarny wobec badań formalnych, materiał analityczny, który, przy zastosowaniu odpowiednich metod z zakresu archeometrii oraz właściwej interpretacji wyników, pozwala na uzyskanie informacji ważnych dla badacza sztuki, konserwatora, historyka kultury materialnej lub technologa.

A zatem badania dzieł sztuki nie ograniczają się obecnie do analizy historycznej bądź artystycznej wartości dzieła. Zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych do identyfikacji barwników w obiektach zabytkowych, a następnie konfrontacja otrzymanych wyników z wiedzą historyków sztuki pozwalają nie tylko na poznanie charakteru obiektu oraz technologii jego produkcji, ale także na ustalenie zakresu prac konserwatorskich, określenie jego wieku, pochodzenia czy autentyczności (Rysunek 1).

Barwa – jako dopełnienie kształtu – jest najistotniejszym składnikiem wrażeń wzrokowych. Stosowanie barwników sięga początków historii ludzkości. Umiejętność ta rozwijała się równoległe na wszystkich kontynentach¹. Najczęściej używane były preparaty pochodzenia roślinnego, otrzymywane z korzeni, drewna, kory, liści, kwiatów, miększu, owoców, łupin, nasion oraz żywic, jednak zastosowanie znalazły również niektóre mięczaki, owady, porosty oraz grzyby. Dominique Cardon w swojej książce *Natural dyes - sources*,

¹ E. Trepka. *Historia kolorystyki*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe; 1960.

tradition, technology, science (2007) wymienia ponad 600 różnych gatunków organizmów stanowiących źródło barwników naturalnych na całym świecie². Zawarte w nich *związki barwiące* to substancje organiczne w większości rozpuszczalne w wodzie, rozpuszczalnikach organicznych lub ulegające rozpzczeniu w trakcie procesu barwienia, które posiadają zdolność intensywnej absorpcji i przekształcania energii promieniowania elektromagnetycznego w zakresie światła widzialnego³. Wśród nich można wyróżnić m.in. flawonoidy i antrachinony (oraz ich liczne O- i C-glikozydowe pochodne), chinochalkony, naftochinony, alkaloidy, apokarotenoidy oraz kurkuminoidy, a także prekursorzy indygoiów czy orsein. Jednak prawdziwa rewolucja w zakresie stosowania preparatów barwiących dokonała się w drugiej połowie XIX w., kiedy to do sprzedaży zostały wprowadzone barwniki syntetyczne. W krótkim czasie obok barwników naturalnych pojawiły się setki nowych preparatów o nieosiągalnej dotychczas różnorodności barw, odcieni i właściwości, chociażby barwniki nitrozowe, azowe, difenylometanowe, trifenylometanowe, ksantenowe, chinolinowe, azynowe czy tiazynowe.



Rysunek 1. Technika HPLC-UV-Vis-MS w badaniach archeometrycznych

Wybierając odpowiednią technikę analityczną do identyfikacji barwników organicznych musimy uwzględnić nie tylko specyfikę i formę badanego obiektu, ale także jego kompozycję chemiczną i naturę komponentów. Zastosowanie technik nieinwazyjnych, takich jak spektrofotometria w podczerwieni z transformacją fourierowską (ang. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) czy spektroskopia Ramana, pomimo swoich licznych zalet, w tym przypadku nie zawsze pozwala uzyskać jednoznaczne wyniki. Z jednej strony wyzwaniem jest rozróżnienie preparatów o zbliżonym składzie, często otrzymywanych z podobnych gatunków roślin czy zwierząt, z drugiej zaś

prawidłowa identyfikacja wszystkich składowych w przypadku mieszaniny barwników. Naprzeciw tym trudnościom wychodzą techniki chromatograficzne łączone z czułymi i selektywnymi technikami detekcji, które to, mimo że należą do technik niszczących, dostarczają znacznie więcej informacji na temat kompozycji wyekstrahowanych związków barwiących przy bardzo niewielkiej ilości materiału niezbędnej do pobrania z badanego obiektu (rzędu mg, a nawet mniej). Najczęściej stosowana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (UV-Vis) lub z detekcją spektrometrii mas (ang. *Mass Spectrometry*,

² D. Cardon. *Natural dyes: sources, tradition, technology and science*. London: Archetype; 2007.

³ W. Czajkowski. *Nowoczesne barwniki dla włókiennictwa*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej; 2006.

MS) z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ang. *Electrospray Ionization*, ESI), jednak najlepsze efekty daje połączenie obu tych technik detekcji. I choć system taki jest bardzo wymagający, to, z uwagi na swoje liczne zalety, powoli wkracza do tworzonych przy muzeach laboratoriów jako standardowa technika identyfikacji organicznych związków barwiących, uzupełniając tym samym wachlarz narzędzi stosowanych w archeometrii. Technika HPLC pozwala rozdzielić różnorodną gamę związków barwiących charakteryzujących się szerokim zakresem hydrofobowości (od małych kwasów organicznych, po indygoity i karotenoidy) bez konieczności ich upochodniania. Detektor UV-Vis umożliwia prowadzenie detekcji rozdzielonych składników mieszaniny nie tylko w zakresie nadfioletu, ale również światła widzialnego (co jest szczególnie zasadne w przypadku badania związków barwnych), jak również może dostarczać dodatkowych informacji analitycznych w oparciu o wartości maksimum absorpcji oraz intensywności poszczególnych pasm. Co więcej pełni on także funkcję kontrolną względem detektora ESI-MS pozwalając skonfrontować uzyskane chromatogramy. Technika spektrometrii mas, zwłaszcza w wariacie tandemowym (ang. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS), nie tylko pozwala na detekcję związków polarnych często znacznie różniących się masą cząsteczkową, ale także stanowi narzędzie umożliwiające tworzenie metod celowanych, ukierunkowanych na detekcję wcześniej określonych związków, tym samym znacząco podnosząc czułość całego układu względem tych substancji.

Prace badawcze w zakresie badania barwników organicznych w obiektach dziedzictwa kulturowego prowadzone są w zaledwie kilku ośrodkach naukowych na świecie. Jest to tematyka niszowa. Baza Scopus® (www.scopus.com) indeksuje (w odniesieniu do szeroko rozumianych dzieł sztuki) zaledwie 3672 prace opublikowane do końca 2020 roku, w których hasło *dyes* pojawia się w tytule, abstrakcie lub słowach kluczowych, z czego 1110 prac dotyczy nauk chemicznych. Wśród nich jest 511 publikacji uwzględniających hasła *dyes*, *mass spectrometry* i *chromatography* oraz 117 prac obejmujących jednocześnie hasła *natural dyes*, *mass spectrometry* i *chromatography*. Pierwsze publikacje dotyczące zastosowania technik chromatograficznych w badaniu barwników naturalnych pojawiły się w połowie lat 70-tych XX w.^{4,5} W roku 2000 opublikowano pierwsze wyniki badań, w których detekcję związków barwiących rozdzielonych za pomocą chromatografii gazowej (ang. *Gas Chromatography*, GC) prowadzono z użyciem spektrometru mas⁶, natomiast pierwsze doniesienie literaturowe o użyciu połączenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (HPLC-MS) w tego typu badaniach pojawiło się w lipcu 2003 roku⁷ i było efektem prac prowadzonych w naszym zespole (w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej). Od tego czasu zainteresowanie tą tematyką systematycznie wzrasta (Rysunek 2), a do rozwoju tego kierunku badań w znacznym stopniu przyczyniły się prace publikowane z udziałem kolejnych członków naszego zespołu, a wśród nich również mojego autorstwa. W początkowym okresie dotyczyły one opracowania metod analitycznych do identyfikacji dobrze

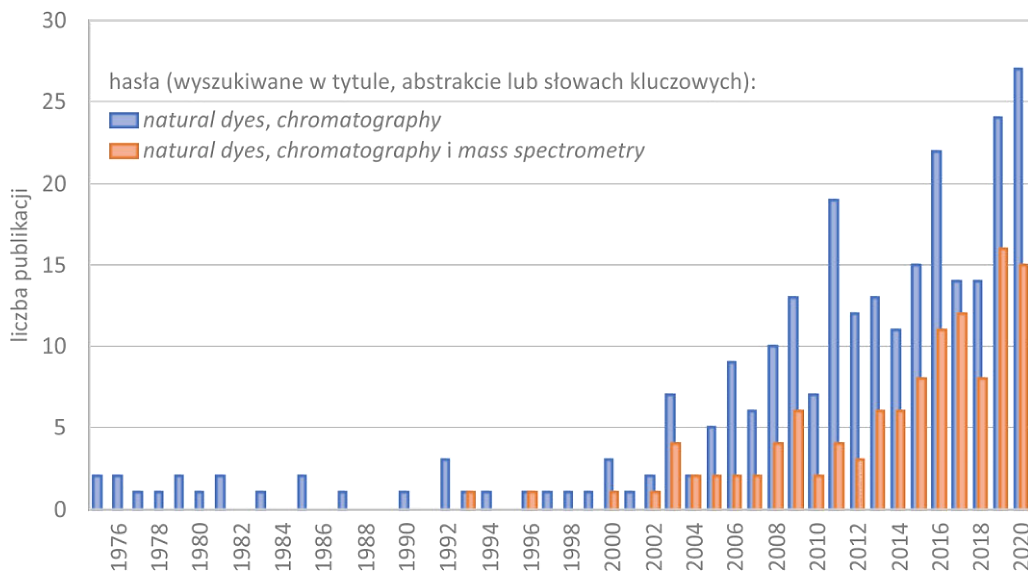
⁴ H. Schweppe. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*. 1975; 276: 291-96, doi:10.1007/BF00430987.

⁵ J.H. Hofenk de Graaf, W.G.T. Roelefs. *American Dyestuff Reporter*. 1976; 65: 32–34.

⁶ D. Fabbri, G. Chiavari, H. Ling. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2000; 56: 167-78, doi:10.1016/S0165-2370(00)00092-9.

⁷ M.A. Ackacha, K. Połec-Pawlak, M. Jarosz. *Journal of Separation Science*. 2003; 26: 1028-34, doi:10.1002/jssc.200301484.

znanych z literatury związków barwiących obecnych w popularnych barwnikach naturalnych z użyciem przede wszystkim dostępnych komercyjnie wzorców analitycznych, co również leżało u podstaw znacznej części prac realizowanych przeze mnie w ramach mojej pracy doktorskiej. Etap ten umożliwił mi odpowiednie zapoznanie się z techniką spektrometrii mas i uzmysłowił mi potrzebę realizacji badań ukierunkowanych na charakteryzację nowych barwników naturalnych, a co za tym idzie również określenie tożsamości ich związków barwiących.



Rysunek 2. Liczba prac opublikowanych w latach 1975-2020 dotycząca barwników naturalnych (w odniesieniu szeroko rozumianych dzieł sztuki) wg bazy Scopus®

Mimo że do połowy XIX wieku wszystkie surowce wykorzystywane do barwienia były pochodzenia naturalnego, to identyfikacja barwników narażona jest na wiele trudności. Jak już wspominałam, wynikają one przede wszystkim z (1) mnogości preparatów (zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznych), jakie były stosowane na przestrzeni wieków przez różne cywilizacje i w różnych ośrodkach artystycznych, (2) złożoności ich składu chemicznego, (3) braku wzorców analitycznych, które byłyby dostępne komercyjnie, oraz z (4) nieznanego tożsamości wielu markerów barwników naturalnych, których jak dotąd nie udało się zidentyfikować, ale także z (5) podobieństwa kompozycji części barwników utrudniającego ich identyfikację czy z (6) trwałego wiązania składników barwników bezpośrednich z podłożem skutkującego małą efektywnością ich ekstrakcji. Wyzwaniem dla analityków jest też (7) postępująca w czasie degradacja substancji pod wpływem działania różnych czynników środowiskowych – z jednej strony prowadzi ona do znacznego obniżenia zawartości poszczególnych związków barwiących, z drugiej zaś skutkuje zmianą składu jakościowego próbki w wyniku pojawienia się nowopowstałych produktów degradacji. Co więcej ten stan rzeczy może dodatkowo komplikować także (8) obecność barwników syntetycznych chętnie stosowanych na przełomie XIX i XX w. do szybkiej, taniej i amatorskiej „renowacji”/„lifingu” blaknących obiektów, zwłaszcza tekstylnych. Wszystko to składa się na ogrom potencjalnych analitów, z którym trzeba się zmierzyć, by móc prawidłowo zidentyfikować barwniki organiczne obecne w obiektach dziedzictwa kulturowego. Jednocześnie należy podkreślić, że (9) ilość materiału pobieranego z obiektu jest bardzo niewielka (często nawet poniżej 0,1 mg),

przez co analiza związków barwiących staje się w istocie analizą śladową, a co za tym idzie wymusza ograniczenie objętości uzyskiwanych ekstraktów do kilkudziesięciu mikrolitrów i stwarza konieczność zastosowania bardzo czułych technik, takich jak HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS, umożliwiających prowadzenie selektywnej analizy (celowanej) związków na odpowiednio niskich poziomach stężeń.

Nie mniej jednak, by móc opracować metodę celowaną w pierwszej kolejności należy wytypować markery barwników organicznych, poznać ich tożsamość oraz scharakteryzować je z użyciem układu HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS, co jest procesem złożonym, czasochłonnym i wymagającym szerokiej wiedzy. A zatem chcąc kontynuować podjętą tematykę badawczą, musiałam zmierzyć się z nowym wyzwaniem, jakim była bezwzorcowa identyfikacja szerokiej gamy niedostępnych komercyjnie związków barwiących i innych markerów barwników naturalnych. W ramach prowadzonych w tym zakresie badań dostrzegłam nowe kierunki rozwoju obejmujące m.in. (i) zastosowanie nisko- i wysokorozdzielczych technik tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) do ustalenia tożsamości związków barwiących, (ii) określenie ścieżek ich fragmentacji (często dotychczas niezdefiniowanych), a także (iii) wyjaśnienia mechanizmów stojących za przebiegiem tych procesów. Wyniki prac prowadzonych w tym nowym obszarze zostały przedstawione w cyklu publikacji stanowiącym podstawę niniejszego wniosku habilitacyjnego. Należy w tym miejscu zdecydowanie podkreślić, że fragmentacja jonów parzystoelektronowych powstających podczas jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI) przebiega w inny sposób niż jonów nieparzystoelektronowych (cząsteczkowych/ /molekularnych) powstających podczas jonizacji elektronami (ang. *Electron Ionization*, EI) często stosowanej w połączeniu z GC. Jony cząsteczkowe generowane podczas bombardowania związków strumieniem elektronów charakteryzują się wysoką energią wewnętrzną, przez co na ogół ulegają one zaawansowanej, a zarazem charakterystycznej fragmentacji, prowadząc do powstawania wysoce odtwarzalnych widm mas, których profil jest niezależny od stosowanego instrumentu⁸. W konsekwencji uzyskane widma EI stanowią „odciski palców” badanych substancji wykorzystywany do ich rutynowej identyfikacji poprzez porównanie z bibliotekami widm mas tworzonymi i weryfikowanymi od ponad 50 lat⁹. W przypadku widm MS/MS jonów parzystoelektronowych, którymi się zajmowałam, nie istnieje uniwersalna biblioteka widm mas, a jedynie niewielkie, dostępne komercyjnie katalogi ograniczone do określonego typu instrumentu i/lub określonej, wąskiej klasy związków. Dzieje się tak, gdyż widma MS/MS jonów parzystoelektronowych nie są odtwarzalne, a ich kształt zależy od wielu czynników (modelu i producenta instrumentu, rodzaju zastosowanej dysocjacji, analizatora mas, warunków eksperymentalnych czy obecnych zanieczyszczeń, a w przypadku często stosowanej dysocjacji indukowanej kolizyjnie (ang. *Collisionally Induced Dissociation*, CID) – również od energii zderzeń). Co więcej, potencjalna lista związków, która musiałaby być ujęta w uniwersalnej bibliotece widm MS/MS jest znacznie większa niż w przypadku lotnych i termicznie stabilnych substancji zawartych w bibliotekach widm EI. Oprócz dobrze zdefiniowanych grup substancji, takich jak np. pestycydy czy leki, których liczebność

⁸ M.T. Sheldon, R. Mistrik, T.R. Croley. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2009; 20: 370-6, doi:10.1016/j.jasms.2008.10.017.

⁹ E. Stenhagen, S. Abrahamsson, F. McLafferty. *Atlas of Mass Spectral Data. Volumes 1, 2, and 3.* 1969.

ogranicza się zazwyczaj do kilku tysięcy, istnieje też szeroka grupa metabolitów zwierzęcych i roślinnych, które zostały dotychczas zidentyfikowane jedynie w niewielkiej części¹⁰. Dlatego też, mimo że w ostatnich latach publikowane jest coraz więcej prac na temat badania barwników organicznych z użyciem techniki HPLC-MS/MS, ważne jest prowadzenie dalszych działań w tym zakresie. Co więcej, szczegółowa analiza widm MS/MS jonów parzystoelektronowych oraz ich ścieżek fragmentacji, choć tak potrzebna, to z uwagi na złożoność procesu jest podejmowana przez nieliczne zespoły badawcze.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje płynące z analizy literatury przedmiotu, celem moich badań, których wyniki zaprezentowałam w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. „*Metodologie analityczne do charakteryzowania barwników organicznych stosowanych w obiektach dziedzictwa kulturowego*”, była identyfikacja związków barwiących obecnych w barwnikach organicznych, a także produktów ich degradacji, w oparciu o widma mas oraz opracowanie nowych metod analitycznych i utworzenie platformy badawczej pozwalających na identyfikację szerokiego wachlarza barwników naturalnych i wczesnych barwników syntetycznych w obiektach zabytkowych. Do zrealizowania powyższych zadań zastosowałam techniki oparte na połączeniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej ((μ)HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (UV-Vis) i/lub detekcją tandemowej spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS/MS). Jak już wspomniałam, układ taki może być stosowany do analizy różnych klas związków o szerokim zakresie polarności, a poza tym jest bardzo czuły i wykazuje się daleko idącą specyficznością.

BADANIA STANOWIĄCE PRZEDMIOT PRACY HABILITACYJNEJ

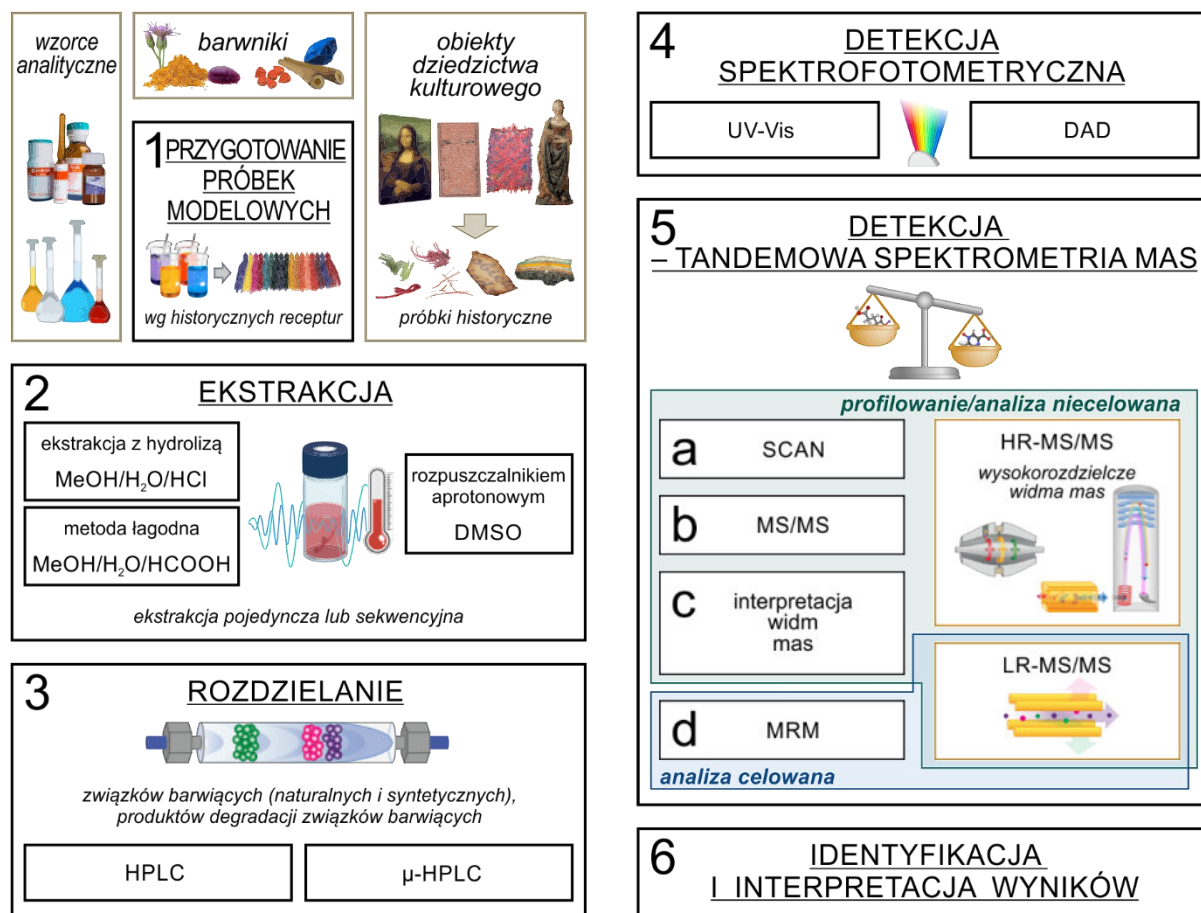
Cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. „*Metodologie analityczne do charakteryzowania barwników organicznych stosowanych w obiektach dziedzictwa kulturowego*” [H1-H11] obejmuje prace przedstawiające wyniki badań realizowanych w dwóch głównych obszarach:

- A. zastosowania techniki (μ)HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS do identyfikacji markerów barwników organicznych w oparciu o chromatogramy, widma MS/MS oraz ścieżki fragmentacji,
- B. opracowania i zastosowania metodyki analitycznej ukierunkowanej na identyfikację barwników organicznych w obiektach dziedzictwa kulturowego i zastosowanie jej w badaniach próbek muzealnych.

Badania prowadziłam zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 3. W ich ramach stosowałam dwojaki sposób podejścia analityczne, które można określić jako (1) profilowanie markerów barwników organicznych (analizę niecelowaną) oraz (2) analizę celowaną nastawioną na identyfikację zdefiniowanych, na podstawie wcześniejszych badań, związków barwiących. Oba postępowania były oparte na różnych trybach pracy spektrometru mas (SCAN, MS/MS oraz MRM), co warunkowało rodzaj uzyskanych informacji analitycznych. Prace

¹⁰ S. Stein. *Anal Chem.* 2012; 84: 7274-82, doi:10.1021/ac301205z.

prowadziłam z użyciem wzorców analitycznych, laboratoryjnych materiałów odniesienia (tj. włókien pochodzenia roślinnego i zwierzęcego barwionych barwnikami naturalnymi zarówno bez zaprawy, jak i przy zastosowaniu różnych zapraw wg. Historycznych receptur) oraz próbek pobranych z obiektów dziedzictwa kulturowego.

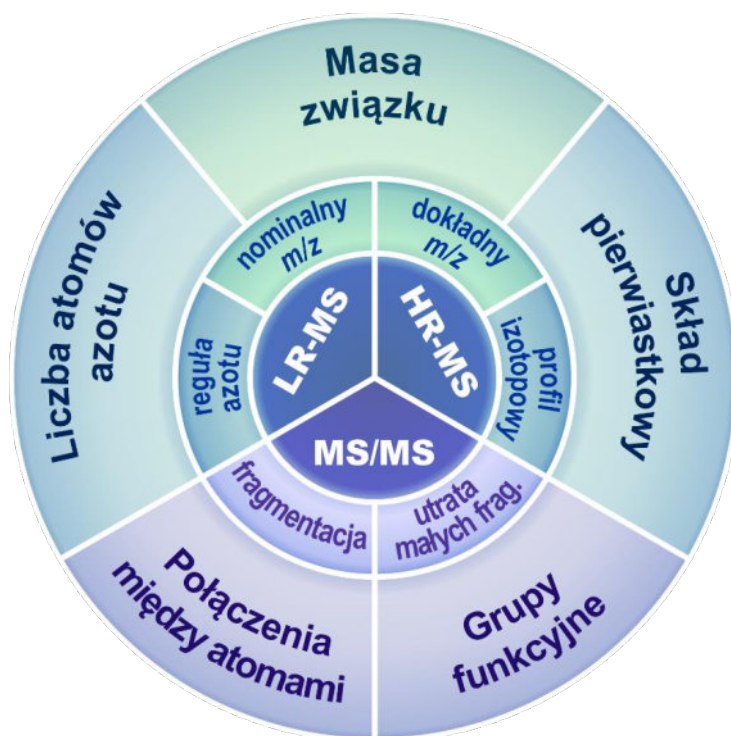


Rysunek 3. Badania prowadzone w ramach pracy habilitacyjnej

A. IDENTYFIKACJA MARKERÓW BARWNIKÓW ORGANICZNYCH W OPARCIU O WIDMA MS/MS

Celem tej części badań było określenie kompozycji ekstraktów różnych barwników organicznych oraz wskazanie i charakterystyka ich związków barwiących lub produktów degradacji za pomocą techniki (μ)HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS. Prace te miały stanowić podstawę dla opracowania metod analitycznych stosowanych do identyfikacji tych barwników w obiektach dziedzictwa kulturowego.

Głównym założeniem badawczym była możliwość zastosowania spektrometrii mas do bezwzorcowej identyfikacji związków organicznych, opartej na interpretacji widm MS/MS jonów parzystoelektronowych i określeniu ich ścieżek fragmentacji. Widma mas, w zależności od rodzaju stosowanego spektrometru oraz trybu zbierania jonów, dostarczają różnych informacji na temat struktury związku (Rysunek 4). Dzięki nim można określić (i) masę



Rysunek 4. Informacje dostarczane za pomocą spektrometrii mas

cząsteczkową związku (nominalną bądź dokładną), (ii) skład pierwiastkowy, (iii) parzystą lub nieparzystą liczbę atomów azotu (zgodnie z regułą azotu), (iv) obecność grup funkcyjnych i/lub połączenia pomiędzy atomami. Reakcje takie jak przegrupowania wodoru (ang. *hydrogen rearrangements*), reakcja retro-Dielsa-Aldera (ang. *retro-Diels–Alder reaction*, RDA), reakcje retro-enowe (ang. *retro-ene reactions*), reakcje retro-heteroenowe (ang. *retro-heteroene reactions*), reakcje przemieszczenia (ang. *displacement reactions*), rozszczepienie indukcyjne (ang. *inductive cleavage*), prosta eliminacja α (ang. α -*elimination*), eliminacje struktur aromatycznych (ang. *aromatic eliminations*) czy homolityczne eliminacje rodników (ang. *radical eliminations*) powodują utratę fragmentów obojętnych i odgrywają kluczową rolę w wyjaśnianiu struktury małych cząsteczkowych związków naturalnych, przy czym przebieg fragmentacji jest bezpośrednio związany z możliwością stabilizacji powstającego jonu potomnego przez rezonans. Jednak, jak już wspomniałam, fragmentacja jonów parzystoelektronowych uzyskiwanych za pomocą jonizacji poprzez elektrorozpraszanie (ESI), choć w wielu aspektach i generalnych zasadach podobna jest do fragmentacji jonów nieparzystoelektronowych generowanych w toku jonizacji elektronami (EI), to jest znacznie mniej przewidywalna i powtarzalna, a uzyskiwane wyniki zależą nie tylko od zdefiniowanych warunków eksperymentalnych, ale także od analizatora czy obecnych zanieczyszczeń. Wszystko to może powodować różnice we fragmentacji tej samej cząsteczki, co nie sprzyja katalogowaniu i tworzeniu bibliotek widm, które można by użyć do identyfikacji nieznanymi substancji. Tak więc, w celu określenia struktury związków barwiących, dla których nie posiadałam odpowiednich wzorców analitycznych, oparłam się na szczegółowej analizie

informacji dostarczanych przez widma mas i chromatogramy zarejestrowane za pomocą techniki (μ)HPLC-UV-VIS-ESI-MS/MS. W przeciwieństwie do widm EI-MS, widma MS/MS jonów parzystoelektronowych ukazują jon macierzysty poddawany fragmentacji, co znacząco pomaga w identyfikacji związku. Ponadto zdolność do selekcjonowania wartości m/z jonu poddawanego fragmentacji eliminuje problem obecności na widmach sygnałów pochodzących od zanieczyszczeń.

Badania prowadziłam z użyciem dwóch wariantów wysokosprawnej chromatografii cieczowej, tj. za pomocą standardowego układu HPLC oraz chromatografii w wariacie kapilarnym dla mikrolitrowych przepływów fazy ruchomej (μ HPLC), pozwalającej na ograniczenie objętości używanych próbek. Analizie były poddawane roztwory poekstrakcyjnych barwników organicznych i ich modelowych wybarwień (na włóknach wełny, jedwabiu i bawełny). Do ekstrakcji związków barwiących stosowałam trzy różne ekstrahenty, tj. (1) mieszaninę metanolu, wody i kwasu chlorowodorowego, (2) mieszaniny metanolu, wody i kwasu mrówkowego oraz (3) dimetylosulfotlenek (DMSO).

W pierwszej kolejności ekstrakty były analizowane z użyciem detektora spektrofotometrycznego (jednowiązkowego UV-Vis lub z matrycą diodową – ang. *Diode Array Detector*, DAD) oraz niskorozdzielczego detektora MS (ang. *Low-Resolution Mass Spectrometry*, LR-MS) w trybie pełnego przemiatania zakresu jonów ujemnych i/lub dodatnich, tj. w trybie skanowania (SCAN). Konfrontacja uzyskanych w ten sposób profili chromatograficznych ekstraktów pozwoliła wstępnie wytypować potencjalne markery barwników oraz określić również jony pseudocząsteczkowe ($[M+H]^+$ i $[M-H]^-$), które następnie były poddawane dysocjacji indukowanej kolizyjnie (ang. *Collisionally Induced Dissociation*, CID) głównie z użyciem trybu przemiatania jonów potomnych (MS/MS). W razie konieczności analogiczne postępowanie było prowadzone z użyciem wysokorozdzielczego spektrometru mas (ang. *High-Resolution Mass Spectrometry*, HR-MS). Rozdzielanie składników mieszanin związków barwiących było prowadzone przy zastosowaniu metod wcześniej zoptymalizowanych z użyciem gamy dostępnych wzorców analitycznych. Wzorce te posłużyły także do określenia i usystematyzowania ścieżek fragmentacji tych związków w zależności od ich przynależności do odpowiedniej klasy.

Zakres badań prowadzonych w ramach tej części pracy habilitacyjnej obejmował:

- barwniki naturalne:
 - zawierające flawonoidy (rezeda, janowiec barwierski, jagody szakłaku, sierpik barwierski, drzewo fustykowe, drzewo fizetowe, akacja katechu, żółtnica pomarańczowa, drzewo brazylijskie, drzewo kampeszowe, drzewo sandałowe),
 - zawierające antrachinony (marzana, czerwiec polski, koszenila amerykańska, kermes, szelak),
 - zawierające inne klasy związków barwiących (orlean, orselka, krokosz barwierski, indygo),
- produkty degradacji indygo.

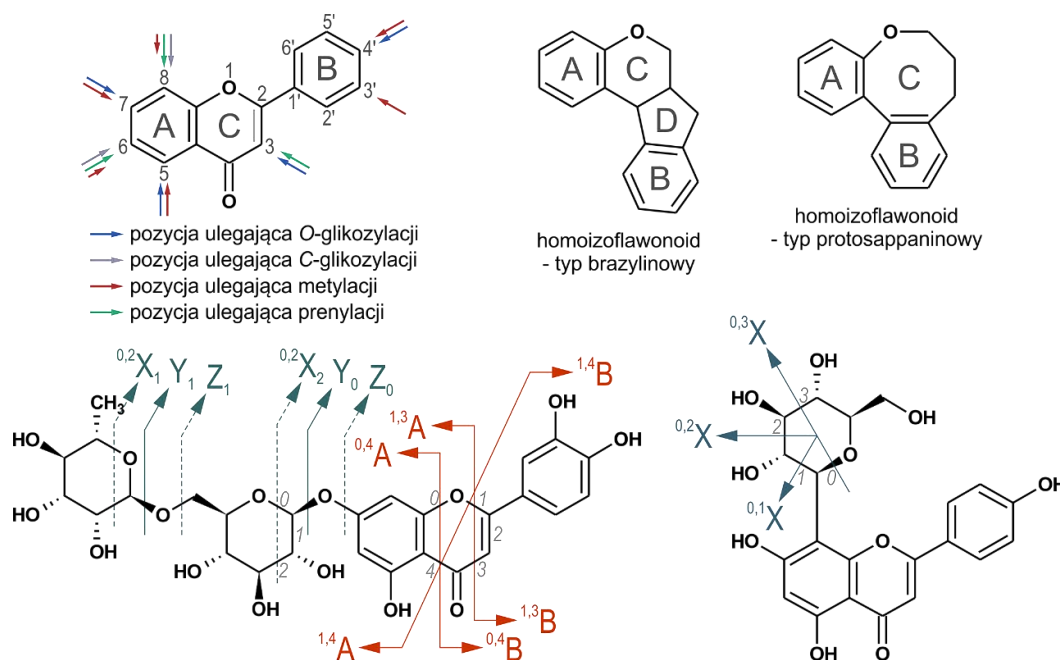
Podczas identyfikacji nieznanymi markerów barwników organicznych uwzględniano szereg informacji dostarczanych za pomocą techniki (μ)HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS dla każdego związku. Takie postępowanie było stosowane w celu uniknięcia fałszywie pozytywnych wyników. Brano pod uwagę m.in.:

- czas retencji – dostarczał informacji na temat hydrofobowości związków, a pośrednio (przez porównanie z dostępnymi wzorcami) również ich przynależności do określonej grupy substancji;
- absorpcję promieniowania o określonej długości fali (dla której był rejestrowany chromatogram) i/lub maksima absorpcji promieniowania z zakresu UV-Vis – w celu określenia barwy związku;
- podatność związku na jonizację w trybie ujemnym i/lub dodatnim świadcząca o zdolności związku do oddawania i/lub przyjmowania protonu – informował o obecności kwasowych i/lub zasadowych grup funkcyjnych;
- jony pseudocząsteczkowe ($[M-H]^-$ i $[M+H]^+$), jony dwukrotnie naładowane (np. $[M-2H]^{2-}$ i $[M+2]^{2+}$), jony-addukty (np. $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$) czy jony-agregaty ($[nM-H]^{n-}$ i $[nM+H]^{n+}$) – po dekonwolucji dostarczały informacji na temat masy związku (nominalnej lub dokładnej, w zależności od rozdzielczości spektrometru mas);
- zastosowanie reguły azotu – dostarczało informacji na temat zerowej/parzystej lub nieparzystej liczby atomów azotu w związku;
- profil izotopowy – w przypadku HR-MS pozwalał określić skład pierwiastkowy, a w przypadku LR-MS pozwalał wykryć obecność atomów chloru, bromu czy ewentualnie siarki (porównanie intensywności sygnałów +1 i +2 m/z względem jonu monoizotopowego);
- zastosowanie zasady RDBE (ang. *Rings-and-Double-Bonds Equivalent*) – określenie liczby miejsc nienasyconych (głównie dla związków zawierających C, H, O i N);
- utrata małych fragmentów obojętnych oraz obecność na widmach MS/MS charakterystycznych jonów o m/z poniżej 100 (np. $[NO_2]^-$, $[SO_3]^-$ czy $[HSO_3]^-$) – dostarczały informacji na temat obecności grup funkcyjnych;
- charakterystyczna fragmentacja i obecność jonów diagnostycznych – dostarczały informacji o przynależności związku do danej grupy oraz o obecności grup funkcyjnych w określonych pozycjach;
- wpływ „efektu *orto*” na fragmentację – dostarczał informacji o występowaniu określonych grup funkcyjnych w pozycji *orto* względem siebie.

Należy tu zaznaczyć, że w ramach złożonego procesu identyfikacji kolejne uzyskiwane informacje i wyciągane na ich podstawie wnioski nie mogły się wzajemnie wykluczać. Co więcej, widma MS/MS oraz krzywe absorpcji zidentyfikowanych w ten sposób związków były porównywane *post factum* z analogicznymi danymi dostępnymi w literaturze i/lub z odpowiednimi wzorcami analitycznymi (o ile było to możliwe).

Flawonoidy [H2, H8, H10]

Flawonoidy występują powszechnie w roślinach. Stanowią one również największą grupę związków barwiących obecnych w barwnikach naturalnych. Można je odnaleźć przede wszystkim w preparatach barwiących na żółto, ale też w barwnikach czerwonych czy granatowych. Z uwagi na różnice w budowie ich piętnastowęglowego szkieletu wśród związków barwiących można wyodrębnić szereg różnych klas flawonoidów, m.in. flawony, izoflawony, flawonole, flawan-3-ole, flawanony, aurony, chalkony i homoizoflawonoidy. Występują one w formie wolnej lub w postaci O- lub C-glikozydów (najczęściej w połączeniu z glukozą, rzadziej z galaktozą, ramnozą, ksylozą i arabinozą, sporadycznie z innymi cukrami), ale także ulegają metylowaniu, acylowaniu oraz prenylowaniu (Rysunek 5).



Rysunek 5. Generalna struktura flawonoidu (z pozycjami ewentualnych modyfikacji) i homoizoflawonoidów typu brazylinowego i protosappaninowego, a także nomenklatura i diagnostyczne jony potomne aglikonu flawonoidu oraz jego O- i C-glikozydów

Flawonoidy zawierają jednak przede wszystkim liczne grupy hydroksylowe, przez co łatwo ulegają jonizacji w polaryzacji ujemnej źródła ESI. Fragmentacja ich jonów parzystoelektronowych jest dość dobrze poznana i zachodzi głównie na dwa sposoby, (1) poprzez rozpad lub oderwanie jednostek cukrowych w przypadku glikozydów lub (2) przez środkowy pierścień C szkieletu flawonoidu w przypadku form wolnych. Do ich opisu stosowana jest nomenklatura zaproponowana przez dwa zespoły badawcze, Domon i innych w 1988 roku¹¹ oraz przez Ma i innych w 1997 roku¹² (Rysunek 5). Wbrew tym regułom część flawonoidów, m.in. genisteina czy kemferol, ulega rozpadowi na drodze utraty kolejnych

¹¹ B. Domon, C.E. Costello. *Glycoconjugate Journal*. 1988; 5: 397-409, doi:10.1007/BF01049915.

¹² Y.L. Ma, Q.M. Li, H. Van den Heuvel, M. Claeys. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1997; 11: 1357-64, doi:10.1002/(sici)1097-0231(199708)11:12<1357::Aid-rcm983>3.0.Co;2-9.

małych fragmentów obojętnych, a przebieg tej fragmentacji może być warunkowany przez każdą z obecnych grup funkcyjnych oraz ich umiejscowienie. Z uwagi na olbrzymią mnogość flawonoidów ich identyfikacja nadal jest przedmiotem licznych badań.

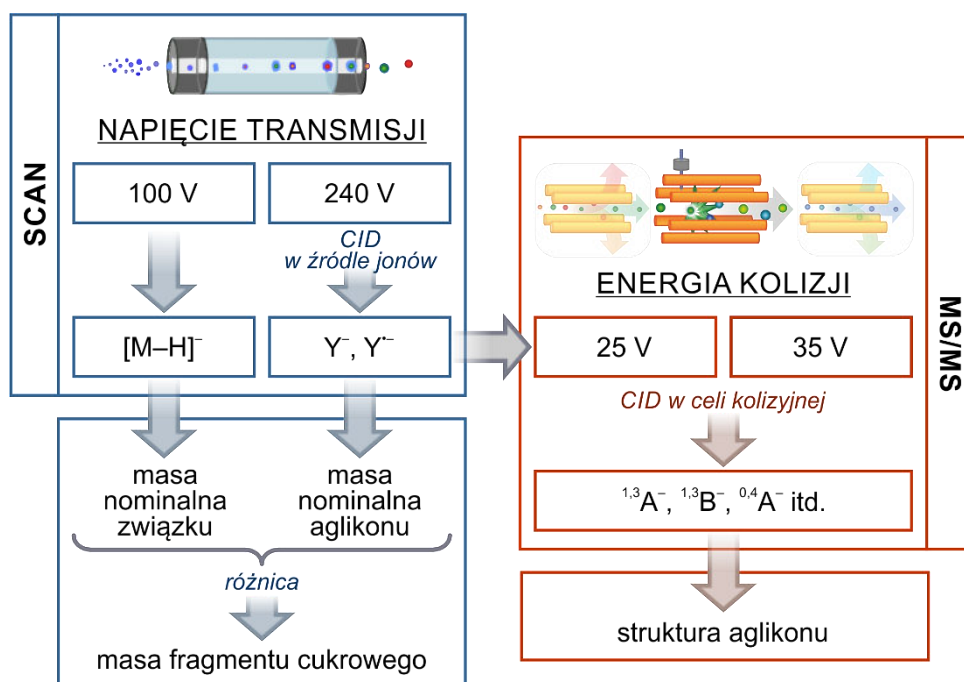
Rezeda (*Reseda luteola* L., ang. *weld*), janowiec (*Genista tinctoria* L., ang. *dyer's broom*) i sierpik barwierski (*Serratula tinctoria* L., ang. *sawwort*) należą do grupy żółtych barwników zaprawowych, czyli takich, których związki barwiące łączą się z podłożem za pośrednictwem kationu metalu pochodzącego z zaprawy (np. soli glinu, chromu(VI), żelaza(II), miedzi(II) czy cyny(II)), tworząc z nim kompleksy chelatowe o różnym zabarwieniu. Wszystkie trzy preparaty są uznawane za barwniki rodzime dla Europy i są one często wymieniane w historycznych recepturach barwierskich. Zgodnie z informacjami zawartymi w fachowej literaturze¹³, charakteryzują się one podobnym składem chemicznym. Jednak mimo tej wiedzy, jak i wbrew powszechności stosowania sierpika barwierskiego, preparat ten nigdy dotychczas nie został zidentyfikowany w żadnym obiekcie zabytkowym. Fakt ten skłonił mnie do podjęcia badań w zakresie scharakteryzowania związków barwiących występujących w sierpiku barwierskim.

Materiał do badań, ziele sierpika barwierskiego, został mi подарowany przez dyrektora Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie (Ogród Botaniczny Polskiej Akademii Nauk). W pierwszej kolejności została przygotowana próbka modelowa wełny farbowanej sierpikiem barwierskim na zaprawie glinowej. Następnie niewielkie ilości barwionych włókien wełny poddano ekstrakcji z użyciem kilku wariantów mieszanin ekstrakcyjnych:

- mieszaniny metanolu (lub etanolu) i słabego kwasu jakim jest kwas mrówkowy, która miała na celu zhydrolizowanie kompleksów chelatowych i uwolnienie związków barwiących bez hydrolizy potencjalnie występujących w nich wiązań *O*-glikozydowych, co mogłoby powodować utratę cennych informacji analitycznych;
- mieszaniny metanolu (lub etanolu) i mocnego kwasu jakim jest kwas chlorowodorowy, której domniemane działanie miało polegać na hydrolizie nie tylko kompleksów metal-związki barwiące, ale także wiązań *O*-glikozydowych w tych związkach, generując tym samym „wolne” aglikony.

Badania ekstraktów były prowadzone zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 6. Dwukrotne wykorzystanie w jednym eksperymencie fragmentacji indukowanej kolizyjnie (ang. *Collisionally Induced Dissociation*, CID) – najpierw w źródle jonów (przy napięciu transmisji 240 V), a następnie w celi kolizyjnej – pozwoliło uzyskać widma jonów potomnych typu MS³ (za pomocą spektrometru mas z potrójnym analizatorem kwadrupolowym). Na podstawie uzyskanych danych MS/MS scharakteryzowałam flawonoidy obecne w ekstraktach, niezależnie od ich formy chemicznej, a w konsekwencji określiłam nieoczekiwany wpływ procesu ekstrakcji na kompozycję roztworów poekstrakcyjnych [H2].

¹³ D. Cardon. *Natural dyes: sources, tradition, technology and science*. London: Archetype; 2007.

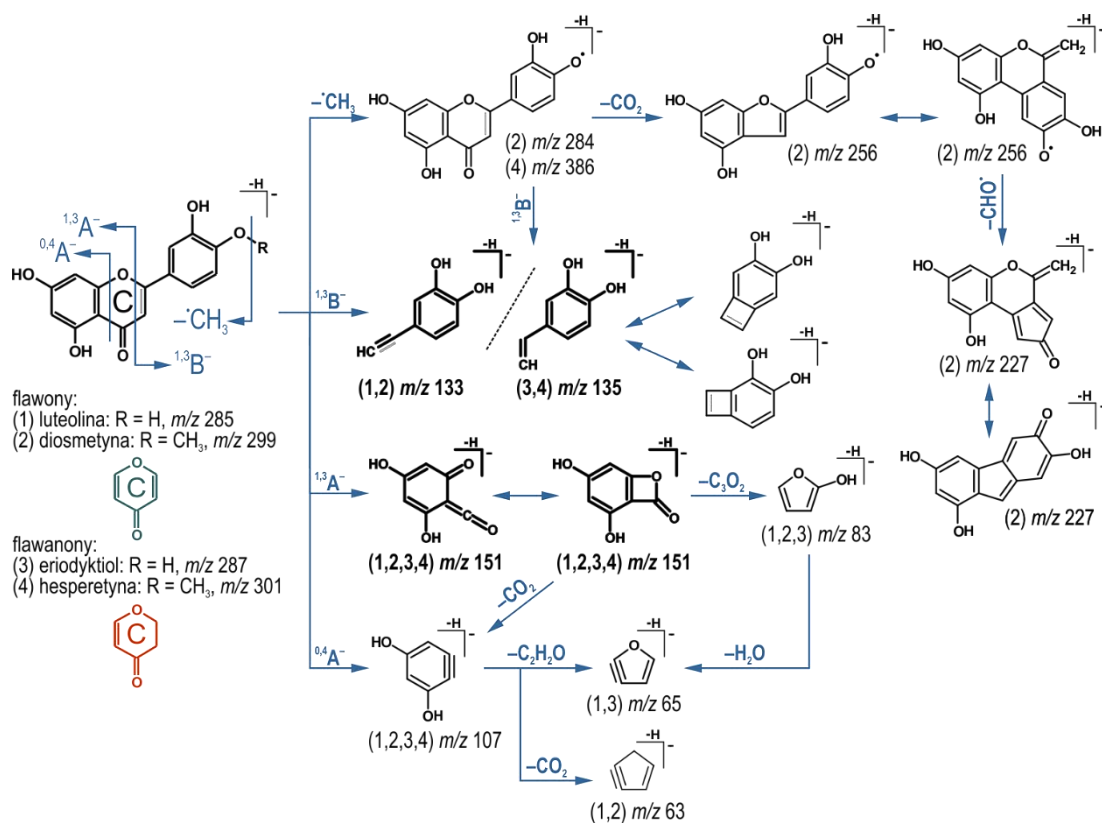


Rysunek 6. Zastosowanie techniki ESI-MS/MS z potrójnym analizatorem kwadropolowym w badaniach glikozydów flawonoidów w ekstraktach sierpika barwierskiego

Badania wykazały, że ekstrakty zawierają niewielką ilość luteoliny oraz pięć glukuronowych pochodnych flawonoidów. Na podstawie widm „MS³” ich aglikony zostały zidentyfikowane jako luteolina i metyloluteolina (w wyniku porównania z widmami wzorców luteoliny i diosmetyny) oraz eridyktiol – flawanon, będący dihydroluteoliną (opierając się na jonach diagnostycznych $^{1,3}A^-$ i $^{1,3}B^-$, Rysunek 7). Co więcej, obecność kwasu chlorowodorowego w ekstrakcie nie powodowała hydrolizy wiązania O-glikozydowego glukuronidów, jak to ma miejsce w przypadku innych flawonoidowych O-glikozydów, lecz skutkowało ich metylowaniem. W efekcie również w tym roztworze zidentyfikowano pięć O-metylowanych pochodnych O-glukuronidowych flawonoidów. Ich widma mas potwierdziły, że reakcji O-metylowania może ulegać zarówno aglikon, jak i jednostka kwasu glukuronowego.

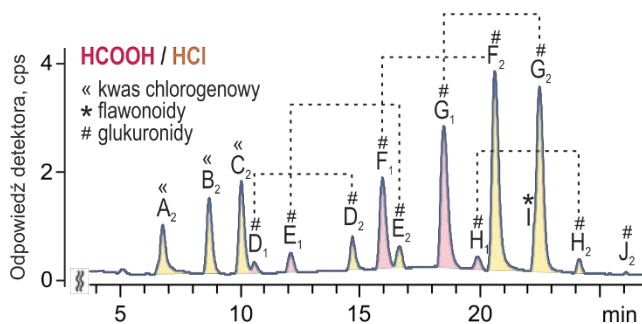
Należy podkreślić, że przedstawione wnioski zostały potwierdzone przez poddanie ekstraktu metanol-kwas mrówkowy symulacji ponownej ekstrakcji z użyciem kwasu chlorowodorowego. Końcowy roztwór poekstrakcyjny zawierał wszystkie dziesięć pochodnych flawonoidów zidentyfikowanych uprzednio w obu ekstraktach (Rysunek 8). Co więcej, analogiczne ekstrakty przygotowane z użyciem etanolu dowiodły, że reakcja O-alkilowania glukuronidów w obecności kwasu chlorowodorowego nie jest reakcją specyficzną i zachodzącą jedynie w metanolu.

Wyniki moich badań przyniosły odpowiedź na pytanie, dlaczego sierpiek barwierski dotychczas nie został zidentyfikowany w obiektach historycznych. Był to efekt niepoprawnie zdefiniowanej listy markerów połączonej z brakiem wiedzy na temat wpływu ekstrakcji na



Rysunek 7. Ścieżka fragmentacji flawonów i flawanonów obecnych w ekstraktach sierpika barwierskiego z zaznaczeniem jonów diagnostycznych (pogrubienie)

kompozycję roztworu poekstrakcyjnego. W efekcie, szeroko stosowana przez lata ekstrakcja mieszaniną alkoholi z dodatkiem kwasu chlorowodorowego, zamiast prowadzić do spodziewanej hydrolizy i uwolnienia luteoliny z jej pochodnych cukrowych, skutkowało pojawieniem się dodatkowych nieznanymi związków barwiących (*O*-metylowanych pochodnych *O*-glukuronidowych flawonoidów), które nie mogły być zidentyfikowane za pomocą techniki HPLC-UV-Vis. A zatem wyniki moich prac wymiennie przyczyniły się do poznania kompozycji związków barwiących sierpika oraz do wdrożenia zaktualizowanej gamy



Rysunek 8. Chromatogram BPC ekstraktu z włókien wełny farbowanej sierpikiem otrzymany z dodatkiem kwasu mrówkowego i chlorowodorowego [H2]

markerów do nowo opracowywanych metod analitycznych (z użyciem zarówno techniki HPLC-UV-Vis, jak i HPLC-MS). Skutkowało to prawidłową identyfikacją tego preparatu w próbkach pochodzenia historycznego, potwierdzając niniejszym celowość i poprawność przeprowadzonych badań (o czym będzie mowa w części B autoreferatu). Ponadto opublikowane wyniki [H2] zostały wykorzystane nie tylko w kontekście identyfikacji sierpika w obiektach

zabytkowych, ale również posłużyły innym zespołom badawczym¹⁴ do potwierdzenia tożsamości *O*-glukuronidowych pochodnych flawonoidów obecnych w różnych ekstraktach roślinach (np. w szałwii, lawendzie, konopiach czy sałacie).

Jako że barwniki zawierające flawonoidy stanowią największą grupę naturalnych preparatów barwiących swoje badania ukierunkowałam również na scharakteryzowanie innych popularnych barwników flawonoidowych. Badania ekstraktów z akacji katechu (*Senegalia catechu* P.J.H.Hurter & Mabb., ang. *cutch*), żółtnicy pomarańczowej (*Maclura pomifera* Schneid., ang. *Osage orange*) i drzewa fustykowego (*Maclura tinctoria* Steud., ang. *old fustic*) wykazały, że barwniki te zawierają jedynie flawonoidy w stanie wolnym. Część z nich zidentyfikowano w oparciu o dostępne wzorce analityczne, natomiast pozostałe scharakteryzowano na podstawie widm MS/MS. Dzięki charakterystycznej reakcji rozszczepienia pierścienia C prowadzącej do utworzenia anionu floroglucynolu (*m/z* 125) oraz reakcji RDA, rozpoznano cztery flawanonole (czyli dihydroflawanole) podstawione grupą hydroksylową w pozycji C-5 i C-7. Potwierdzono także obecność dimeru typu B (epi)afzelechiny i (epi)katechiny. Ponadto badania wykazały, że kompozycja ekstraktów próbek barwionych żółtnicą pomarańczową i drzewem fustycznym jest bardzo zbliżona [H8], a główne różnice obejmują związki inne niż flawonoidy i zostaną one przedstawione w dalszej części rozprawy.

Jednak flawonoidy nie obejmują jedynie związków obecnych w barwnikach żółtych. Skondensowane układy izoflawonoidów, do których należą santaliny i santarubiny obecne w drzewie sandałowym (*Pterocarpus santalinus* L., ang. *santalwood*) odpowiadają za jego czerwone właściwości barwiące. To właśnie skondensowana struktura tych związków sprawia, że fragmentacji ulegają jedynie grupy metoksylove w wyniku czego tracone są kolejne rodniki metylowe, a w dalszym etapie również cząsteczka CO z grupy karbonylowej [H10].

Inną wąską grupę związków stanowią homoizoflawonoidy odpowiadające za czerwone i granatowe wybarwienia uzyskiwane przy użyciu wodorozpuszczalnych barwników drzewnych, takich jak drzewo kampekowe (*Haematoxylum campechianum* L., ang. *logwood*) oraz tzw. drzewo brazylijskie (*Paubrasilia echinata*, *Caesalpinia sappan* i *Haematoxylum brasiletto* L., ang. *brazilwood*). Ich główne związki barwiące są ze sobą blisko spokrewnione i różnią się obecnością jednej grupy hydroksylowej.

Homoizoflawonoidy posiadają w swej strukturze dodatkowy pięcioczłonowy pierścień D (Rysunek 5). Jego obecność, jak i stopień wysycenia całego układu, wpływają na sposób fragmentacji związków. W przypadku związków typu brazylinowego zachodzi ona głównie przez rozerwanie pierścienia D (brezylina i hematoksylina), natomiast obecność dodatkowego wiązania nienasyconego w pierścieniu D form utlenionych skutecznie zapobiega jego

¹⁴ C.L. Lopes, E. Pereira, M. Sokovic, A.M. Carvalho, A.M. Barata, V. Lopes, F. Rocha, R.C. Calhelha, L. Barros, I. Ferreira. *Molecules*. 2018; 23, doi:10.3390/molecules23051037.; I. Grzegorzczak-Karolak, A.K. Kiss. *Molecules*. 2018; 23, doi:10.3390/molecules23061468.; A.D. Assefa, S. Choi, J.E. Lee, J.S. Sung, O.S. Hur, N.Y. Ro, H.S. Lee, S.W. Jang, J.H. Rhee. *BMC Chem*. 2019; 13: 56, doi:10.1186/s13065-019-0570-2.; D.U. Nagy, K. Cianfaglione, F. Maggi, S. Sut, S. Dall'Acqua. *Chem Biodivers*. 2019; 16: e1800562, doi:10.1002/cbdv.201800562.

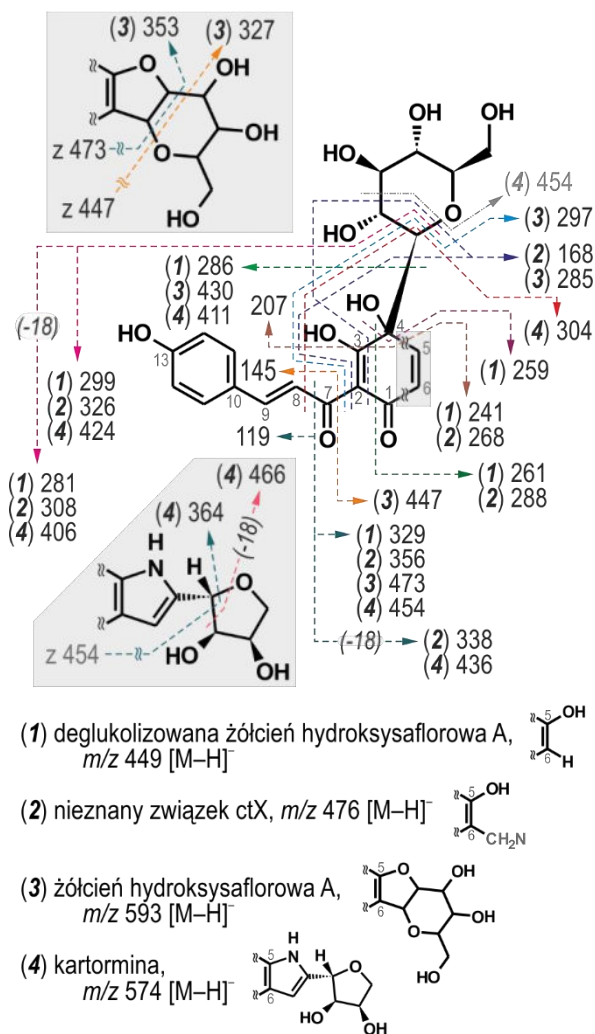
rozszczerpieniu, przez co fragmentacja zachodzi przez heterocykliczny pierścień C (brazyleina i hemateina). Prowadzone badania pozwoliły mi również zidentyfikować inne związki z grupy protosappanin i określić ich ścieżki rozpadu [H10]. Jednak budowa części związków barwiących to problem nadal otwarty, który należy rozwijać w dalszych badaniach.

Badania wykazały, że w przypadku większości barwników flawonoidowych dokładna analiza widm MS/MS pozwala określić budowę nieznanymi związków barwiących. Dzięki szczegółowej znajomości ich ścieżek fragmentacji i wskazaniu jonów diagnostycznych charakterystycznych dla danej podgrupy flawonoidów ustaliłam grupy funkcyjne obecne zarówno w pierścieniu A, jak i B badanych związków. Wykazałam, że dokładne określenie kompozycji flawonoidów obecnych w poszczególnych barwnikach, a także potencjalnych modyfikacji jakim mogą one ulegać podczas ekstrakcji, mają kluczowe znaczenie dla poprawnej identyfikacji preparatu barwiącego.

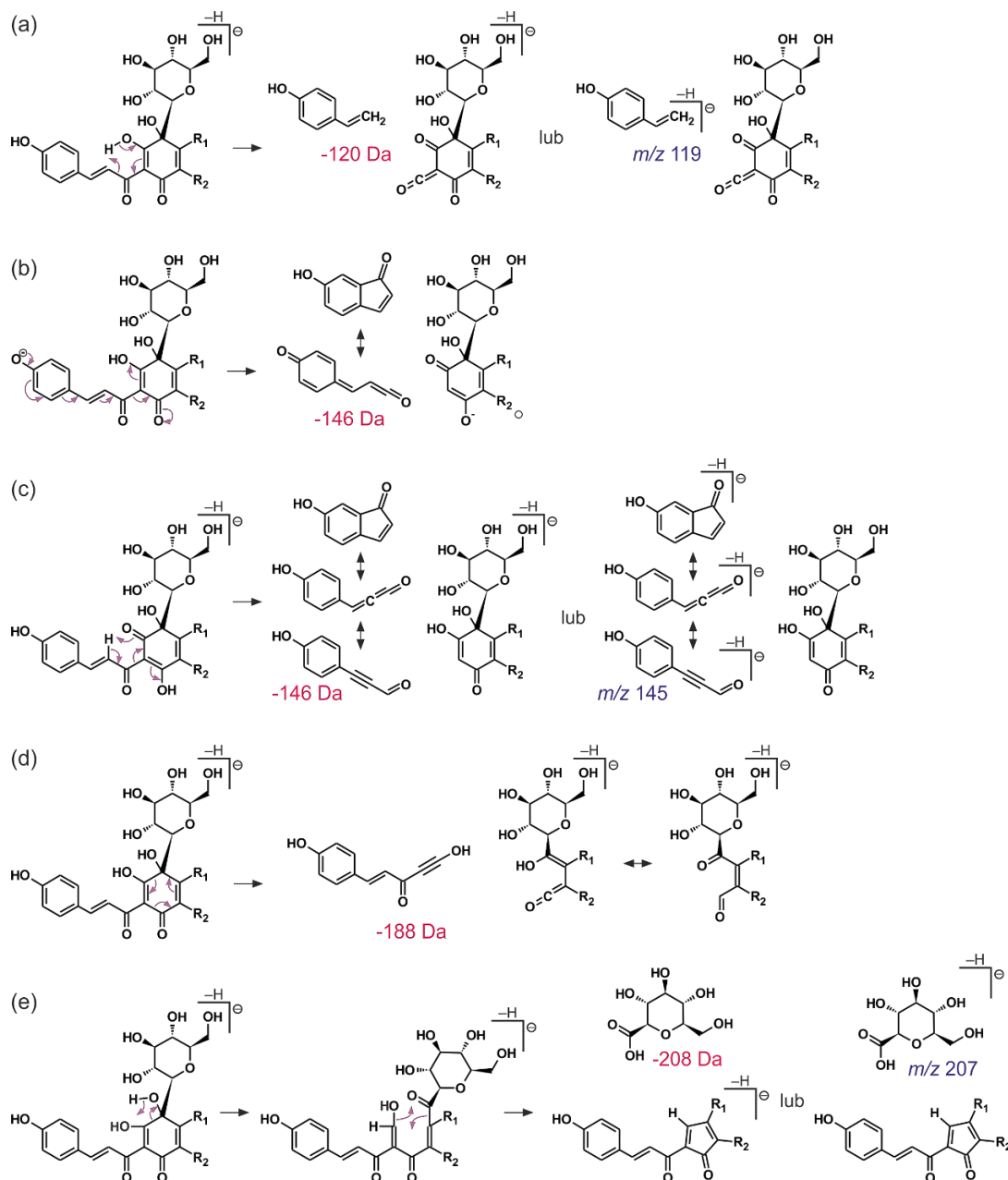
C-glikozydy chinochalkonów [H11]

Krokosz barwierski (*Carthamus tinctorius* L., ang. *safflower*) to nietypowy barwnik bezpośredni (niewymagający stosowania żadnych dodatków w procesie barwienia), gdyż z jednej strony można go stosować do uzyskania czerwieni, z drugiej zaś umożliwia barwienie na żółto. Ten dualizm kolorów możliwy jest do uzyskania dzięki różnym właściwościom związków barwiących zawartych w płatkach krokosza (C-glikozydów chinochalkonów). Kartamina, rozpuszczalny w alkaliach czerwony związek syntetyzowany w późnej fazie kwitnienia, jest niezbędny do barwienia na kolor różowy, szkarłatny, karminowy czy głęboko czerwony. Jednak płatki krokosza zawierają również duże ilości rozpuszczalnych w wodzie, C-glikozydów chinochalkonów, których obecność w kąpielii wodnej warunkuje barwienie na żółto lub pomarańczowo, jednocześnie zapobiegając możliwości barwienia na czerwono.

W swoich badaniach podjęłam się kompleksowego badania żółtych i czerwonych modelowych wybarwień różnych włókien uzyskanych z użyciem krokosza barwierskiego w celu określenia kompozycji tworzących je związków barwiących [H11]. Ponieważ



Rysunek 9. Proponowana fragmentacja C-glikozydów chinochalkonów i wartości powstających jonów [H11]



Rysunek 10. Proponowane mechanizmy popularnych fragmentacji C-glikozydów chinokhalkonów poprzez (a) przegrupowanie wodoru, (b) eliminację γ , (c) reakcję retro-heteroenu, (d) reakcję RDA i (e) przegrupowanie wodoru z przywróceniem struktury aromatycznej [H11]

większość z nich nie była dostępna komercyjnie, identyfikację oparłam o wnikliwą analizę mechanizmów ich fragmentacji. Z uwagi na możliwość utraty fragmentów izobarycznych, wynikającą z jednej strony z obecności w strukturze badanych związków grupy C-glukozydowej oraz jednostki *p*-kumarylu, z drugiej zaś z możliwości występowania atomu azotu oraz utraty fragmentów rodnikowych, w badaniach wsparłam się również o wysokorozdzielcze widma mas jonów potomnych (HR-MS/MS) uzyskane za pomocą spektrometru wyposażonego w analizator typu *Orbitrap* (w ramach współpracy z prof. dr. hab. inż. Stanisławem Popielem z

Wydziału Nowych Technologii i Chemii Wojskowej Akademii Technicznej). Na tej podstawie zidentyfikowałam w ekstraktach dziesięć C-glikozydów chinochalkonów oraz ustaliłam podobieństwa dotyczące przebiegu ich fragmentacji (Rysunek 9). Wskazałam jony oraz fragmenty obojętne, które mogą pełnić rolę diagnostyczną w różnicowaniu oraz identyfikacji C-glikozydów chinochalkonów, tj. (1) jony wspólne dla większości C-glikozydów chinochalkonów (m/z 119, 145 i 207), (2) charakterystyczne straty fragmentów obojętnych powstałe w wyniku rozszczepienia szkieletu chinochalkonowego (120 Da (C₈H₈O), 146 Da (C₉H₆O₂), 188 Da (C₁₁H₈O₃) i 208 Da (C₇H₁₂O₇)) oraz (3) charakterystyczne straty fragmentów obojętnych powstałe w wyniku rozszczepienia ugrupowania C-glikozydowego (163 Da (C₆H₁₁O₅), 120 Da (C₄H₈O₄), 150 Da (C₅H₁₀O₅) i 90 Da (C₃H₆O₃)). Określiłam również mechanizmy prowadzące do ich powstania (Rysunek 10).

Innym ważnym efektem tych prac było wykazanie, że kompozycja wybarwień zmienia się w zależności od zastosowanych warunków barwienia i rodzaju włókna. Co więcej udowodniłam, że kartamina, choć rozpuszczalna w alkaliach, może być z powodzeniem uwalniana z włókien z użyciem łagodnej metody ekstrakcji, nie ulegając przy tym hydrolizie [H11].

Antrachinony [H4, H5, H10]

Antrachinony, podobnie jak flawonoidy, są wiązane z podłożem za pośrednictwem kationu metalu, co klasyfikuje je jako związki barwiące obecne w barwnikach zaprawowych. Występują one zarówno w preparatach pochodzenia roślinnego (głównie z rodziny marzanowatych), jak i zwierzęcego (przede wszystkim osobników żeńskich niektórych pluskwiaków), które to można odnaleźć na wszystkich kontynentach. Były one stosowane głównie do barwienia na czerwono bądź, wraz z innymi barwnikami, do uzyskiwania kolorów mieszanych.

Dwojakie pochodzenie antrachinonów ma odzwierciedlenie w ich różnorodnej formie. W barwnikach roślinnych można je odnaleźć głównie w postaci O-glikozydów, które to jednak łatwo ulegają hydrolizie do wolnych aglikonów. Natomiast preparaty zwierzęce zawierają przede wszystkim antrachinony w formie kwasów karboksylowych, które mogą występować w stanie wolnym lub jako C-glikozydy, a także w postaci blisko spokrewnionej grupy związków dikarboksylowych, które w pozycji C-7 są podstawione tyrozyną lub jej pochodnymi (dihydroksyfenyloalaniną, dopaminą i hydroksytyrozolem) otrzymanymi z tyrozyny w reakcjach enzymatycznych.

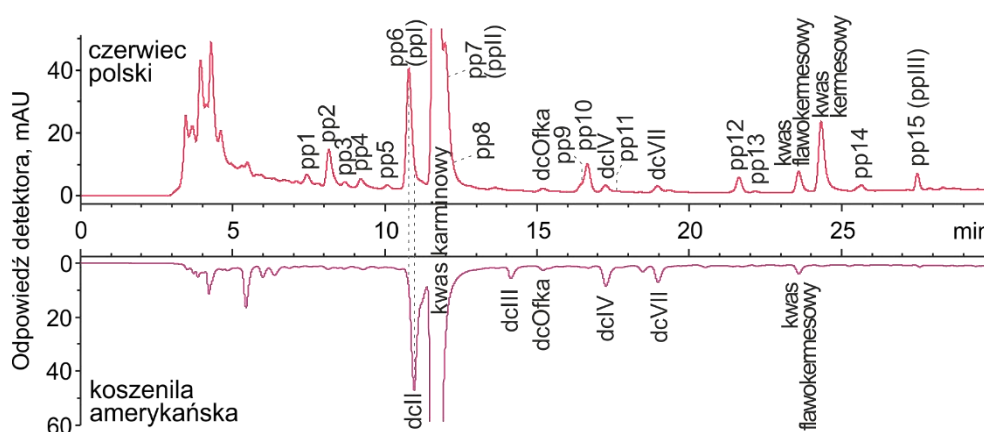
Pierwsze próby pełnej charakterystyki kompozycji związków barwiących w czerwieniach zwierzęcych podjęli Wouters i Verhecken na przełomie lat 80-tych i 90-tych XX w. W trzech publikacjach¹⁵ zaprezentowali oni obszerne badania porównujące skład preparatów z użyciem techniki HPLC-DAD i przedstawili widma absorpcji rozdzielonych

¹⁵ J. Wouters, A. Verhecken. *Studies in Conservation*. 1989; 34: 189-200, doi:10.1179/sic.1989.34.4.189.; J. Wouters, A. Verhecken. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*. 1989; 25: 393–410.; J. Wouters, A. Verhecken. *Belgian Journal of Zoology*. 1991; 121: 211-25.

związków. Autorzy zaproponowali też sposób kodyfikacji nomenklatury związków, gdyż tożsamość większości z nich pozostawała nieznana. Dopiero w 2013 udało się zidentyfikować związki określane mianem dcII, dcIV, dcVII i dcOfka, występujące w koszenili amerykańskiej¹⁶. Jednak badania zmierzające do identyfikacji markerów czerwca polskiego (*Porphyrophora polonica* L., ang. *Polish cochineal*), określone przez Woutersa i Verheckena jako ppI, ppII i ppIII, nie były prowadzone. Barwnik ten, mimo że w okresie średniowiecza stanowił polskie bogactwo naturalne (rocznie na terenie Polski zbierano około 190 ton¹⁷), to aktualnie uchodzi on za gatunek zagrożony i jest chroniony w wielu krajach Europy, jednak nie podlega takiej ochronie w Polsce. Pozyskanie go ze źródeł naturalnych jest dość trudne, co ogranicza powszechność prowadzenia badań z jego udziałem.

Wouters i Verhecken zwrócili uwagę na duże podobieństwo kompozycji związków barwiących koszenili amerykańskiej (*Dactylopius coccus* Costa, ang. *American cochineal*), czerwca polskiego (*Porphyrophora polonica* L., ang. *Polish cochineal*) oraz czerwca armeńskiego (*Porphyrophora hamelii* Brandt, ang. *Armenian cochineal*). Przekłada się to na trudności w jednoznacznym określeniu proveniencji barwników. Ich prawidłowa identyfikacja jest jednak niezmiernie istotna, gdyż może mieć kluczowe znaczenie dla datowania obiektów z przełomu XV i XVI w.

W świetle tych informacji swoje badania ukierunkowałam na określenie pełnego profilu chromatograficznego czerwca polskiego, w celu wytypowania jego markerów i porównania go z koszenilą amerykańską. W wyniku długotrwałych starań, a także dzięki uprzejmości Pana Jerzego Holca z Pracowni Konserwacji Tkanin Zamku Królewskiego na Wawelu pozyskałam do badań jedną samicę czerwca polskiego o masie ok. 2 mg. Badania ekstraktów obu barwników (czerwca polskiego i koszenili amerykańskiej) były przeprowadzone z użyciem techniki HPLC-DAD-ESI-MS/MS (Rysunek 11), dzięki czemu obok

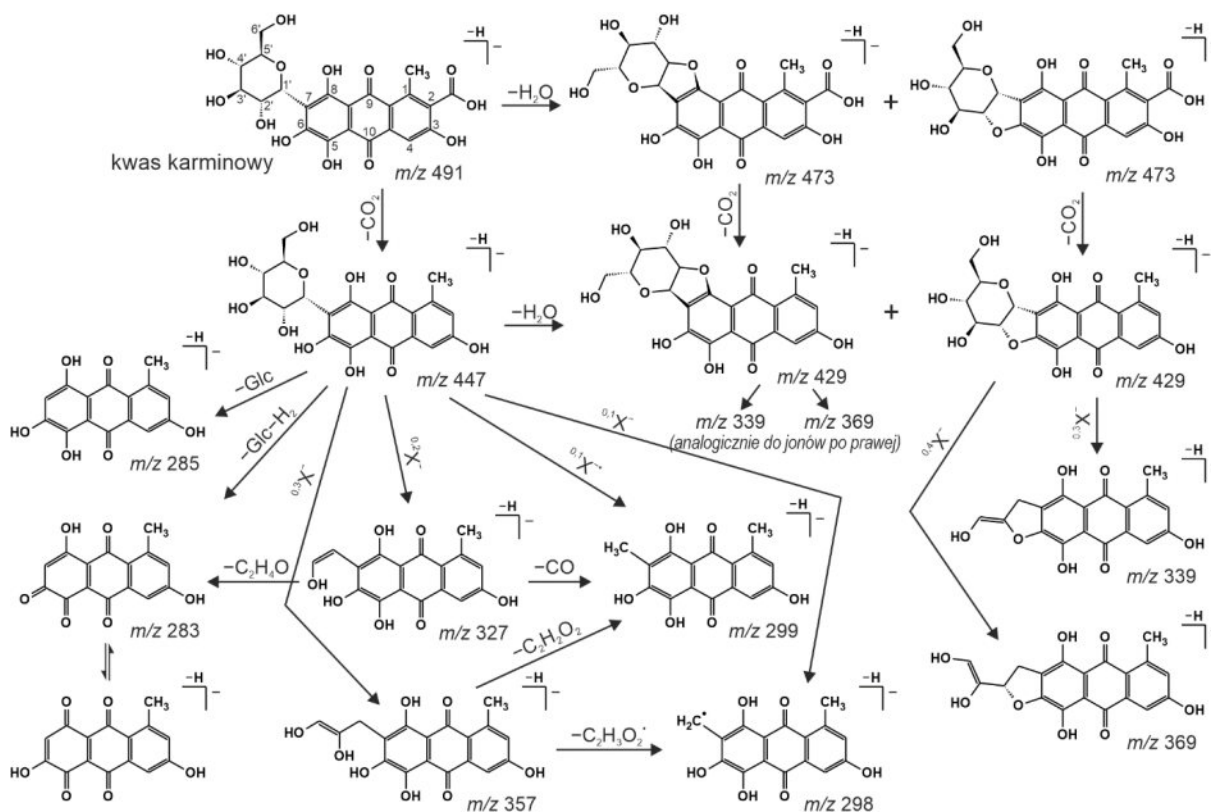


Rysunek 11. Chromatogramy ekstraktów czerwca polskiego i koszenili amerykańskiej zarejestrowane za pomocą detektora spektrofotometrycznego przy długości fali 287 nm

¹⁶ K. Stathopoulou, L. Valianou, A.L. Skaltsounis, I. Karapanagiotis, P. Magiatis. *Anal Chim Acta*. 2013; 804: 264-72, doi:10.1016/j.aca.2013.09.053.

¹⁷ E. Trepka. *Historia kolorystyki*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe; 1960.

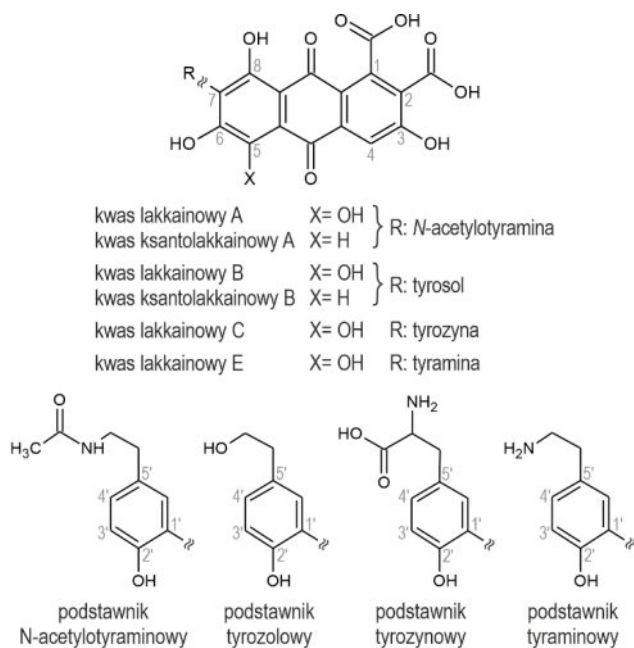
chromatogramów otrzymano zarówno widma MS/MS, jak i UV-Vis. W pierwszej kolejności scharakteryzowałam znane markery koszenili amerykańskiej (kwas kermesowy, dcIV i dcVII) i określiłam szczegółowo ścieżki ich fragmentacji (Rysunek 12) [H4], co stanowiło punkt wyjścia do dalszych badań. Następnie na podstawie widm MS/MS scharakteryzowałam strukturę 22 związków obecnych w metanолоwym ekstrakcie czerwca polskiego, które do tej pory pozostawały nieznane, w tym trzech markerów (ppI, ppII and ppIII) wskazanych przez Woutersa i Verheckena. Jedynie sześć z nich występowało również w ekstrakcie z koszenili amerykańskiej, a zatem szesnaście związków stanowiło potencjalne markery czerwca polskiego [H5].



Rysunek 12. Proponowana ścieżka fragmentacji kwasu karminowego [H4]

Na podstawie analizy uzyskanych danych wykazałam, że obserwowane związki fragmentowały według trzech głównych ścieżek. W pierwszej kolejności dochodziło do (1) rozpadu grupy karboksylowej, który skutkowałam utratą cząsteczki CO₂. Na tej podstawie większość badanych związków została zidentyfikowana jako kwasy karboksylowe. W przypadku części z nich obserwowany był również (2) heterolityczny lub homolityczny rozpad wiązania O-glikozydowego i oderwanie jednostki heksozy z utworzeniem jonów Y⁻ i/lub Y^{•-}. Zarówno to, jak i (3) rozpad jednostki cukru z utratą kolejnych fragmentów obojętnych o masie 90, 120 i 148 Da, pozwoliło zidentyfikować badane związki jako mono- i di-, C- i O-heksozydy deoksyerytolakcyny, kwasu kermesowego oraz kwasu flawokermesowego. Wśród nich udało się rozpoznać markery określane mianem ppI, ppII i ppIII.

Duża liczba zidentyfikowanych O-glikozydów (stosunkowo łatwo ulegających hydrolizie) wyjaśnia większą zawartość kwasu kermesowego i flawokermesowego w czerwcu polskim w stosunku do koszenili amerykańskiej. Dlatego też należy zaznaczyć, że dla detekcji tych markerów kluczowe są warunki, w jakich prowadzona jest ich ekstrakcja; muszą być tak dobrane, aby nie powodowały utraty cennej informacji analitycznej.



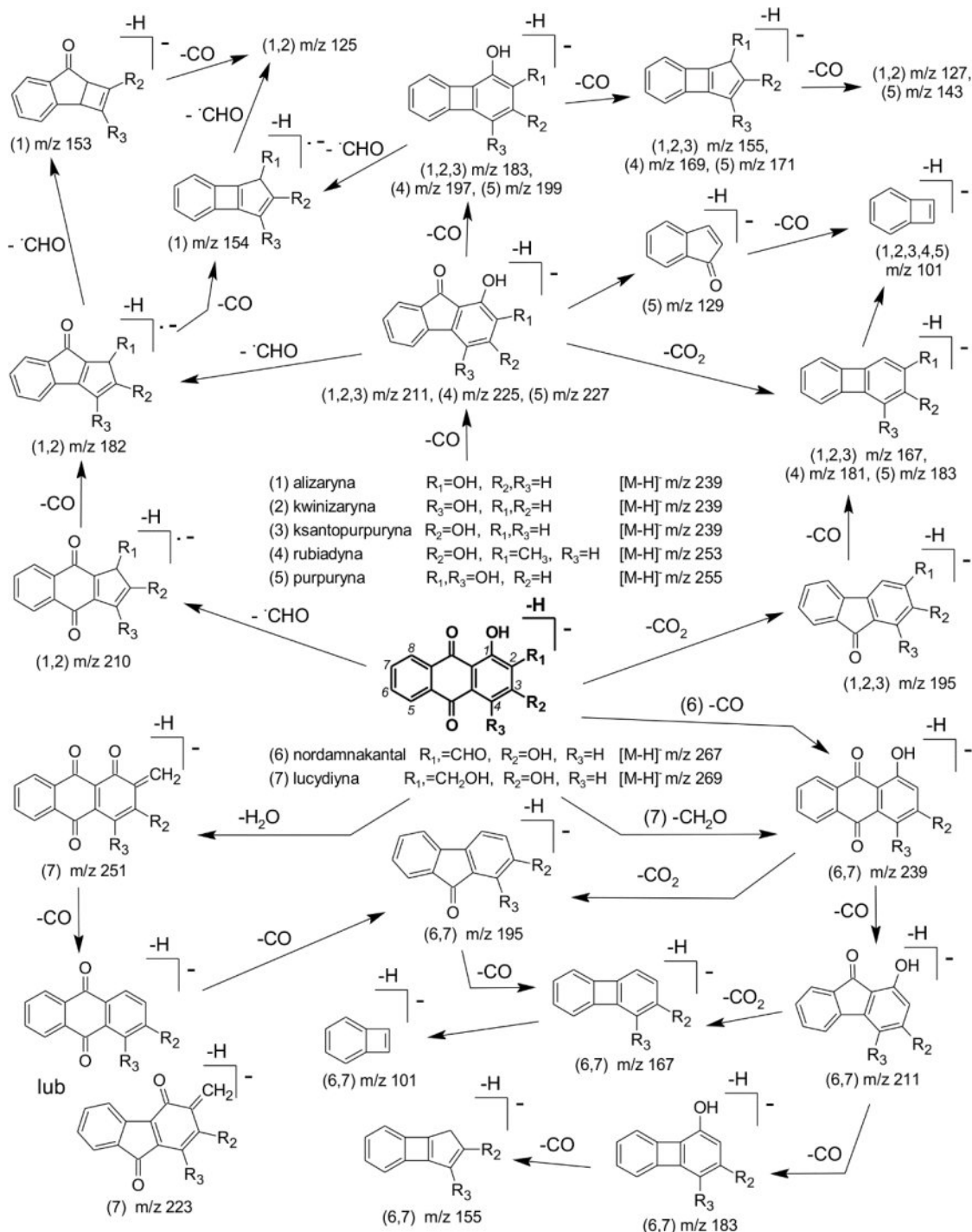
Rysunek 13. Struktury kwasów lakkainowych i ksantolakkainowych [H4]

pochodzących z dwóch grup karboksylowych. Dodatkowo, obecność dużego podstawnika w pozycji C-7 z grupą hydroksylową w pozycji C-2' (Rysunek 13) skutkowałą eliminacją cząsteczki wody pomiędzy dwiema grupami hydroksylowymi, pierwszą – właśnie w pozycji C-2' oraz drugą – w pozycji C-6 lub C-8 antrachinonu. Oprócz kwasów lakkainowych i ksantolakkainowych ekstrakt szelaku zawierały też kwas kermesowy oraz flawokermesowy oraz ich dekarboksylowane pochodne, tj. erytrolakcynę i deoksyerytrolakcynę [H10].

Chromatogramy ekstraktu wełny barwionej kermesem (*Kermes vermilio* Planchon, ang. *kermes*) zawierały dwa główne piki odpowiadające kwasowi kermesowemu i kwasowi flawokermesowemu oraz ślady dezoksyerytrolakcyny. Następnie dwa niewielkie piki korespondowały ze związkami pp6 (O-heksozyd kwasu flawokermesowego) i pp9 (O-heksozyd kwasu kermesowego), wcześniej zidentyfikowanymi w czerwcu polskim [H10].

W przypadku ekstraktów z włókien wełny barwionej marzań barwierską (*Rubia tinctorum* L., ang. *madder*) część związków (alizaryna, purpuryna i rubiadyna) została zidentyfikowana przez porównanie ich z dostępnymi wzorcami, podczas gdy pozostałe opierały się na analizie i porównaniu widm MS/MS. Ksantopurpuryna, lucydyna, i nordamnakantal różnią się od siebie jedynie podstawnikiem w pozycji C-2, który to ulega fragmentacji w pierwszej kolejności (Rysunek 14). Poza tym niemal wszystkie inne sygnały w

obu widmach są takie same. Ponadto zarejestrowano też obecność związku charakteryzującego się znacznie dłuższym czasem retencji (oznaczonego jako rt1), który to na podstawie jego widm MS/MS został zdefiniowany jako dimer alizaryny i lucydyny.



Rysunek 14. Ogólny schemat fragmentacji antrachinonów obecnych w marzanie barwierskiej

Chromatogram ekstraktu marzany zawierał także piki odpowiadające pochodnym glikozydowym wymienionych już antrachinonów, tj. *O*-primewerozydowi lucydyny, kwasowi ruberytynowemu i *O*-primewerozydowi rubiadyny. Zidentyfikowano je głównie dzięki

charakterystycznej stracie fragmentu o masie 294 Da odpowiadającej ugrupowaniu primewerozydu oraz przez porównanie fragmentacji ich aglikonów z fragmentacją analogicznych wolnych antrachinonów, tj. lucydyny, alizaryny i rubiadyny [H10].

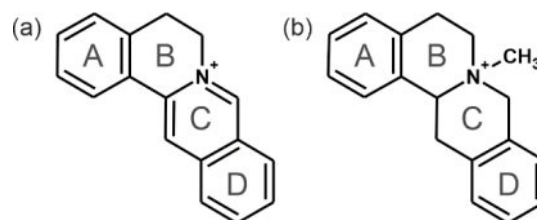
Wyniki moich badań przyczyniły się to do rozwoju wiedzy na temat chemicznego aspektu czerwieni stosowanych w dziełach sztuki, zwłaszcza czerwieni pochodzenia zwierzęcego. Na ich podstawie udało się ustalić naturę szerokiej gamy związków barwiących obecnych w czerwcu polskim, która to dotychczas pozostawała nieznana (w tym trzech markerów wskazanych ponad ćwierć wieku wcześniej przez Woutersa i Verhecken). Było to możliwe dzięki wysokiej czułości, jaką daje połączenie techniki HPLC z detekcją ESI-MS/MS. Co więcej opracowałam ścieżki fragmentacji kwasu karminowego (i jego pochodnych), jak i antrachinonów występujących w roślinach z rodziny marzanowatych.

Barwne alkaloidy [H6]

Alkaloidy to bardzo zróżnicowana grupa związków, z których niewielka część wykazuje właściwości barwiące. W swej strukturze zawierają one co najmniej jeden atom azotu, który nie został do niej wprowadzony w sposób sztuczny, tak jak to ma miejsce chociażby w przypadku orselki czy indygo. Występują one w różnych preparatach pochodzenia drzewnego, jednak tylko część z nich (przede wszystkim pochodzący z Azji korkowiec amurski oraz wywodząca się z Ameryki Północnej mahonia) miała rzeczywistą wartość użytkową i była stosowana jako barwnik naturalny. Można je odnaleźć przede wszystkim w obiektach zabytkowych pochodzących z Dalekiego Wschodu, najczęściej w mieszaninie z innymi barwnikami. Dlatego celem tej części prac było opracowanie metody do identyfikacji i oznaczania alkaloidów z korkowca amurskiego (*Phellodendron amurense* Rupr., ang. *Amur cork tree*), mahonii (*Mahonia aquifolium* Nutt., ang. *Oregon grape*) i berberysu europejskiego (*Berberis vulgaris* L., ang. *European barberry*), określenie ich profili chromatograficznych oraz sprawdzenie, które z alkaloidów biorą rzeczywisty udział w procesie barwienia naturalnych włókien zwierzęcych (wełny i jedwabiu). Badania były prowadzone z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej o mikrolitrowych przepływach fazy ruchomej (μ HPLC) połączonej z detekcją spektrofotometryczną typu DAD oraz detekcją ESI-MS/MS [H6].

Jako że zawarty w alkaloidach atom azotu wchodzi w skład struktury trzecio- lub czwartorzędowej aminy badania tych związków z użyciem techniki ESI-MS/MS były prowadzone w dodatnim trybie jonizacji. Analiza uzyskanych widm mas wykazała, że każda z grup badanych alkaloidów fragmentuje w inny, charakterystyczny dla siebie sposób.

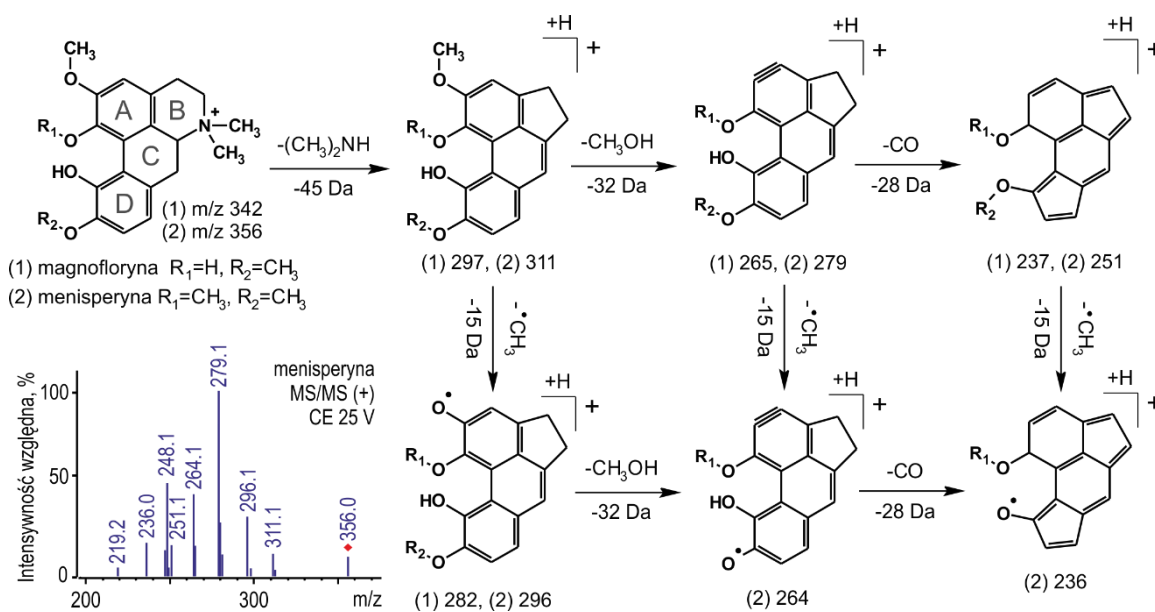
Alkaloidy z grupy protoberberyn (Rysunek 15), do których należą berberyna i atrozyna, ulegają fragmentacji poprzez eliminację małych cząsteczek obojętnych lub rodnikowych, najczęściej na skutek heterolitycznego lub homolitycznego rozpadu wiązań w obrębie grup



Rysunek 15. Szkielet alkaloidów z grupy
(a) protoberberyn oraz
(b) tetrahydropprotoberberyn

funkcyjnych. Należy zauważyć, że niesparowany elektron może być stabilizowany przez jego delokalizację w strukturze rezonansowej szkieletu protoberberyny, co sprzyja utracie rodników takich jak $\cdot\text{CH}_3$. Obserwowano również eliminację cząsteczki wodoru poprzez rozszczepienie dwóch wiązań C-H w pierścieniu B z zachowaniem ładunku przy atomie azotu.

Aporfiny, podobnie jak protoberberyny, ulegają fragmentacji głównie w obszarze grup funkcyjnych co skutkuje utratą małych fragmentów obojętnych lub małych rodników. W pierwszej kolejności dochodzi jednak do charakterystycznej eliminacji cząsteczki $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$ z czwartorzędowej grupy amoniowej (Rysunek 16), podobnie jak podczas fragmentacji benzylotetrahydroizochinolin. W przypadku tetrahydroprotoberberyn rozpad cząsteczek przebiega zupełnie inaczej. Z uwagi na wysycenie wiązań podwójnych pierścienia C fragmentacja następuje przede wszystkim na skutek reakcji RDA w obrębie tego pierścienia. Dopiero w drugim etapie zachodzi homolityczna eliminacja rodnika metylowego. Ponadto stwierdzono obecność dwóch izomerycznych bisbenzylisochinolin ulegających fragmentacji w wyniku charakterystycznego rozszczepienia dwóch wiązań C-C, a następnie demetylowaniu grupy metoksylowej podstawionej do pierścienia aromatycznego.



Rysunek 16. Proponowana ścieżka fragmentacji aporfyn oraz widmo MS/MS menisperyny

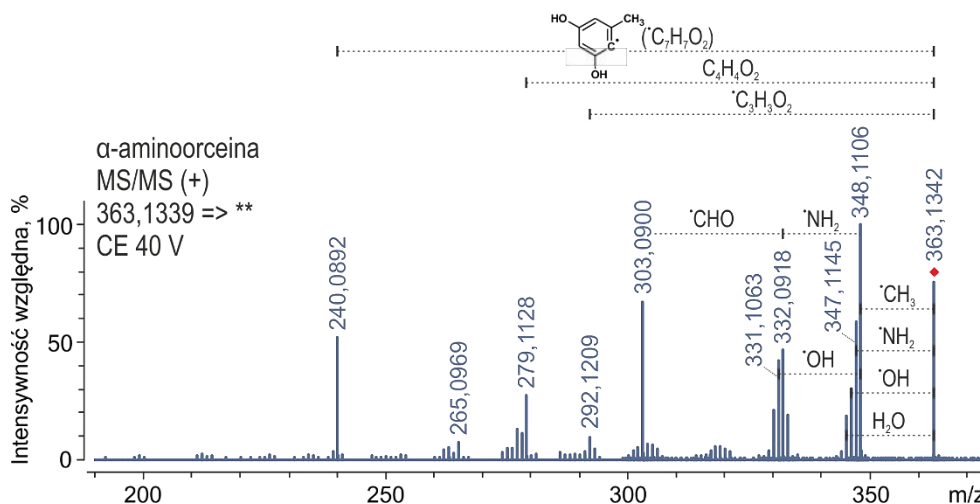
Na podstawie uzyskanych danych chromatograficznych potwierdziłam, że berberyna jest głównym związkiem barwiącym obecnym we wszystkich badanych ekstraktach. Oprócz niej potwierdziłam również obecność jatrorizyny i magnofloryny. Wytypowałam także markery korkowca amurskiego oraz mahonii. Ponadto zauważyłam, że efektywność procesu barwienia w przypadku berberysu europejskiego była niska (prawdopodobnie z uwagi na niewielką zawartość alkaloidów w tym preparacie), co tłumaczy jego minimalną stosowalność na przestrzeni wieków.

Orceiny [H10]

Orselka (*Roccella*, ang. *orchil*) to purpurowy barwnik bezpośredni stanowiący mieszaninę różnych orcein (związków na bazie szkieletu fenoksazyny). Związki te są one otrzymywane na skutek reakcji pomiędzy amoniakiem a pochodnymi kwasu orselinikowego zawartymi w porostach z rodzaju *Roccella*. W wyniku tego orselka jest jednym z niewielu barwników naturalnych, którego związki barwiące zawierają atomy azotu. Ich obecność w strukturze orcein determinuje stosowanie dodatniego trybu jonizacji podczas badań z użyciem techniki ESI-MS/MS. Jednak z uwagi na dużą trwałość struktury orcein (stabilizowaną rezonansem), ich fragmentacja z jednej strony wymaga zastosowania dużych energii kolizji, z drugiej zaś skutkuje powstawaniem licznych jonów potomnych o małej intensywności.

Jak dotąd opublikowano tylko dwie prace mówiące o identyfikacji orcein w obiektach zabytkowych z użyciem techniki HPLC-ESI-MS^{18,19}. I choć w obu przypadkach stosowano tandemowe spektrometry mas, to jednak w żadnej z nich nie pokuszono się o próbę interpretacji uzyskanych widm. Stąd moja praca badawcza skupiła się na szczegółowej analizie widm mas orcein w celu określenia ich ścieżek fragmentacji, co stanowiłoby podstawę do poznania procesów rozpadu fenoksazyn w fazie gazowej i mogłoby być pomocne w ich identyfikacji z użyciem techniki spektrometrii mas.

Próbki wełny barwionej orselką (uzyskaną z porostu *Roccella tinctoria* DC.) otrzymałam od dr Dominuque Cardon z laboratorium CIHAM Narodowego Centrum Badań Naukowych (CNRS, Lyon, Francja). Na zarejestrowanych chromatogramach odnotowano dziewięć pików pochodzące od α -, β - i γ - aminoorcein, aminoorceinimin i hydroksyorcein. Mimo że ich widma mas jonów potomnych (MS/MS) uzyskane za pomocą spektrometru mas z potrójnym

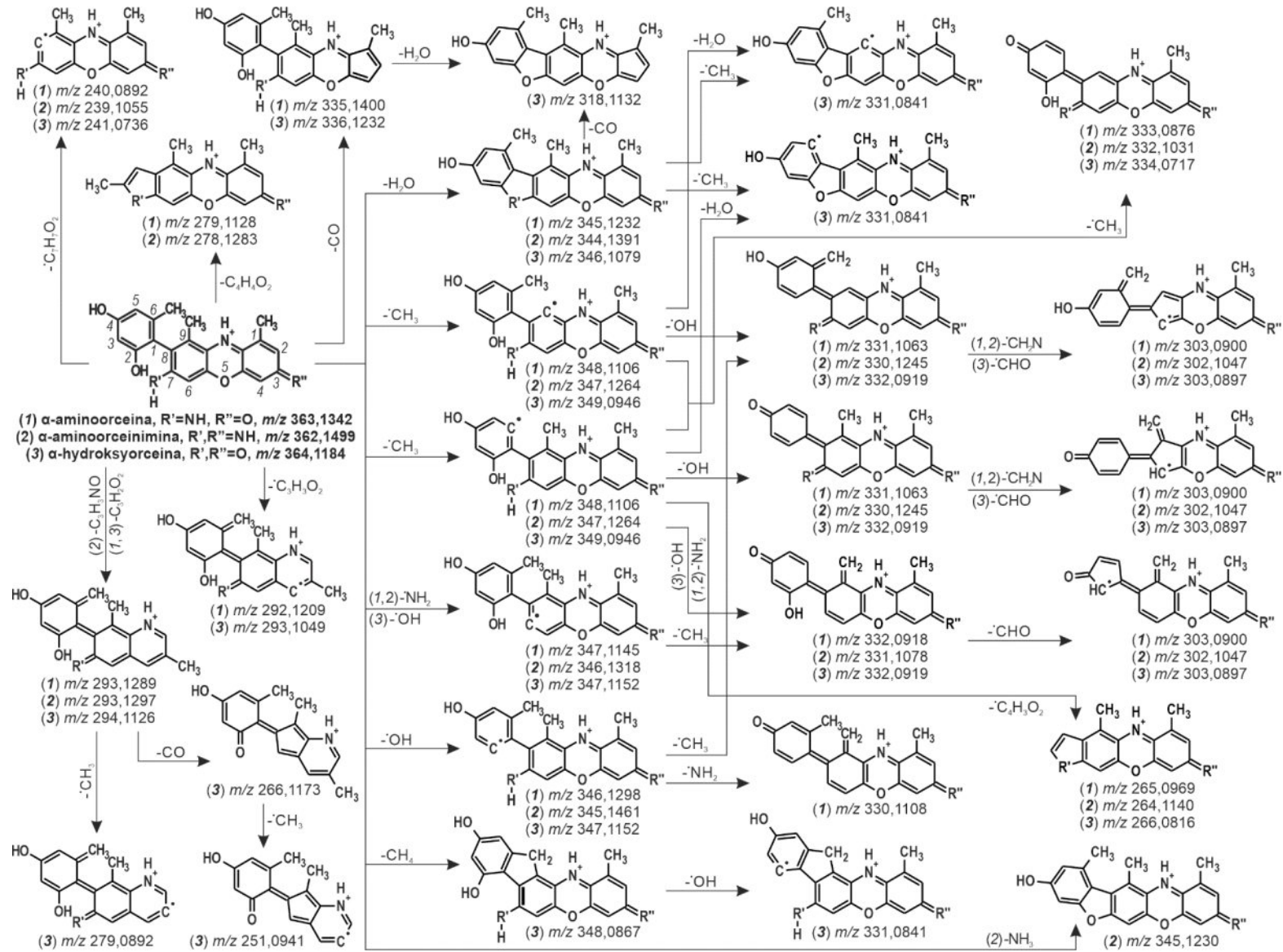


Rysunek 17. Wysokorozdzielcze widmo MS/MS zarejestrowane dla jonu $[M+H]^+$ α -aminoorceiny [H10]

¹⁸ B. Witkowski, M. Ganeczko, H. Hryszko, M. Stachurska, T. Gierczak, M. Biesaga. *Microchemical Journal*. 2017; 133: 370-79, doi:10.1016/j.microc.2017.03.049.

¹⁹ E. Calà, M. Benzi, F. Gosetti, A. Zanin, M. Gulmini, A. Idone, I. Serafini, A. Ciccola, R. Curini, I. Whitworth, M. Aceto. *Microchemical Journal*. 2019; 150: 104140, doi:10.1016/j.microc.2019.104140.

Rysunek 18.
Proponowana
ścieżka
fragmentacji
 α -orcein [H10]



analizatorem kwadrupolowym były bardzo podobne do siebie (Rysunek 17), to identyfikacja poszczególnych sygnałów była bardzo trudna, z uwagi na możliwość utraty różnorodnych fragmentów izobarycznych. Ze względu na strukturę związku strata 17 Da mogła odpowiadać oderwaniu $\cdot\text{OH}$ lub NH_3 , podczas gdy fragment o masie 29 Da mógł korelować z oderwaniem $\cdot\text{CHO}$, $\cdot\text{C}_2\text{H}_5$, $\cdot\text{CH}_2\text{N}$ lub CH_2NH . Utrata tych fragmentów obojętnych jest niemożliwa do rozróżnienia za pomocą niskorozdzielczego spektrometru mas, dlatego ekstrakty wełny barwionej orselką były również poddane badaniom z użyciem tandemowego spektrometru mas z analizatorem czasu przelotu (QToF-MS) w ramach współpracy z prof. dr hab. Emilią Fornal z Katedry i Zakładu Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie [H10].

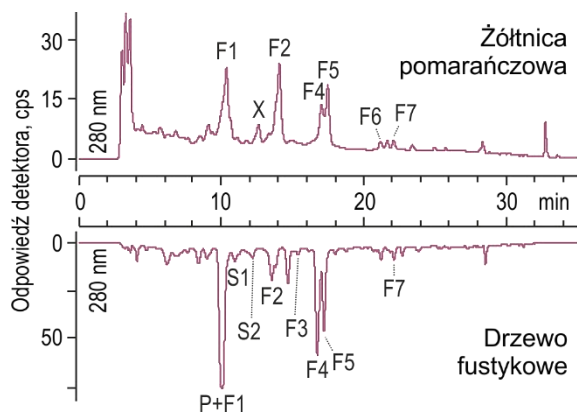
Na podstawie wysokorozdzielczych widm mas określiłam ścieżki fragmentacji orcein (Rysunek 18). W pierwszej kolejności zachodzi (1) oderwanie małych rodników ($\cdot\text{CH}_3$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NH}_2$), co jest generalnie rzadko spotykane w dysocjacji jonów parzystoelektronowych, jednak w tym przypadku możliwe dzięki stabilizacji niesparowanego elektronu przez strukturę rezonansową orcein. Dodatkowo towarzyszy jej także (2) utrata małych fragmentów obojętnych (takich jak H_2O , CH_4 , CO). W następnym etapie następuje (3) dalsza eliminacja tych samych małych cząsteczek (neutralnych i rodnikowych) z pierwotnych jonów potomnych, jak również oderwanie nowych fragmentów (np. $\cdot\text{CHO}$ czy $\cdot\text{CH}_2\text{N}$, a także $\cdot\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_2$ i $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2$) obejmujących podstawniki w pozycji C-8 fenoksazyny. Fragmentacja orcein zachodzi również na skutek (4) homolitycznego rozszczepienia wiązania C-C pomiędzy pierścieniem fenylowym a szkieletem fenoksazyny, co prowadzi do oderwania rodnika 2,4-dihydroksy-6-metylofenylowego ($\cdot\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_2$). Obserwuje się także (5) rozerwanie szkieletu fenoksazyny z oderwaniem struktury pomiędzy atomami 3 i 5 ($\cdot\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2$ i $\text{C}_3\text{H}_2\text{O}_2$ lub $\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}$).

Wnikliwe studium fragmentacji orcein, które przedstawiłam na podstawie wysokorozdzielczych widm mas jonów potomnych (MS/MS), dostarcza cennych informacji nie tylko w kontekście identyfikacji barwników naturalnych, ale także badania barwników syntetycznych z grupy oksazyn (o numerach *Color Index* 51000-51999), które są używane m.in. do barwienia lipidów, mikroorganizmów czy tkanek.

Inne markery barwników naturalnych [H8, H11]

Niektóre barwniki naturalne oprócz związków barwiących zawierają również bezbarwne komponenty, które wspomagają proces barwienia lub mu towarzyszą. Związki takie, mimo, że nie wykazują zdolności pochłaniania promieniowania z zakresu światła widzialnego, to mogą stanowić markery tych barwników.

Jak dotąd, według mojej najlepszej wiedzy, nie było żadnych doniesień o identyfikacji drzewa fustykowego (*Maclura tinctoria* Steud., ang. *old fustic*) czy żółtnicy pomarańczowej (*Maclura pomifera* Schneid., ang. *Osage orange*) w obiektach historycznych. Co więcej, jak już wspomniałam, oba barwniki mają bardzo podobną kompozycję związków barwiących, co tym bardziej utrudnia ich identyfikację. Źródła literaturowe mówią jedynie o zawartych w nich flawonoidach (morynie, ewentualnie kemferolu), jednak te nie pozwalają rozróżnić obu



Rysunek 19. Chromatogramy ekstraktów barwników naturalnych zarejestrowane za pomocą detektora spektrofotometrycznego; F1-7 – flawonoidy, S1-2 – dimery stylbenowe, P – pikeatannol (stylbenoid), X – ksanton

tym sygnałów powstających w wyniku reakcji RDA, określono liczbę i rodzaj grup funkcyjnych obecnych w jego strukturze [H8].

Innymi związkami niewykazującymi absorpcji promieniowania w zakresie światła widzialnego jest grupa bezbarwnych izomerów określanych mianem komponentów ct (ct1-ct4). Związki te zostały zdefiniowane przez Woutersa i innych²¹ jako markery krokosza barwierskiego, gdyż są obecne zarówno w wybarwieniach żółtych, jak i czerwonych, bez względu na ich stan zachowania czy stosowaną metodę ekstrakcji. Związki te, w przeciwieństwie do wyżej opisanych C-glukozydów chinochalkonów, nie są podatne ani na fotodegradację, ani na hydrolizę. Dotychczas na ich temat wiadomo było jedynie, że są izomerami o masie nominalnej 583 Da, a zatem zawierają nieparzystą liczbę atomów azotu, mimo to ich struktura nie została dotychczas ustalona. Z tego powodu, w toku prowadzonych przeze mnie prac poświęconych markerom krokosza i ich zróżnicowaniu z uwagi na rodzaj barwionego włókna oraz stosowaną procedurę barwienia, swoje wysiłki skupiłam również na próbie identyfikacji komponentów ct. Badania oparłam przede wszystkim na nisko- i wysokorozdzielczych widmach MS/MS, ale także krzywych absorpcji uzyskanych dla związków rozdzielonych przy użyciu techniki HPLC [H11].

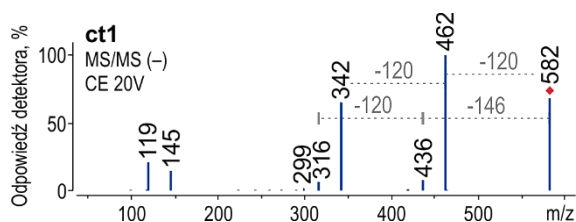
W przeciwieństwie do Woutersa i innych autorów, na chromatogramie stwierdzono obecność co najmniej sześciu pików pochodzących od komponentów ct (oznaczone jako ct1-ct6), choć nie wszystkie one były w pełni rozdzielone. Na podstawie wysokorozdzielczych widm MS ustalono, że związki te zawierają po trzy atomy azotu, ale mimo tego łatwo ulegały one jonizacji ESI w trybie jonów ujemnych. Ich widma MS/MS były prawie identyczne i

preparatów. Przeprowadzone badania wykazały, że związki z grupy stylbenoidów i ksantonów mogą stanowić markery drzewa fustykowego oraz żółtnicy pomarańczowej (Rysunek 19).

Najbardziej intensywny pik w ekstrakcie drzewa fustykowego odpowiadał pikeatannolowi, którego ścieżkę fragmentacji określiła wcześniej Stella i inni²⁰. Towarzyszyły mu inne dwa dimery pikeatannolu, których struktura nie została jednak jednoznacznie zdefiniowana. W przypadku żółtnicy pomarańczowej odnotowano obecność ksantonu. Na podstawie jego widm MS/MS, w

²⁰ L. Stella, M. De Rosso, A. Panighel, A.D. Vedova, R. Flamini, P. Traldi. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2008; 22: 3867-72, doi:10.1002/rcm.3811.

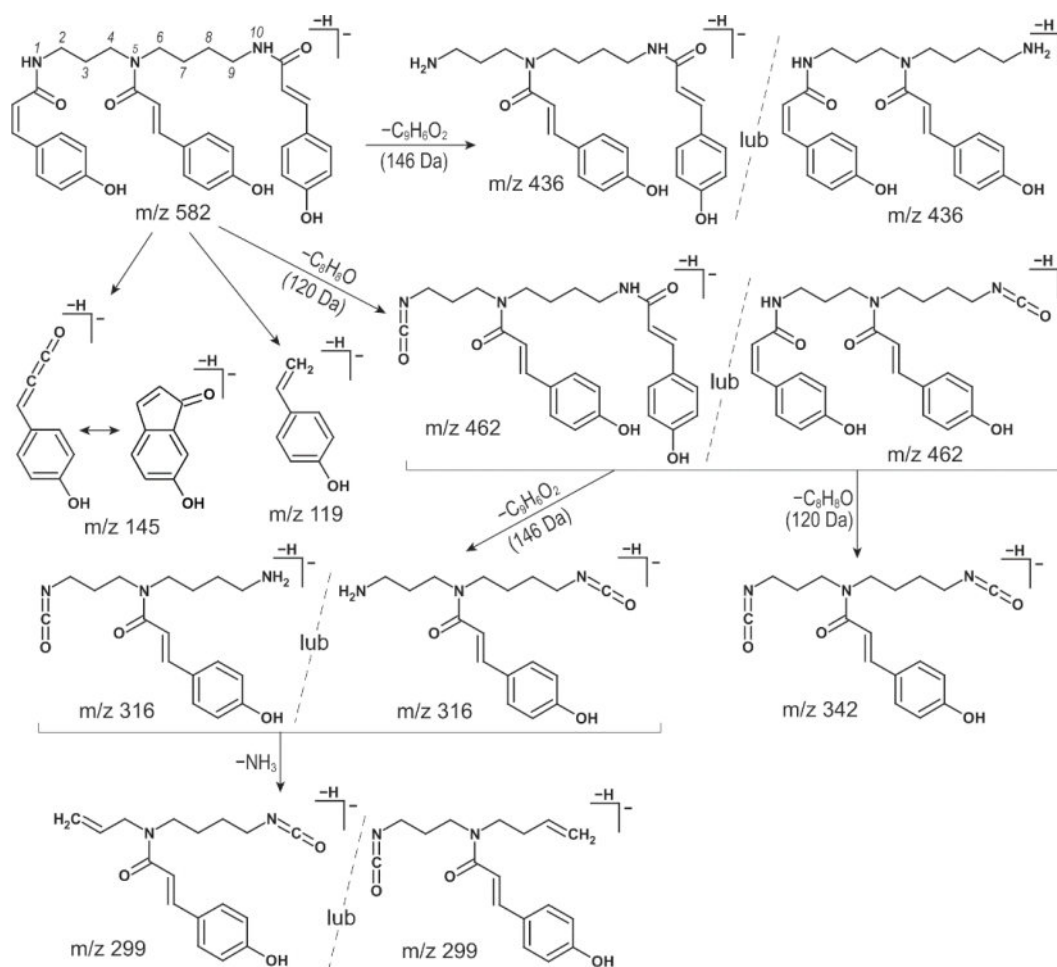
²¹ J. Wouters, C.M. Grzywacz, A. Claro. *Studies in Conservation*. 2010; 55: 186-203, doi:10.1179/sic.2010.55.3.186.



Rysunek 20. Widmo MS/MS związku ct1 (tryb jonów ujemnych)

zawierały kilka wyraźnych sygnałów (Rysunek 20), korespondujących z utratą kolejnych cząsteczek 4-winylofenolu (C_8H_8O) o masie 120 Da lub 6-hydroksy-1-indenonu ($C_9H_6O_2$) o masie 146 Da, a także analogiczne jony o m/z 119 i 145 (typowe dla fragmentacji grupy *p*-kumarylowej, jak w przypadku C-glikozydów chinochalkonów).

Wszystkie te informacje pozwoliły mi stwierdzić, że związki określane jako komponenty ct to w rzeczywistości stereoizomery N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-kumaroilospermidyny (ZZZ, ZZE, ZEZ, EZZ, ZEE, EZE, EEZ i EEE), które różnią się od siebie geometrią trzech wiązań podwójnych grupy *p*-kumarylowej. Proponowaną ścieżkę fragmentacji przedstawiłam na Rysunku 21. Porównując ich krzywe absorpcji oraz dostępne w literaturze widma N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-kumaroilospermidyn ustaliłam, że jako pierwszy kolumnę chromatograficzną w odwróconym układzie faz opuszcza izomer ZZZ, natomiast jako ostatni izomer EEE. Co więcej N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-kumaroilospermidyny wykazują zdolności do fotoizomeryzacji, a zatem intensywność poszczególnych pików



Rysunek 21. Proponowana ścieżka fragmentacji związków ct na przykładzie N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-(ZEE)-kumaroilospermidyny w trybie jonów ujemnych

odpowiadających związkom ct zależy od natężenia promieniowania²² jakie na przestrzeni wieków padało na dany obiekt.

Wyniki uzyskane w toku moich badań wykazały, że technika spektrometrii mas jest bardzo pomocna w identyfikacji struktury nieznanymi substancji pochodzenia naturalnego (w tym po raz pierwszy N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-kumaroilospermidyny), które nie przynależą do żadnej z grup związków barwiących, jednak są ważnymi diagnostycznie związkami towarzyszącymi. Niemniej jednak interpretacja uzyskanych danych jest procesem bardzo skomplikowanym i wymaga dużej wiedzy na temat fragmentacji związków organicznych. Dlatego też nieoceniona jest możliwość zastosowania do badań układu wysokorozdzielczego MS, który dostarcza komplementarnych informacji na temat składu pierwiastkowego poszczególnych fragmentów.

Indygoidy oraz produkty ich degradacji [H3, H10]

Obiekty zabytkowe ulegają z czasem degradacji pod wpływem wielu czynników zewnętrznych, takich jak działanie tlenu, wilgoci i temperatury, jednak to ekspozycja na promieniowanie słoneczne jest głównym czynnikiem blaknięcia wynikającym ze zmian strukturalnych związków barwnych. Zrozumienie mechanizmu tego procesu jest ważne, ponieważ pozwala określić stopień degradacji obiektu, a także pomaga w ustaleniu sposobów jego ochrony.

Indygo było jednym z najbardziej popularnych barwników naturalnych na świecie. Preparat ten był stosowany do barwienia na niebiesko, ale także używano go do uzyskiwania kolorów mieszanych, takich jak zielony czy fioletowy. Choć jest to barwnik pochodzenia roślinnego, to jego związki barwiące nie występują bezpośrednio w materiale roślinnym, lecz powstają w wyniku reakcji enzymatycznych, a następnie utleniania ich prekursorów. W procesie tym, obok niebieskiej indygotyny mogą powstawać również jej izomery (głównie indyrubina, rzadziej izoindygotyna) charakteryzujące się kolorami przesuniętymi w kierunku czerwieni²³. I choć indygo jest barwnikiem względnie stabilnym, z czasem ulega fotodegradacji.

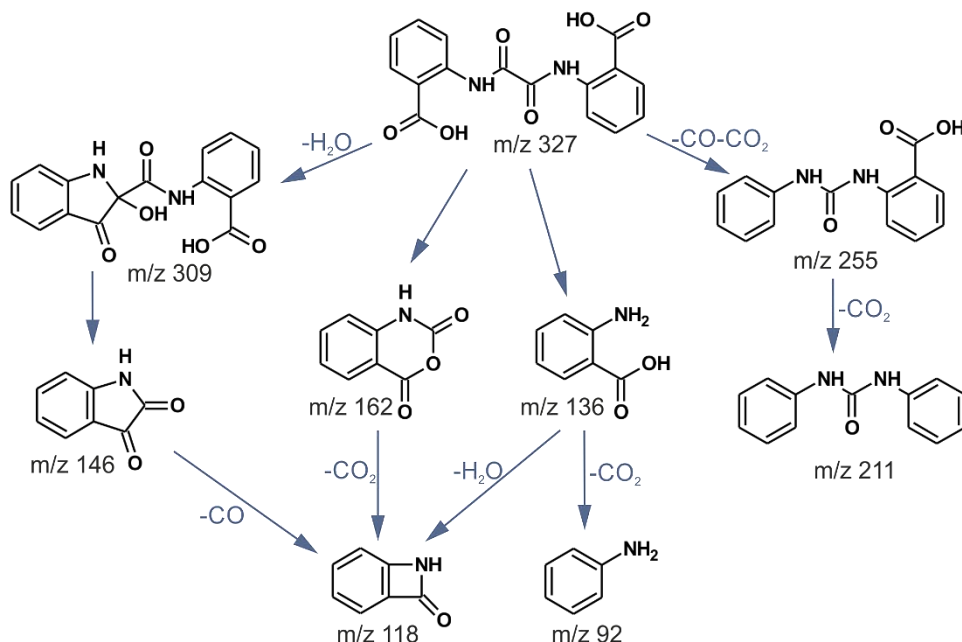
Celem tej części badań była identyfikacja produktów fotodegradacji indygoidów, a w konsekwencji opracowanie metody pośredniej identyfikacji naturalnych barwników na podstawie produktów ich degradacji. Próbki indygo były poddawane przyspieszonemu fotostarzeniu w komorze wyposażonej w lampę ksenonową. Badania były prowadzone przede wszystkim z użyciem techniki μ HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS, ale także wsparto się wysokorozdzielczym spektrometrem mas typu ESI-QToF-MS w ramach współpracy z prof. dr. hab. inż. Witoldem Danikiewiczem z Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, stosując zarówno jonizację w trybie jonów dodatnich, jak i ujemnych [H3].

²² Natężenie promieniowania jest silnie zależy od lokalizacji i od warunków atmosferycznych. Najczęściej jest wyrażane w $W \cdot m^{-2}$ i odpowiada wartości gęstości mocy promieniowania padającego na powierzchnię $1 m^2$; M.T. Sarniak, P.W.O. Wydawnicza. *Systemy fotowoltaiczne*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej; 2019.

²³ J. Balfour-Paul. *Indigo*. British Museum Press; 1998.

Oprócz dobrze znanych produktów degradacji indygoidów, takich jak izatyna, bezwodnik izatowy i kwas antranilowy, zidentyfikowano także siedem innych związków powstających w wyniku degradacji indygoidów. Większość z nich charakteryzowała się niewielką masą cząsteczkową i zawierała jeden atom azotu. Dokładna analiza ich widm MS/MS wykazała, że z jednej strony jony $[M-H]^-/[M+H]^+$ tych produktów degradacji łatwo traciły cząsteczki CO_2 i CO pochodzące z grup karboksylowych i karbonylowych, które to jednak nie dostarczały wielu informacji analitycznych w przypadku tej grupy związków, z drugiej zaś dochodziło do oderwania bardziej charakterystycznych fragmentów, takich jak formaldehyd, aldehyd szczawiowy, etenon czy metanol. To właśnie na ich podstawie zaproponowano struktury badanych związków. Poprawność identyfikacji potwierdzono w oparciu o dokładne masy cząsteczkowe i składy pierwiastkowe związków określone na podstawie wysokorozdzielczych widm mas zarejestrowanych za pomocą techniki UHPLC-ESI-QTOF-MS. Ponadto przeprowadzono również syntezę kwasu *N*-metoksykarbonyloantranilowego dzięki czemu potwierdzono obecność tego związku wśród produktów degradacji indygo.

Kolejne trzy związki powstające w procesie fotostarzenia charakteryzowały się nieco większymi masami cząsteczkowymi, a przy tym zawierały dwa atomy azotu. Nie każdy z nich był jednak obecny w przypadku degradacji wszystkich indygoidów, co może stanowić podstawę do ich rozróżnienia. Obserwowana fragmentacja tych związków przebiegała w dwojaki sposób, tj. (1) przez utratę małych fragmentów obojętnych oraz (2) przez rozerwanie wiązania pomiędzy dwoma pierścieniami w ich strukturze (Rysunek 22).



Rysunek 22. Schemat fragmentacji jednego z produktów degradacji indygotyny (kwasu *N,N'*-oksalilo-diantranilowego) [H3]

Na podstawie zidentyfikowanych produktów degradacji indygotyny zaproponowano mechanizm jej fotodegradacji z udziałem aktywnych form tlenu [H3].

Inne badania prowadzone z udziałem indygo wykazały, że, oprócz indygotyny i indyrybiny, indygo może zawierać również inne związki barwiące. Na podstawie widm mas ustalono, że, podobnie jak indygotyna i indyrybina, są to substancje będące izomerami o składzie pierwiastkowym $C_{16}H_{11}N_3O$ i strukturze bardzo zbliżonej do wspomnianych związków, w których najprawdopodobniej jeden z atomów tlenu został zastąpiony przez atom azotu [H10]. Wydawało się jednak, że związki te nie mają kluczowego znaczenia dla identyfikacji indygo w obiektach historycznych.

Podsumowując tę część badań należy podkreślić, że zastosowanie technik łączonych, czyli technik rozdzielania (HPLC lub μ HPLC) zestawionych z technikami tandemowej spektrometrii mas (ESI-MS/MS), umożliwiło profilowanie barwników organicznych stosowanych w obiektach historycznych. W oparciu o uzyskane wyniki badań określono, a także szczegółowo scharakteryzowano ich markery. Zdefiniowano także udział ekstrahenta w modyfikowaniu struktury *O*-glukuronidowych pochodnych flawonoidów w procesie ich ekstrakcji. Uzyskane wyniki badań stanowiły podstawę dla dalszych prac ukierunkowanych na opracowanie postępowania analitycznego do identyfikacji barwników organicznych w obiektach zabytkowych.

B. OPRACOWANIE I ZASTOSOWANIE METODYKI ANALITYCZNEJ UKIERUNKOWANEJ NA IDENTYFIKACJĘ BARWNIKÓW ORGANICZNYCH W OBIEKTACH DZIEDZICTWA KULTUROWEGO [H1, H3-H5, H7-H11]

Od samego początku prowadzone przeze mnie prace badawcze z użyciem techniki HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS dotyczące charakterystyki barwników naturalnych stosowanych w obiektach zabytkowych budziły zainteresowanie muzealników i konserwatorów sztuki. Zgłaszali oni potrzebę identyfikacji materii barwnej w powierzonych im obiektach, która z jednej strony miała być pomocna w analizie artystycznej i historycznej tych dzieł, a z drugiej zaś w zaplanowaniu działań ukierunkowanych na ich ochronę. Zainteresowanie to przełożyło się na współpracę z licznymi instytucjami kultury i nauki w Polsce (m.in. Muzeum Narodowym w Warszawie, Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie, Muzeum Narodowym w Krakowie, Uniwersytetem Papieskim Jana Pawła II w Krakowie), w zakresie badania barwników organicznych w obiektach dziedzictwa kulturowego.

Identyfikacja barwników w próbkach muzealnych wymaga jednak w pierwszej kolejności opracowania skutecznej metody analitycznej obejmującej ekstrakcję związków barwiących i ich identyfikację z użyciem techniki HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS. Stąd też wyniki uzyskane w ramach prowadzonych przeze mnie prac badawczych opisanych w części A rozprawy stanowiły podstawę do opracowania postępowań analitycznych, które uwzględniały nie tylko dostępne komercyjnie związki barwiące, ale także inne, zdefiniowane przeze mnie w toku badań (a często wcześniej nieznanne), markery barwników naturalnych. Badania prowadziłam dla kilku grup próbek pobranych z obiektów muzealnych, wśród których były:

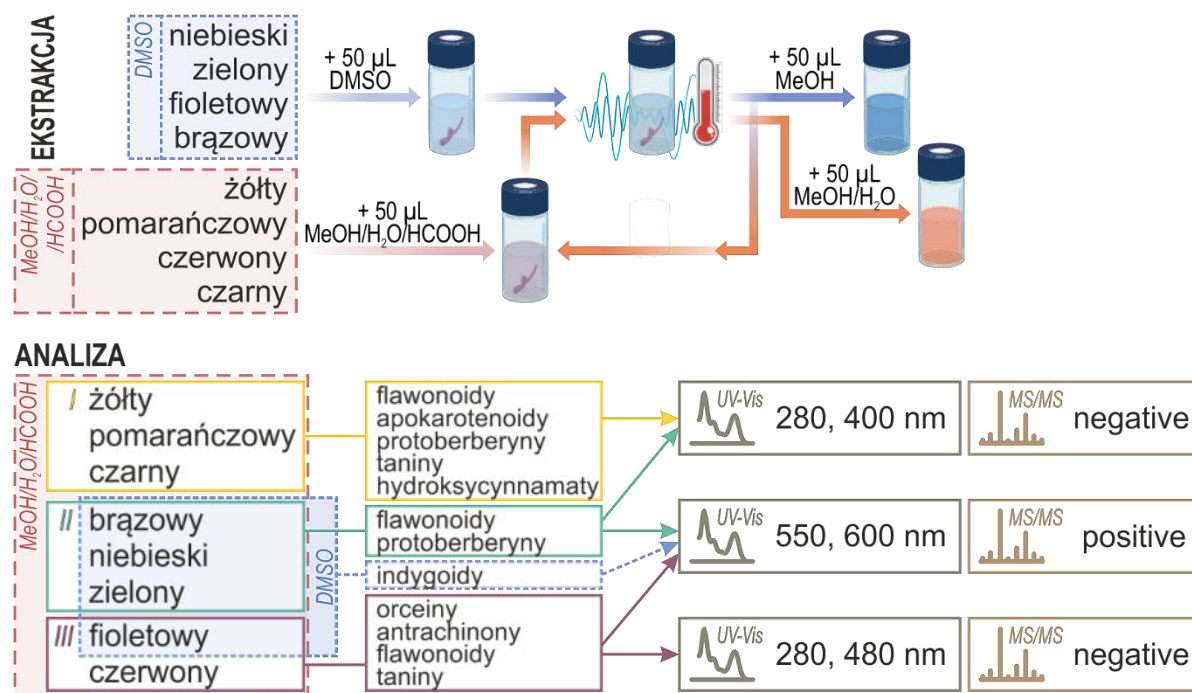
- (1) włókna pobrane z tapiserii „Sceny z opery” (1771-1773 r., Francja, warsztat Audran w manufakturze Les Gobelins w Paryżu, obiekt z kolekcji Muzeum Pałacu Króla Jana III w Wilanowie, współpraca w ramach projektu NCN) [H3];
- (2) włókna pobrane z tkanin pre-kolumbijskich pochodzących z kultury Inka oraz Chuquibamba (z Państwowego Muzeum Etnograficznego w Warszawie oraz z kolekcji prywatnej udostępnionej przez mgr Ewę Soszko z Akademii Sztuk Pięknych w Warszawie) [H4];
- (3) nici pobranych z wyrobów tekstylnych pochodzenia polskiego datowanych na XVI-XIX w. (własność Muzeum Narodowego w Warszawie) [H5];
- (4) fragmenty banknotów kościuszkowskich z 1794 r. pochodzące z pięciu różnych nominałów (z kolekcji Muzeum Narodowego w Krakowie) [H7];
- (5) 323 włókna pobrane z jedwabnych tkanin (włoskich, francuskich, niemieckich i pochodzących z Bliskiego Wschodu) datowanych na XV-XVIII w. i stosowanych w szatach i paramentach liturgicznych z zasobów kościelnych Krakowa (współpraca w ramach projektu realizowanego przez Uniwersytet Papieski Jana Pawła II w Krakowie) [H8, H9, H10, H11];
- (6) nici jedwabne pobranych z wiosennej palety barw Liońskiego Cechu Farbiarzy z 1930 roku (La Chambre Syndicale des Teinturiers) ze zbiorów Muzeum Narodowego w Warszawie [H1].

Należy podkreślić, że postępowanie analityczne stosowane przeze mnie podczas badania próbek pobranych z obiektów dziedzictwa kulturowego ewoluowało w czasie i było udoskonalane w celu stworzenia optymalnego podejścia analitycznego, które uwzględniałoby właściwości fizykochemiczne potencjalnych analitów. Podczas jego opracowywania kierowałam się jedenastoma podstawowymi kryteriami, wśród których były:

- (i) ograniczenie niezbędnej do badań ilości próbki do minimum, a jednocześnie
- (ii) uzyskanie na podstawie tego materiału jak największej ilości informacji analitycznych;
- (iii) ograniczenie objętości ekstraktu;
- (iv) zastosowanie efektywnej metody ekstrakcji dostosowanej do właściwości fizykochemicznych wyodrębnianych związków barwiących, a przy tym
- (v) zastosowanie uniwersalnej metody ekstrakcji względem jak najszerszej gamy analitów (co niejako wymuszała mała ilość próbki);
- (vi) możliwość rozdzielenia jak największej liczby markerów barwników organicznych (o szerokim wachlarzu hydrofobowości) przy zachowaniu jak najlepszej rozdzielczości chromatograficznej, zwłaszcza względem związków obecnych w poszczególnych barwnikach;
- (vii) uzyskanie wysokiej czułości i selektywności względem analitów poprzez:
 - zastosowanie trybu dynamicznego monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (ang. *dynamic Multiple Reaction Monitoring*, dMRM),

- który pozwala na prowadzenie analizy celowanej, ukierunkowanej na detekcję zdefiniowanej listy związków o określonym czasie retencji,
- wybór od 2 do 5 najbardziej intensywnych i/lub charakterystycznych transmisji jonów dla każdego analitu;
- (viii) prowadzenie detekcji MS/MS zarówno w trybie jonów dodatnich jak i ujemnych w celu identyfikacji pełnego wachlarza związków barwiących, również tych zdolnych do jonizacji tylko w jednym z trybów;
- (ix) uzyskanie za pomocą detektora spektrofotometrycznego (jednowiązkowego i/lub typu DAD) jak największej liczby informacji na temat absorpcji promieniowania przez anality;
- (x) weryfikacja składu jakościowego ekstraktów przez porównanie profili chromatograficznych uzyskanych za pomocą detektora spektrofotometrycznego i MS/MS (rola kontrolna), a w konsekwencji
- (xi) możliwość detekcji związków barwiących nie ujętych w metodzie dMRM oraz możliwość określenia ich tożsamości za pomocą techniki HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS (na podstawie dodatkowych eksperymentów).

W efekcie opracowałam sekwencyjną metodę ekstrakcji związków barwiących z próbek (z zastosowaniem rozpuszczalników protonowych i aprotonowych), która ograniczyła niezbędną do kompleksowych badań ilość próbek [H8], a także zaproponowałam protokół ich analizy, obejmujący detekcję UV-Vis (dostosowaną w zakresie widzialnym do barwy analitów) i MS/MS (uwzględniającą różne typy trybów jonizacji dla poszczególnych ekstraktów) (Rysunek 23) [H10].



Rysunek 23. Podejście analityczne obejmujące ekstrakcję związków barwiących oraz ich analizę

Opracowane postępowanie analityczne, wraz z uzyskanymi w wyniku moich prac chromatogramami i widmami MS/MS (zarówno dla wzorców analitycznych, jak i dla ekstraktów otrzymanych z laboratoryjnych materiałów odniesienia), stało u podstaw utworzenia platformy badawczej do identyfikacji barwników naturalnych w obiektach dziedzictwa kulturowego. Wyniki badań otrzymane dla próbek muzealnych potwierdziły jej stateczność, a wskazane przeze mnie markery barwników naturalnych miały kluczowe znaczenie dla identyfikacji wielu preparatów.

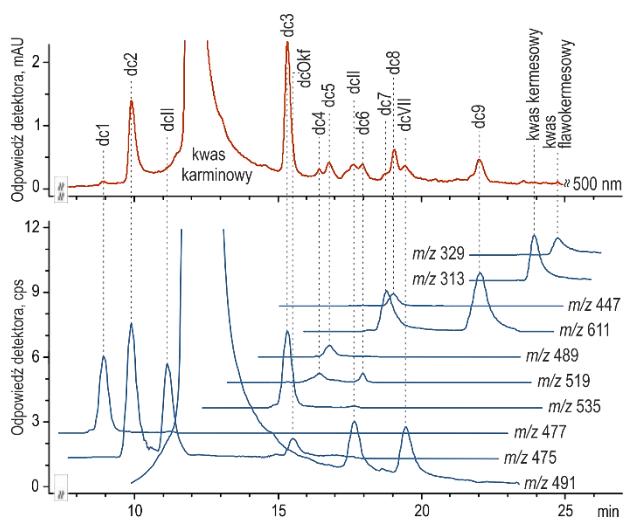
Barwniki naturalne [H3-H5, H7-H11]

Wśród barwników rozpoznanych w badanych próbkach włókien były m.in. jagody szakłaku (zidentyfikowane na podstawie obecności zdefiniowanych O-glikozydów oraz emodyny), drzewo fizetowe, kermes, czerwień z szelaku czy marzana [H8-H11]. W przypadku tej ostatniej badania wykazały, że do barwienia stosowano trzy różne preparaty pozyskiwane z korzeni *Rubia tinctorum* L., *Rubia peregrina* L. i *Galium*. Świadczyły o tym różnice w kompozycji ekstraktów, np. nordamnakantalu, alizaryny i rubiadyny [H10]. Barwnik ten zidentyfikowano również w dwóch najwyższych nominałach banknotów kościuszkowskich (czerwonym i różowym), w tym również w towarzystwie drzewa fustykowego [H7]. Ponadto w ponad czterdziestu próbkach pobranych z tkanin zabytkowych zidentyfikowano orselkę, która jednak nigdy nie była stosowana samodzielnie, lecz zawsze w połączeniu z innymi barwnikami (jak np. indygo, kermes, marzana) [H10].

Jednym z najczęściej spotykanych barwników było indygo, które było otrzymane z urzetu lub z innej rośliny indygoidej (np. z indygowca). Preparat ten został zidentyfikowany w ponad 130 badanych próbkach włókien [H8-H11]. Co więcej w zielonych i brązowych włóknach pobranych z tapiserii „Sceny z opery” stwierdzono obecność nie tylko indygotyny, ale także nowozdefiniowane produkty jej degradacji [H3]. Należy podkreślić, że zastosowana w tych pracach technika μ HPLC w połączeniu z tandemową spektrometrią mas pozwoliła zminimalizować objętość ekstraktu potrzebnego do wykonania pojedynczej analizy do 0,1 μ L, zapewniając przy tym efektywne rozdzielanie jej składników oraz ich detekcję. Jest to szczególnie istotne w przypadku badania obiektów dziedzictwa kulturowego, gdzie często z uwagi na wartość dzieła (i/lub stan jego zachowania) istotne jest ograniczenie ilości pobieranego do badań materiału.

Ponadto zarówno w próbkach tekstyliów polskich, jak i w tkaninach jedwabnych stosowanych w szatach liturgicznych zidentyfikowano czerwiec polski [H5, H10]. Jego obecność określono głównie na podstawie obecności związku pp6, choć jego pik był niewielki. Jednak przeważająca liczba badanych próbek była barwiona przy użyciu koszenili amerykańskiej. Zidentyfikowano ją w ponad 130 próbkach pobranych z tkanin polskich, włoskich i tureckich [H5, H10]. W toku badań okazało się, że w przypadku tkanin prekolumbijskich barwionych czerwiecią zwierzęcą, obok dobrze znanych markerów koszenili, takich jak kwas karminowy, dcII, dcIV, dcVII, dcOfka, odnotowano obecność dziewięciu innych

związków, która znalazła swoje odbicie na chromatogramach, również tych zarejestrowanych w zakresie światła widzialnego (Rysunek 24) [H4]. W ramach dodatkowych prac podjęłam próbę zidentyfikowania tych substancji za pomocą techniki HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS. Jako że badania prowadzono na próbkach pobranych z obiektów muzealnych, jak zawsze w tego typu przypadkach, istotne ograniczenie stanowiła objętość ekstraktu pozostała po przeprowadzeniu podstawowych badań wynikających z postępowania analitycznego. Z tego tytułu kolejne eksperymenty musiały być starannie przygotowane pod kontem detekcji MS/MS, tak, aby pozyskać jak największą ilość informacji strukturalnych na temat badanych



Rysunek 24. Chromatogramy ekstraktu z włókna pobranego z tkaniny prekolumbijskiej barwionej koszenilą amerykańską zarejestrowane za pomocą detektora spektrofotometrycznego (linia czerwona) oraz detektora ESI-MS/MS w trybie jonów ujemnych zrekonstruowane dla wybranych wartości m/z (linie niebieskie) [H4]

wolnej grupy karboksylowej, (2) oderwaniu cząsteczek $C_3H_6O_3$ (90 Da), $C_4H_8O_4$ (120 Da) i $C_5H_8O_5$ (148 Da) z C-podstawionej heksozy oraz (3) eliminacji H_2O pomiędzy dwoma podstawnikami hydroksylowymi w pozycji C-2'' reszty cukru i w pozycji C-5 lub C-7 aglikonu, której następnie towarzyszy utrata $C_2H_4O_2$ (60 Da) z reszty heksozy, które są również typowe dla kwasu karminowego. Towarzyszyły im bardziej specyficzne fragmentacje, takie jak utrata kwasu hydroksybenzoesowego (138 Da), cząsteczki $C_7H_4O_2$ (120 Da) i glikolu etylenowego (62 Da), niosące informacje na temat modyfikacji jakie zaszły w strukturze tego kwasu. Jednakże jedynie dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczego detektora ESI-QIT/ToF-MS zaobserwowano rzadko spotykaną utratę cząsteczki O_2 (32 Da), świadczącej o występowaniu mostka tlenowego w strukturze jednego ze związków [H4].

Część pochodnych kwasu karminowego scharakteryzowanych w tkaninach prekolumbijskich była też obecna w innych próbkach włókien barwionych koszenilą [H10]. Wyniki moich prac pozwalają wysnuć wniosek, że związki te są produktami degradacji kwasu

związków. Dlatego też dodatkowo w badaniach wsparto się wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizatorem typu QIT/ToF w ramach współpracy z dr inż. Beatą Wileńską z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

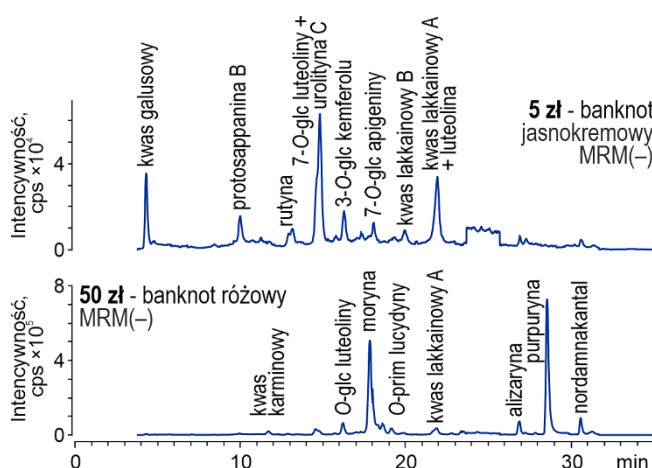
Badania wykazały, że wszystkie związki towarzyszące markerom koszenili amerykańskiej obecne we włóknach pochodzących z tkanin prekolumbijskich to pochodne kwasu karminowego. Same wartości m/z ich jonów $[M-H]^-$ dostarczały informacje na temat modyfikacji jakim mógł on ulec (Tabela 1). Ponadto na widmach MS/MS odnotowano obecność charakterystycznych sygnałów odpowiadających (1) utracie CO_2 (44 Da) z

karminowego, choć na tym etapie trudno jest określić czynniki środowiska odpowiedzialne za ich powstawanie.

Tabela 1. Transformacje i zmiany masy obserwowane dla poszczególnych pochodnych kwasu karminowego zidentyfikowanych w tkaninach prekolumbijskich [H4]

| Transformacje | Zmiana masy nominalnej, ΔDa | Zmiana masy dokładnej, ΔDa | Zmiany składu pierwiastkowego |
|---|-------------------------------------|------------------------------------|---|
| | 0 | 0 | kwas karminowy |
| Deglukozylowanie + dehydroksylowanie | -178 | -178,0477 | - C ₆ H ₁₀ O ₅ - O |
| Deglukozylowanie | -162 | -162,0528 | - C ₆ H ₁₀ O ₅ |
| Dekarboksylowanie | -44 | -43,9898 | - CO ₂ |
| Dehydroksylowanie | -16 | -15,9949 | - O |
| Utlenianie | -2 | -2,0157 | - H ₂ |
| Dehydroksylowanie + aminowanie | -1 | -0,9840 | - O + NH |
| Aminowanie | +15 | +15,0109 | + NH |
| Przyłączenie mostka metyleneoksylowego | +28 | +27,9949 | + CO |
| Demetylowanie + karboksylowanie | +30 | +29,9747 | - CH ₂ + CO ₂ |
| Przyłączenie hydroksyetylu | +44 | +44,0262 | + C ₂ H ₄ O |
| Przyłączenie kwasu hydroksybenzoesowego | +120 | +120,0211 | + C ₇ H ₄ O ₂ |

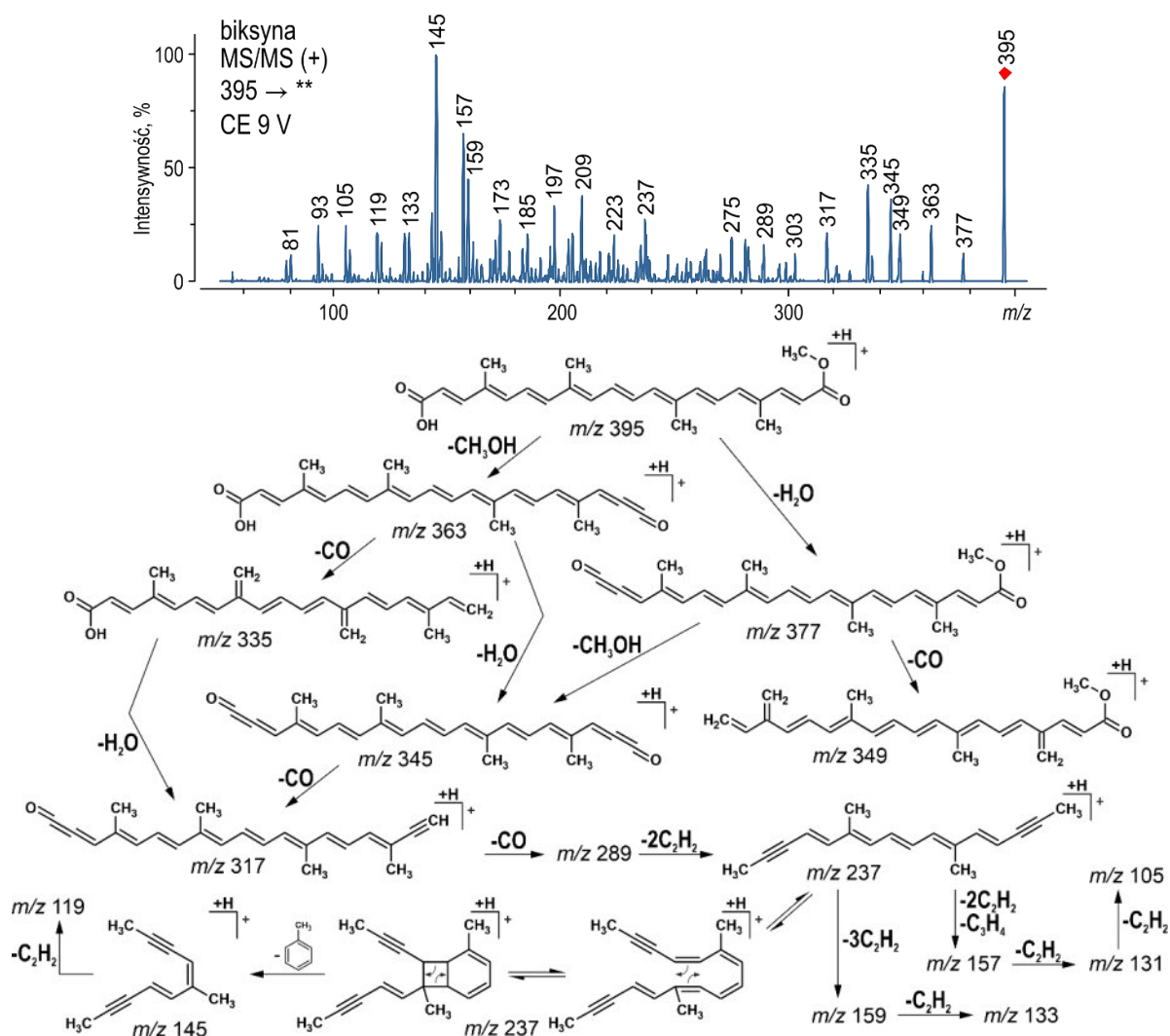
Innym ważnym wynikiem tych badań było potwierdzenie faktu stosowania sierpika barwierskiego do barwienia tkanin w Europie. Jak już wspomniałam, informacje na ten temat pochodziły jedynie ze źródeł historycznych, jednak, o ile mi wiadomo, nigdy nie udało się ich potwierdzić na drodze badania obiektów dziedzictwa kulturowego. Zdefiniowanie na nowo markerów sierpika barwierskiego (głównie O-glukuronowych flawonoidów) pozwoliło mi zidentyfikować go w siedmiu włóknach pobranych z tkanin jedwabnych datowanych na XV-XVII w [H8, H9]. W badanych próbkach był on stosowany w połączeniu z janowcem barwierskim i/lub indygo, zawsze do uzyskania wybarwień zielonych.



Rysunek 25. Chromatogramy zarejestrowane za pomocą detektora MS dla ekstraktów banknotów kościuszkowskich o nominałach 5zł (barwiony rezedą, szelakiem i drzewem brazylijskim) oraz 50 zł (barwiony marzaną i drzewem fustykowym)

Badania potwierdziły jednocześnie, że dużo bardziej popularne były inne, żółte barwniki flawonoidowe, takie jak wspomniany już janowiec czy rezeda. Ich profile chromatograficzne zdefiniowane w toku prowadzonych badań rozpoznano w około osiemdziesięciu włóknach [H8, H9, H10]. Rezeda stanowiła też jeden z barwników zidentyfikowanych w najniższych nominałach (o najjaśniejszej barwie) banknotów kościuszkowskich (Rysunek 25) [H7].

Jednak nie tylko barwniki flawonoidowe były stosowane w roli barwników żółtych. W toku prac potwierdzono również użycie orleanu (*Bixa orellana* L., ang. *annatto*), preparatu zawierającego apokarotenoidy, głównie biksynę. Z uwagi na (1) typ barwnika, który zaliczany jest do barwników bezpośrednich, oraz (2) liniową budowę jego związków barwiących, które łączą się z włóknem, a także między sobą, m.in. za pomocą wiązań van der Waalsa, tworząc agregaty, preparat ten jest bardzo trudny do ekstrakcji. Nie mniej jednak dzięki szczegółowej analizie ścieżek fragmentacji biksyny (Rysunek 26) i starannemu przygotowaniu metody analitycznej zidentyfikowałam orlean w jedenastu badanych próbkach [H8, H9, H10, H11]. Należy podkreślić, że dotychczas nie było doniesień literaturowych mówiących o identyfikacji tego preparatu w obiektach zabytkowych. Tym samym po raz pierwszy potwierdziłam zastosowanie orleanu do barwienia tkanin historycznych [H8]. Najczęściej był on używany w połączeniu z drzewem brazylijskim.



Rysunek 26. Widmo MS/MS biksyny (m/z 395, $[M+H]^+$)
i proponowana ścieżka fragmentacji

Krokosz barwierski został zidentyfikowany w jedenastu próbkach pobranych z tkanin pochodzących z Włoch, Turcji oraz Persji [H11], głównie w oparciu o występowanie zidentyfikowanych przeze mnie izomerów *E/Z* N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-kumaroilospermidyn oraz różnych *C*-glikozydów chinochalkonów. Choć krokosz był stosowany głównie w roli preparatu barwiącego na żółto i pomarańczowo, nie mniej jednak w kilku przypadkach w badanych ekstraktach potwierdziłam również obecność czerwonej kartaminy, co wskazuje, że łagodna metoda ekstrakcji z użyciem kwasu mrówkowego chroni kartaminę przed jej szybką hydrolizą. Co więcej w toku badań zdefiniowano dwa dotychczas nieznane *C*-glikozydy chinochalkonów, które mogą być wynikiem stosowania określonej metody barwienia lub mogą powstawać na skutek degradacji innych związków barwiących obecnych w krokoszu.

Ponadto w około czterdziestu próbkach pobranych z tkanin zabytkowych stwierdzono zastosowanie drzewa brazylijskiego. Obok brazyliny, brazyleiny i urolityny *C* zidentyfikowano protosappaninę *B*, a także inne wskazane przeze mnie w toku badań markery tego barwnika [H10, H11]. Drzewo brazylijskie było też składnikiem mieszaniny stosowanej do barwienia banknotu kościuszkowskiego o nominale 5 złotych (Rysunek 25) [H7].

Wyniki badań uzyskane dla 323 włókien pochodzących z tkanin jedwabnych świadczą o uniwersalności i skuteczności opracowanej przeze mnie celowanej metody analitycznej do identyfikacji barwników naturalnych. Ostatecznie obejmowała ona 196 związków barwiących oraz bezbarwnych markerów barwników naturalnych, z czego 62 stanowiły wzorce analityczne dostępne komercyjnie. Ponadto opracowane postępowanie okazało się być wysoce efektywne. Spośród wszystkich włókien tylko w przypadku siedmiu stwierdzono, że były one barwione preparatami, które do tej pory nie stanowiły dotychczas przedmiotu moich badań. Należy jednak zaznaczyć, że wszystkie próbki włókien, w których stwierdzono obecność nieznanymi preparatów pochodziły z tkanin perskich i tureckich, a zatem prawdopodobnie stosowane barwniki również wywodziły się z Bliskiego Wschodu. Niemniej jednak w oparciu o zarejestrowane chromatogramy i widma MS/MS uzyskałam dodatkowe informacje na temat kompozycji tych nieznanymi preparatów [H8, H9].

W przypadku pierwszego z nich zidentyfikowano wszystkie związki barwiące obserwowane na chromatogramie zarejestrowanym za pomocą detektora UV-Vis. Jego profil chromatograficzny obejmował przede wszystkim hyperozyd, 3-*O*-glukozyd kempferolu oraz 3-*O*-glukozyd izoramnetyny, a także rutynę, kwercytrynę i 7-*O*-glukozyd luteoliny. Wymieniony zestaw związków odpowiadał prezentowanej w literaturze kompozycji ostróżki (*Delphinium semibarbatum*, ang. *larkspur*)²⁴.

Również dla drugiego barwnika zidentyfikowano wszystkie związki barwiące (luteolina, 7-*O*-glukozydu luteoliny, *O*-glukuronidu luteoliny i *C*-heksozyd luteoliny). I choć był to preparat składem przypominający sierpik barwierski, to jednak jego tożsamości nie udało się ustalić. Co

²⁴ N. Shibayama, M. Wypyski, E. Gagliardi-Mangilli. *Heritage Science*. 2015; 3: 12, doi:10.1186/s40494-015-0037-2.

więcej na podstawie głębokiej analizy otrzymanych chromatogramów ustaliłam, że barwnik ten stosowano również w połączeniu z trzecim preparatem nieznanego pochodzenia. Obok wcześniej wymienionych związków zidentyfikowano także rutynę, hyperozyd i kwas elagowy, a także stwierdzono obecność czterech nieznanych flawonoidów (w tym trzech *O*-diheksozydów). Ponadto dzięki dokładnej analizie widm ustalono, że razem z luteoliną eluował również inny izomeryczny związek, tj. daticetyna. To właśnie w oparciu o jej obecność założono, że ostatnim nieznanym barwnikiem była konopnica (*Datisca cannabina* L., ang. *bastard hemp*) [H8, H9].

Wczesne barwniki syntetyczne [H1]

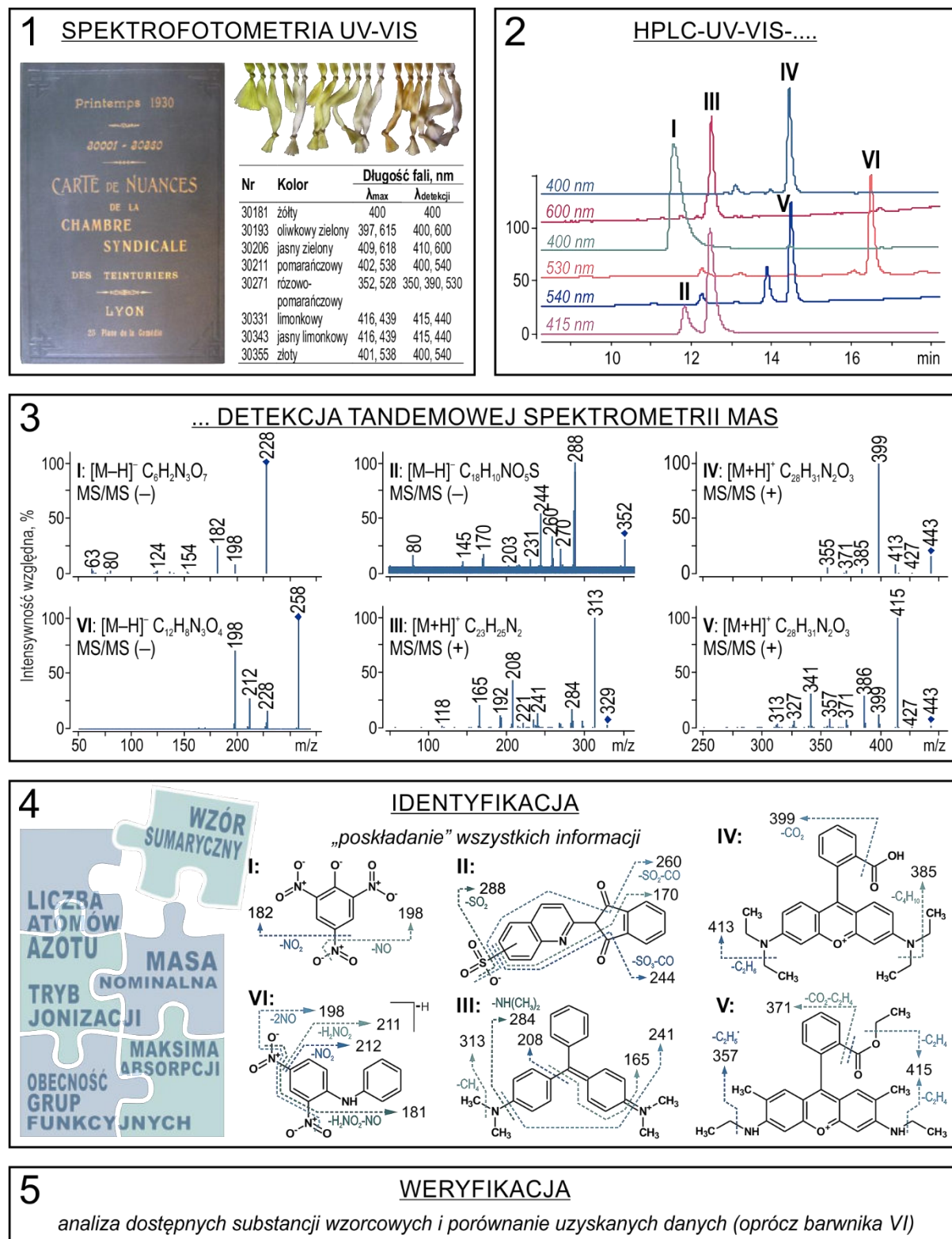
Pod koniec XIX i na początku XX wieku barwniki syntetyczne były często wykorzystywane do poprawienia walorów estetycznych starych i wyblakłych, lecz drogocennych tekstyliów o znaczeniu historycznym. Jednakże identyfikacja barwników syntetycznych stwarza wiele problemów, przede wszystkim z uwagi na różnorodność preparatów oraz niespójną nomenklaturę handlową. W pokonaniu tych trudności pomocna może być technika tandemowej spektrometrii mas, która dostarcza informacji o budowie badanych związków. Dlatego celem podjętych badań było sprawdzenie przydatności układu HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS do bezwzorcowej identyfikacji barwników syntetycznych stosowanych do barwienia włókien. Przedmiotem badań było osiem nici jedwabnych pobranych z wiosennej palety barw Liońskiego Cechu Farbiarzy z 1930 roku (*La Chambre Syndicale des Teinturiers*) udostępnionej mi do badań przez Muzeum Narodowe w Warszawie. Badane włókna były na ogół żółte o odcieniach od zielonkawego do pomarańczowego [H1].

Chromatogramy rejestrowano przy (1) różnych długościach fal (głównie z zakresu światła widzialnego), dobranych indywidualnie na podstawie wcześniej uzyskanych krzywych absorpcji, oraz (2) w trybie skanowania jonów dodatnich i ujemnych. Na podstawie wszystkich zebranych informacji (m.in. barwy analizowanych ekstraktów, trybu jonizacji, w którym obserwowane były sygnały, nominalnej masy jonów, liczby atomów azotu w cząsteczce, obecności potencjalnych grup funkcyjnych określonej w oparciu o tracone fragmenty obojętne (Tabela 2) oraz wzorów

Tabela 2. Najczęściej tracone fragmenty obojętne

| Masa, Da | Tracony fragment | Pochodzenie |
|----------|------------------------------------|---|
| 15 | *CH ₃ | aromatyczne <i>N</i> -metyloaminy |
| 16 | CH ₄ | aromatyczne <i>N</i> -metyloaminy |
| 28 | CO | związki z grupą karbonylową >CO |
| 28 | C ₂ H ₄ | estry etylowe –COOC ₂ H ₅ lub aromatyczne <i>N</i> -etyloaminy lub <i>N,N</i> -dietyloaminy |
| 28 | N ₂ | związki azowe –N=N– |
| 29 | *C ₂ H ₅ | aromatyczne <i>N</i> -etyloaminy |
| 29 | CH ₂ =NH | aromatyczne <i>N</i> -metyloaminy |
| 30 | C ₂ H ₆ | aromatyczne <i>N,N</i> -dietyloaminy |
| 30 | *NO | aromatyczne nitrozwiązki –NO ₂ |
| 31 | CH ₃ –NH ₂ | aromatyczne <i>N</i> -metyloaminy |
| 43 | CH ₂ =N–CH ₃ | aromatyczne <i>N,N</i> -dimetyloaminy |
| 44 | CO ₂ | kwasy karboksylowe |
| 45 | (CH ₃) ₂ NH | aromatyczne <i>N,N</i> -dimetyloaminy |
| 46 | *NO ₂ | aromatyczne nitrozwiązki –NO ₂ |
| 64 | SO ₂ | kwasy sulfonowe –SO ₂ OH |
| 74 | HCOOC ₂ H ₅ | estry etylowe –COOC ₂ H ₅ |
| 80 | SO ₃ | kwasy sulfonowe –SO ₂ OH |

sumarycznych jonów $[M-H]^-/[M+H]^+$ uzyskanych za pomocą wysokorozdzielczego detektora ESI-QToF-MS) zaproponowałam struktury barwników syntetycznych (Rysunek 27): dwóch żółtych (I – kwas pikrynowy i II – żółcień chinolinowa), jednego zielonego (III – zieleń



Rysunek 27. Postępowanie podczas badania wczesnych barwników syntetycznych z wiosennej palety barw Liońskiego Cechu Farbiarzy z 1930

malachitowa) i dwóch czerwono-fioletowych (IV – rodamina B i V – rodamina 6G). Ich tożsamość została potwierdzona z użyciem substancji wzorcowych. Ponadto w większości ekstraktów była też obecna żółcień acetochinonowa 5JZ (VI). Tylko jeden barwnik nie został zidentyfikowany; na podstawie jego widm MS/MS stwierdzono, że zawierał on atom chloru i grupę sulfonową.

Badania wykazały, że tandemowa spektrometria mas stanowi potężne narzędzie analityczne i daje wiele możliwości w zakresie potwierdzenia tożsamości bliżej niezdefiniowanych barwników syntetycznych. Opierając się na charakterystycznej fragmentacji typowych dla tych związków grup funkcyjnych, takich jak grupa sulfonowa, nitrowa czy trzecio- lub czwartorzędowa grupa aminowa, a także na nominalnej wartości m/z jonów oraz profilach izotopowych stanowiących odzwierciedlenie obecnych w strukturze tych związków heteroatomów (takich jak siarka czy chlor), można przeprowadzić bezwzorcową identyfikację barwników syntetycznych, czego dowiodłam w swojej pracy [H1]. Uzyskane wyniki pozwoliły przypuszczać, że około 1930 r. farbiarze liońscy prawdopodobnie stosowali wąską gamę barwników syntetycznych, które to mieszały ze sobą w różnych proporcjach w celu uzyskania określonych odcieni.

Podsumowując tę część badań należy podkreślić, że wykazały one analityczną użyteczność techniki HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS do identyfikacji związków barwiących, a co za tym idzie barwników naturalnych w próbkach pobranych z obiektów historycznych. Połączenie tej techniki z efektywną, lecz zarazem łagodną ekstrakcją sekwencyjną, a także opracowanie postępowania analitycznego uwzględniającego właściwości analitów, typy ekstraktów oraz warunki prowadzonej detekcji, doprowadziło do zmaksymalizowania ilości informacji uzyskiwanych w oparciu o minimalne ilości dostępnego do badań materiału, zwłaszcza jeśli mamy do czynienia z cennymi obiektami dziedzictwa kulturowego. Zastosowanie mikroprzepływowych technik rozdzielania pozwala ograniczyć objętość ekstraktu bez utraty informacji analitycznej. Co więcej, istotną zaletą opracowanej metodyki jest również możliwość prowadzenia dodatkowych badań ewentualnych, nieznanych związków barwiących (nieujętych w metodzie analitycznej, a obecnych w badanych ekstraktach) z użyciem techniki MS/MS. Ponadto postępowanie to zostało z sukcesem zaimplementowane do badania licznych obiektów dziedzictwa kulturowego i stanowi obecnie narzędzie, po które coraz częściej sięgają muzealnicy i konserwatorzy sztuki.

PODSUMOWANIE I DALSZE KIERUNKI ROZWOJU

Z punktu widzenia chemika analityka, posiadającego wiedzę zarówno na temat natury obiektów zabytkowych, jak i z działania i możliwości jakie niesie zastosowanie techniki (μ)HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS, oraz zdającego sobie sprawę z ogromnego potencjału, ale też z ograniczeń metod niecelowanych, szczególnie istotne jest podejmowanie działań prowadzących do scharakteryzowania preparatów barwiących w celu opracowania

standardowej procedury ich identyfikacji i rekomendowanie tego protokołu analitycznego do badania cennych obiektów dziedzictwa kulturowego. Z założenia prace te mają charakter interdyscyplinarny i łączą w sobie badania podstawowe oraz wiedzę z zakresu technologii i historii sztuki, co stanowi wartość dodaną. Z tej perspektywy za największe osiągnięcia przedstawione w cyklu publikacji [H1-H11], stanowiące istotny wkład w rozwój nauk chemicznych, uważam:

- wykazanie uniwersalności opracowanych metodyk analitycznych do określenia tożsamości nieznanymi substancjami barwiącymi pochodzenia naturalnego i syntetycznego, a także scharakteryzowanie kluczowych markerów barwników naturalnych oraz produktów fotodegradacji indygooidów;
- określenie mechanizmów i/lub ścieżek fragmentacji różnych grup związków organicznych (m.in. fenoksazyn, C-glukozydów chinochalkonów, antrachinonów);
- utworzenie platformy badawczej bazującej na zebranych widmach mas, chromatogramach oraz opracowanym postępowaniu analitycznym obejmującym ekstrakcję, rozdzielanie i detekcję związków barwiących, z uwzględnieniem koloru próbek oraz właściwości związków barwiących;
- wdrożenie opracowanego postępowania bazującego na technice (μ)HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS do badania ponad 350 próbek pobranych z cennych obiektów polskiego dziedzictwa kulturowego, co pozwoliło m.in. po raz pierwszy zidentyfikować sierpik barwierski oraz orlean w obiektach zabytkowych.

Podsumowując, wyniki badań opublikowane w cyklu prac [H1-H11] dostarczają wiedzy na temat możliwości wykorzystania zaawansowanej techniki analitycznej, jaką jest wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona z detekcją spektrofotometryczną oraz z detekcją tandemowej spektrometrii mas, (μ)HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS, w szeroko rozumianej archeometrii, a jednocześnie przyczyniają się do wprowadzania tej techniki w poczet standardowych narzędzi stosowanych w laboratoriach archeometrycznych. A zatem pracowana przeze mnie procedura analityczna, poza rozszerzeniem stosowalności nowych metodologii badawczych, może być skutecznie stosowana do identyfikacji barwników organicznych w obiektach dziedzictwa kulturowego, niezależnie od stanu ich zachowania.

Jako że badania barwników organicznych z użyciem technik spektrometrii mas są tematyką interesującą i wielowątkową w ramach realizacji kolejnych celów naukowych planuję kontynuację i rozszerzenie podjętych dotychczas tematów, a także rozpoczęcie prac w nowych obszarach. W najbliższej przyszłości moje badania będą dotyczyły m.in.:

- (i) zastosowania metod chemometrycznych do analizy danych uzyskanych za pomocą techniki HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS w celu rozróżnienia czerwonych barwników drzewnych (pochodzących z Azji i obu Ameryk) określanymi ogólnym mianem drzewa brazylijskiego;
- (ii) opracowania metody identyfikacji kompleksów i zapraw w oparciu o ekstrakty włókien (pozostałe po badaniach HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS barwników

- organicznych) za pomocą technik łączonych z detekcją ICP-MS/MS i ESI-MS/MS oraz wykorzystania postępowań w badaniach obiektów zabytkowych;
- (iii) opracowania metod analitycznych mających na celu zwiększenie czułości układu HPLC-UV-Vis-ESI-MS/MS dla barwników apokarotenoidowych (orlean, szafran, gardenia).

W dalszej perspektywie mam nadzieję również opracować i wdrożyć mikroniszczące metody bezpośredniej analizy obiektów zabytkowych w czasie rzeczywistym z użyciem techniki jonizacji takiej jak DART (ang. *Direct Analysis in the Real Time*) połączonych z wysokorozdzielczą spektrometrią mas. Z uwagi na zastosowanie zjonizowanego gazu szlachetnego do desorpcji związków, ilość materiału pobranego za jego pomocą z powierzchni obiektu byłaby znikoma, a powstające ubytki byłyby na poziomie mikrometrów. W efekcie mogłabym uzyskać informacje analityczne niemalże bez uszczerbku na badanym obiekcie.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Od początku działalności naukowej (2006) realizuję badania w oparciu o współpracy prowadzone z naukowcami z innych jednostek w kraju i z zagranicy oraz z przedstawicielami instytucji kultury. W trakcie studiów doktoranckich badania częściowo realizowałam we współpracy z Narodowym Instytutem Leków w Warszawie (w osobie mgr Janiny Witowska-Jarosz) oraz Muzeum Narodowym w Warszawie (w osobie mgr Ewy Orlińskiej-Mianowskiej). Do trwających od wielu lat należą także współpracy z dr Natalią Krupą (Uniwersytet Papieski Jana Pawła II w Krakowie, Instytut Historii Sztuki i Kultury, 2008-obecnie) – w zakresie badania barwników w zabytkowych tkaninach jedwabnych oraz z mgr Magdaleną Ozgą (Katedra na Wawelu, 2015-obecnie) – w obszarze badania kolekcji 135 arrasów Króla Zygmunta Augusta. W ostatnim okresie nawiązałam kontakty naukowe z profesorem Pawłem Ciborowskim (University of Nebraska Medical Center (UNMC), Omaha, NE, USA, 2018-obecnie) w zakresie badania metabolitów za pomocą technik HPLC-MS/MS i HPLC-HR-MS/MS, co skutkowało również odbyciem stażu na UNMC, Omaha, NE, USA (02.2018-06.2019, kopia potwierdzenia odbycia staży stanowi **Załącznik 7** do wniosku), a także z profesorem Stanisławem Popielem (Wojskowa Akademia Techniczna, Wydział Nowych Technologii i Chemii, 2019-obecnie) w ramach realizacji wspólnych prac z zastosowaniem technik spektrometrii mas. Ponadto w ramach Polskiego Konsorcjum dla Badań nad Dziedzictwem Kulturowym (E-RIHS.PL) podejmuję współpracę zarówno z innymi członkami konsorcjum, jak i z instytucjami kultury w ramach oferty MOLAB PL/FIXLAB PL o dostępie do infrastruktury Konsorcjum.

Szczegóły dotyczące moich badań, prowadzonych z innymi niż Politechnika Warszawska jednostkami naukowymi lub instytucjami kultury, a zakończonymi opublikowaniem wspólnych prac, znajdują się w **Tabeli 3**. Kopie oświadczeń o utrzymywaniu najważniejszych współprac z instytucjami naukowymi lub instytucjami kultury znajdują się w **Załączniku 8** do wniosku.

Tabela 3. Aktywność naukowa w ramach współprac z innymi ośrodkami

| Jednostka | Naukowiec/ /pracownik | Lata wspólnej działalności | Pole badawcze | Liczba publikacji (w tym JCR) | Publikacje* |
|--|---|----------------------------------|---|-------------------------------------|-------------|
| Wojskowa Akademia Techniczna, Wydział Nowych Technologii i Chemii | dr hab. inż. Stanisław Popiel, prof. WAT | 2019– obecnie | identyfikacja markerów barwników naturalnych | 1 (1) | [H11] |

| Jednostka | Naukowiec/ /pracownik | Lata wspólnej działalności | Pole badawcze | Liczba publikacji (w tym JCR) | Publikacje* |
|--|---|----------------------------------|---|-------------------------------------|------------------------------|
| University of Nebraska Medical Center (UNMC), Omaha, NE, USA | dr Paweł Ciborowski | 2018– obecnie | badania metabolitów wydzielanych przez makrofagi w obecności metamfetaminy za pomocą HPLC-MS i HPLC-HR-MS | 1 (1) | [PH1] |
| Muzeum Narodowe w Warszawie | mgr Ewa Orlińska- Mianowska mgr Elżbieta Rośloniec | 2006– obecnie | badania niebieskich i czerwonych barwników – badania tkanin jedwabnych i wełnianych | 4 (1) | [H1, RH5, RH8, RD2] |
| Muzeum Narodowe w Krakowie | dr Anna Klisińska- Kopacz | 2016–2017 | badania barwników naturalnych w Banknotach Kościuszkowskich | 1 | [H7] |
| Uniwersytet Papieski Jana Pawła II w Krakowie, Instytut Historii Sztuki i Kultury Katedra na Wawelu | dr Natalia Krupa | 2008– obecnie | badania barwników naturalnych i syntetycznych w ponad 350 próbek włókien pochodzących z tkanin jedwabnych z zasobów kościelnych Krakowa (XIV-XVIII w.) | 7(5) | [H8-H11, D1, RH6, RH7] |
| Zamek Królewski na Wawelu | mgr Magdalena Ozga | 2015– obecnie | badania barwników naturalnych (i syntetycznych) w arrasach wawelskich z kolekcji Zygmunta II Augusta | 1 (0) | [JH2] |
| Narodowy Instytut Leków | mgr Janina Witowska- Jarosz | 2006–2013 | spektrometria mas barwników naturalnych i syntetycznych, interpretacja widm mas | 3 (2) | [H1, D2, RD2] |

* – zgodnie z oznaczeniami zastosowanymi z Załączniku 4

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Moje osiągnięcia dydaktyczne na Politechnice Warszawskiej obejmują działania w czterech głównych obszarach:

- prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów – dotychczas prowadziłam 20 różnych zajęć: wykładów (z czego dwa, *Spektrometria mas* oraz *Praktyczne zastosowanie spektrometrii mas*, są w pełni autorskie), ćwiczeń, projektów i laboratoriów (**Tabela 4**);
- pełnienie funkcji promotora pomocniczego prac doktorskich (2 prace, **Tabela 5**);

- kierowanie lub opieka naukowa nad pracami dyplomowymi na stopień inżyniera lub magistra (łącznie 22 prace, w tym 19 po uzyskaniu stopnia naukowego doktora) – dotychczas byłam promotorem 4 prac magisterskich i 9 inżynierskich, a ponadto sprawowałam opiekę naukową nad 7 pracami magisterskimi oraz 2 pracami inżynierskimi;
- prowadzenie w języku polskim i angielskim zajęć laboratoryjnych (pt. *Zastosowanie HPLC UV-Vis i ESI-MS do identyfikacji barwników*) i wykładów (na temat techniki LC-MS) w ramach:
 - kursu specjalistycznego *HPLC i techniki sprzężone*, będącego częścią projektu „Program rozwoju kompetencji studentów wydziałów przyrodniczych Uniwersytetu Warszawski i Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej” finansowanego w ramach inicjatywy Wiedza Edukacja Rozwój Europejskiego Funduszu Społecznego (2017-2019);
 - kursu specjalistycznego *Szkoła HPLC i technik łączonych* organizowanego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej dla studentów Wydziału (2010–2016) oraz dla pracowników przemysłu chemicznego i farmaceutycznego (2007–2009).

Tabela 4. Zajęcia dydaktyczne prowadzone dla studentów Politechniki Warszawskiej

| Lp. | Funkcja | Rodzaj zajęć | Nazwa przedmiotu | Kierunek i stopień studiów | Okres |
|-----|----------------------|------------------------|--|-------------------------------------|---------|
| 1 | kierownik przedmiotu | wykład | Spektrometria mas | Technologia Chemiczna, II | od 2014 |
| 2 | kierownik przedmiotu | wykład | Praktyczne zastosowanie spektrometrii mas | Technologia Chemiczna, I | 2017 |
| 3 | kierownik przedmiotu | projekt + laboratorium | Projektowanie metod bioanalitycznych | Biotechnologia, II | 2017 |
| 4 | prowadzący | wykład + ćwiczenia | Optymalizacja i walidacja metod analitycznych | Technologia Chemiczna, II | 2014 |
| 5 | prowadzący | wykład | Dobra praktyka laboratoryjna | Biotechnologia, II | 2017 |
| 6 | prowadzący | wykład | Instrumental Techniques in Medical Laboratory Diagnostics | Technologia Chemiczna, II | 2017 |
| 7 | prowadzący | wykład | Techniki instrumentalne w medycznej diagnostyce laboratoryjnej | Technologia Chemiczna, II | 2017 |
| 8 | prowadzący | laboratorium | Chemia – laboratorium | Inżynieria Chemiczna i Procesowa, I | od 2019 |
| 9 | prowadzący | laboratorium | Chemia analityczna | Inżynieria Chemiczna i Procesowa, I | od 2019 |
| 10 | prowadzący | laboratorium | Chemia analityczna –laboratorium | Biotechnologia, I | od 2010 |

| Lp. | Funkcja | Rodzaj zajęć | Nazwa przedmiotu | Kierunek i stopień studiów | Okres |
|-----|------------|--------------------|---|------------------------------------|---------|
| 11 | prowadzący | laboratorium | Laboratorium nowoczesnych metod kontroli analitycznej | Technologia Chemiczna | 2010 |
| 12 | prowadzący | laboratorium | Laboratorium projektowania procesów technologicznych | Technologia Chemiczna | 2010 |
| 13 | prowadzący | laboratorium | Laboratorium analizy ilościowej | Technologia Chemiczna, I | od 2012 |
| 14 | prowadzący | laboratorium | Laboratorium analizy instrumentalnej | Technologia Chemiczna, I | od 2007 |
| 15 | prowadzący | laboratorium | Laboratorium charakteryzacji materiałów | Technologia Chemiczna, II | od 2020 |
| 16 | prowadzący | laboratorium | Chemia analityczna laboratorium | Zarządzanie i Inżynieria Produkcji | 2012 |
| 17 | prowadzący | laboratorium | Laboratorium technik spektroskopowych | Technologia Chemiczna | 2011 |
| 18 | prowadzący | laboratorium | Metrologia biochemiczna oraz akwizycja pomiarowa | Biotechnologia, II | od 2010 |
| 19 | prowadzący | laboratorium | Podstawy chemii nieorganicznej i analitycznej | Inżynieria Biomedyczna | 2012 |
| 20 | prowadzący | wykład i warsztaty | Zajęcia wykładowe i warsztatowe z bazy <i>SciFinder</i> (w ramach szkoleń realizowanych przez Bibliotekę Główną PW) | Biotechnologia, I | 2013 |

Tabela 5. Promotorstwo pomocnicze prac doktorskich realizowanych na Politechnice Warszawskiej

| Dane doktoranta | Status studiów/przewodu doktorskiego | Okres |
|---------------------------|--|-----------|
| dr inż. Katarzyna Witkoś | Uzyskanie stopnia doktora: 10.11.2015; tytuł: <i>Identyfikacja produktów degradacji barwników naturalnych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem spektrometrii mas</i> | 2010–2015 |
| mgr inż. Damian Dąbrowski | Otwarcie przewodu doktorskiego: 16.04.2019; tytuł: <i>Zastosowanie nowoczesnych metod rozdzielania sprzężonych ze spektrometrią mas do identyfikacji barwników organicznych</i> | od 2015 |

Ponadto prowadziłam zajęcia również w innych jednostkach naukowych i edukacyjnych:

- **na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego – wykłady pt. *Identyfikacja barwników i pigmentów w obiektach zabytkowych*** dla studentów studiów podyplomowych „Nowoczesne Techniki Analityczne dla Konserwacji Obiektów Zabytkowych” (czterokrotnie, w latach 2016–2020);

- w Wyższej Szkole Zawodowej Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia – zajęć z chemii ogólnej, chemii organicznej oraz laboratorium chemii ogólnej (2008–2009).

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

1. W roku 2013 byłam członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji XVII EuroAnalysis 2013, European Conference on Analytical Chemistry;
2. Członek Zarządu (Skarbnik) Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas (PTSM) – od 2018; członek Komisji Rewizyjnej w latach 2014–2018;
3. Udział w pracach Zespołu Miniaturyzacji i Analizy Śladowej Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk (ZMiAŚ) w latach 2016–2018.

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

1. **Udział jako ekspert w czterech warsztatach MOLAB/FIXLAB PL** organizowanych dla muzealników, historyków sztuki i konserwatorów przez Polskie Konsorcjum dla Badań nad Dziedzictwem Kulturowym (E-RIHS.PL) – wygłoszenie wykładu na temat zastosowania chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (HPLC-MS) w badaniach barwników naturalnych (2016, 2017, 2020, 2021);
2. **Udział w audycji radiowej *Ciekawe dwie godziny*** red. Wiktora Niedzickiego w Halo.Radio (21.11.2020);
3. **Udział w przygotowaniu materiału promocyjnego oraz w spotkaniu w ramach projektu *Noc Innowacji 2020 z Wydziałem Chemicznym*** (10.10.2020);
4. **Wygłoszenie wykładu *Chemia w służbie sztuki*** w ramach cyklu *Wieczoru dla dorosłych, Odłona 38: „Eviva l’arte!”* w Centrum Nauki Kopernik, Warszawa (31.03.2017);
5. **Artykuł w dzienniku *Rzeczpospolita*** na temat wyników badań identyfikacji barwników naturalnych w Arrasach wawelskich (K. Lech, M. Jarosz: *Identyfikacja barwników w arrasach*, w: dodatku pt. “Wielokulturowa Rzeczpospolita w czasach Zygmunta Augusta” do dziennika *Rzeczpospolita* z dnia 22.04.2016, ss. Q3);
6. **Prezentacja sylwetki w ramach panelu wystawy *Maria Skłodowska-Curie w służbie nauki wczoraj i dziś*** prezentowanej w siedzibie Parlamentu Europejskiego w Brukseli (4–6.10.2011) i w różnych miastach Polski w ramach obchodów Roku Marii Skłodowskiej-Curie w związku z setną rocznicą przyznania jej Nagrody Nobla w dziedzinie chemii.

7. Inne informacje (niewymienione w pkt. 1-6), ważne z punktu widzenia wnioskodawcy, dotyczące jego kariery zawodowej

7.1. Udział w konsorcjach badawczych

1. Od 2015 roku **jestem zaangażowana w tworzenie Polskiego Konsorcjum dla Badań nad Dziedzictwem Kulturowym (E-RIHS.PL)**, w którego skład wchodzi 13 instytucji, w tym Politechnika Warszawska. Od 2016 roku biorę **czynny udział w Radzie Konsorcjum**. W styczniu 2020 roku Konsorcjum E-RIHS.PL zostało wprowadzone na *Polską Mapę Drogową Infrastruktur Badawczych* i zabiega o akces do powstającej europejskiej infrastruktury E-RIHS, w której polskie Konsorcjum będzie pełnić rolę węzła narodowego (ang. *National Node*).

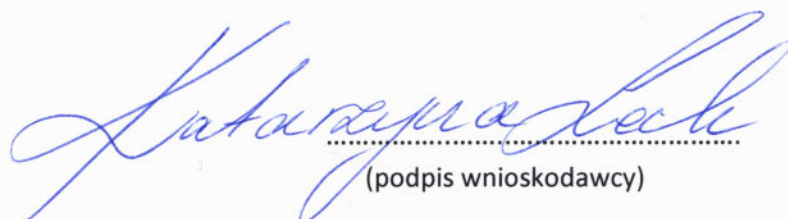
7.2. Odbyte kursy i szkolenia naukowe

1. Szkolenie *QToF Training*, Sciex, Omaha (NE), USA (15–17.08.2018)
2. Warsztaty w ramach 4. Konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas, Trzebnica (25–26.05.2014)
3. *Warsztaty LCMS*, Perlan Technologies, Zegrze (27-28.09.2010)
4. Szkolenie *Spektrometria mas – LC/MS/MS i MALDI/MS, najnowsze rozwiązania i aplikacje*, Applied Biosystems, Warszawa (09.2009)
5. Szkolenie *LC-ChipCube-QQQ MS trening*, Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy (24–26.11.2008)
6. Szkolenie techniczne z chromatografii gazowej *GC/MS Training Seminar*, Warszawa (1.10.2007)
7. Kurs *5th Training Courses on Analytical Quality Control and method validation in support to the Water Framework Directive (TAQC-WFD)*, Warszawa (31.05–2.06.2007)
8. Seminarium Pedagogiczne dla doktorantów Politechniki Warszawskiej (26.10.2006–14.02.2007)
9. Kurs szkoleniowy *Chemometria*, Poznań (28.11.2006)
10. Szkolenie *Spektrometria mas. Najnowsze rozwiązania i przykłady praktycznego zastosowania*, Applera Polska, Warszawa (11.2006)
11. Szkolenie *Chromatografia i spektrometria mas*, Perlan Technologies, Warszawa (10.2006)

7.3. Otrzymane nagrody i wyróżnienia

1. Nagroda Indywidualna stopnia II Rektora PW – nagroda za osiągnięcia naukowe (2021)

2. Nagroda Zespołowa I stopnia JM Rektora PW (K. Jankowski, S. Kuś, N. Obariski, M. Balcerzak, S. Oszałdowski, E. Świącicka-Fuchsel, K. Lech, I. Grabowska-Jadach, K. Tokarska, A. Żuchowska, J. Kruszewska, D. Dąbrowski) – nagroda dydaktyczna (2019)
3. Nagroda Zespołowa stopnia II Rektora PW (M. Jarosz, K. Pawlak, K. Lech, L. Ruzik, M. Matczuk, J. Legat) – nagroda za osiągnięcia naukowe (2017)
4. Nagroda Zespołowa stopnia II Rektora PW (M. Jarosz, K. Pawlak, K. Lech, M. Matczuk) – nagroda za osiągnięcia naukowe (2015)
5. Best Poster Award (K. Lech, D. Dąbrowski, M. Jarosz, *Identification of tannins by HPLC-UV-Vis-ESI MS in plant dyestuffs*) na 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, Szczyrk (2015)
6. Nagroda Zespołowa stopnia II Rektora PW (M. Jarosz, L. Ruzik, K. Lech) – nagroda za osiągnięcia naukowe (2013)
7. Best Poster Award (K. Witkoś, K. Lech, M. Jarosz, *Unknown anthraquinone colorants – investigation by tandem mass spectrometry*) na konferencji XVII EuroAnalysis, Warszawa (2013)
8. Best Poster Award (K. Witkoś, K. Lech, M. Jarosz, *Fading of natural dyes – separation and identification of degradation products by using capillary HPLC UV-vis ESI MS/MS*) na 29th International Symposium on Chromatography, Toruń (2012)
9. Stypendium naukowe Centrum Studiów Zaawansowanych (CSZ), projekt *Program Rozwojowy Politechniki Warszawskiej* w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego (2009–2011)
10. Stypendium w ramach projektu *Mazowieckie Stypendium Doktoranckie* realizowany jest przez Urząd Marszałkowski Województwa Mazowieckiego w Warszawie (2009)
11. Nagroda za najlepszy plakat (K. Lech, M. Puchalska, E. Rostoniec, K. Połec-Pawlak, M. Jarosz, *ICP MS w badaniach zabytkowych tkanin*) na XI Konferencji „Zastosowanie metod AAS, ICP-AES i ICP-MS w analizie środowiskowej”, Warszawa (2006)


.....
(podpis wnioskodawcy)