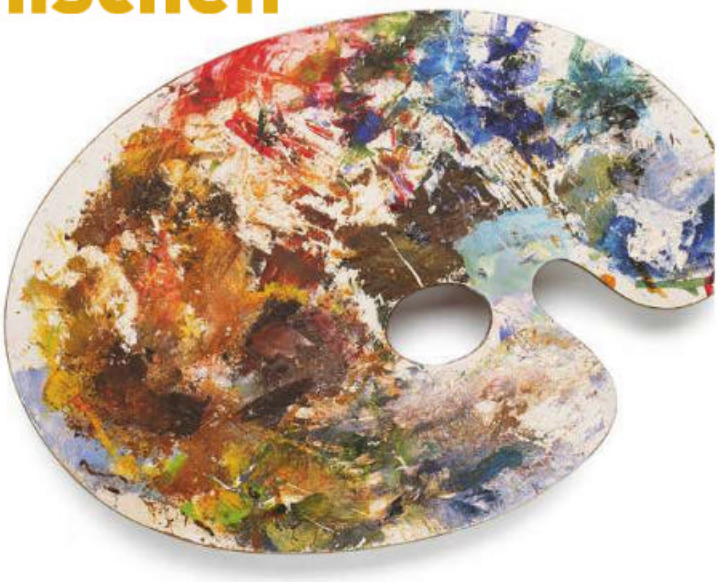
Flüssigkeitschromatographie mit Diodenarray- und massenspektrometrischer Detektion für die Analytik von natürlichen organischen Farbstoffen in Kunstwerken



Erwin Rosenberg und Shuya Wei, Technische Universität Wien, Österreich.

Die Analytik natürlicher organischer Farbstoffe wie sie in Gemälden, Tapisserien oder anderen Kunstwerken verwendet wurden, stellt für den Analytiker eine große Herausforderung dar: Organische Farbstoffe wurden vorwiegend zum Färben von Stoffen und Textilien verwendet, können aber auch auf anorganischen Trägermaterialien niedergeschlagen als Pigmente für die Malerei verwendet werden (Abb. 1). Für Jahrtausende war das Färben mit Pflanzen- und Tierextrakten die einzige Möglichkeit, dauerhaft gefärbte Textilien zu erhalten. Erst die Entdeckungen der Chemie ab der Mitte des 19. Jahrhunderts verdrängten allmählich und ab dem 20. Jahrhundert dann nachhaltig die natürlichen Farbstoffe und Malmaterialien.[1] Die natürlichen organischen Farbstoffe stellen eine sehr weitläufige Gruppe von Verbindungen dar, die sehr unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften besitzen. Von besonderem Interesse sind die Farbstoffe der Flavonoid-Familie (meist gelbe Farbstoffe), die Indigoiden (blaue und purpurne Farbstoffe) und die Vertreter der Anthrachinon-Familie (rote und violette Farbstoffe). Zu diesen gehören Scharlach, Kermes, Cochenille, Lack und Krapp. Krapp, gewonnen aus der Wurzel der Färberröte (*Rubia tinctorum*, einer Pflanze aus der Familie der Rötgewächse), war seit dem frühen Mittelalter die wichtigste Quelle für einen roten Farbstoff in Mitteleuropa. Von der Verwendung von Krapp als Farbstoff im Altertum zeugen bereits Texte auf erhaltenem Papyrus: „Der rote Farbstoff, der nach dem orientalischen Namen der Pflanze ‚Lizari' oder ‚Alizari' Alizarin genannt wird, ist in der Wurzel der Krapppflanze enthalten. Sie wird im 3. Wachstumsjahr geerntet, getrocknet und gemahlen".[2] Wie viele andere organische Farbstoffe gehört Alizarin, die Hauptkomponente in Krapp, zur Gruppe der sogenannten Beizenfarbstoffe. Das bedeutet, dass der Farbstoff durch „Beizen" des Stoffes auf diesem fixiert wird. Hierbei lässt man eine Metallsalzlösung auf einen Stoff einwirken, wobei das komplexbildende Metall in die Faser einzieht und sich mit dieser mehr oder minder fest verbindet. Anschließendes Tränken des solcherart gebeizten Stoffes in der eigentlichen Farbstofflösung führt zu einer Fixierung des Farbstoffes auf der Faser. Dieser Vorgang, auch „Verlackung" genannt, kommt auch bei der Pigmentherstellung zur Anwendung, wobei die Farbstoffe in wasserunlösliche Pigmente und damit in eine vermalbare Form überführt werden. Hierbei werden die teilweise löslichen Anthrachinon-Farbstoffe durch Metallsalze als Komplexe (Chelate) ausgefällt. Je nach dem eingesetzten Anthrachinon und Metallsalz variiert die Komplexfarbe von hellen Rosatönen bis zu dunklem Braun oder Violett. So sind Krapplacke mit Al^{3+}-Ionen karminrot gefärbt, mit Sn^{2+} scharlachrot bis orange, mit Cr^{3+} oder Fe^{3+} braun, und als Doppelsalz mit Ca^{2+} und Fe^{3+} violett.

Von historisch, künstlerisch und wirtschaftlich großer Bedeutung war das Färben von Stoffen mit dem sogenannten „Türkischrot": Stoffe, die mit Türkischrot gefärbt waren, waren aufgrund ihrer hohen Licht- und Waschechtheit in früheren Zeiten sehr begehrt und konnten lange Zeit nur von speziellen Färbereien unter hohen Kosten bezogen werden.[3] Es

handelt sich beim Türkischrot um eine Rotfärbung mit Krapp, genauer um einen auf der Textilfaser aufgezogenen Ca/Al-Lack des Alizarins. Im Gegensatz zu den gewöhnlichen Al-Lacken des Alizarins wurde zur Erzeugung des Türkischrots ein früher sehr komplizierter Färbeprozess (mit rund 20 Arbeitsschritten) durchgeführt, der später etwas vereinfacht werden konnte. Dennoch blieb eine keinesfalls einfache Folge von Ölen, Beizen, Fixieren und Färben notwendig, um diesen speziellen Farbton aufzufärben.

Das Besondere am Türkischrot ist seine Konstitution als Monokalzium-Al-Lack des Alizarins, was eine bestimmte Konzentration an Kalziumionen in der Färbelösung voraussetzt. Hatte man weiches Wasser zur Verfügung, musste man durch Zusatz von Kreide (in Europa) oder von Ca-haltigen Pflanzen (in Asien und Indien) den Ca-Gehalt erhöhen. Teile des Färbeverfahrens hatten den Zweck, das in der Färbepflanze (Krapp) enthaltene Purpurin und Pseudopurpurin als roten Lack auszufällen und zu entfernen, um einen reinen Alizarinlack zu erhalten, der allein die gewünschten Echtheiten aufwies.

Es wird bereits aus diesem Beispiel ersichtlich, dass die aus natürlichen Quellen gewonnen Farbstoffe sich sehr deutlich in

Abbildung 1: Übersicht zur Einteilung der Malfarben mit einigen Beispielen.

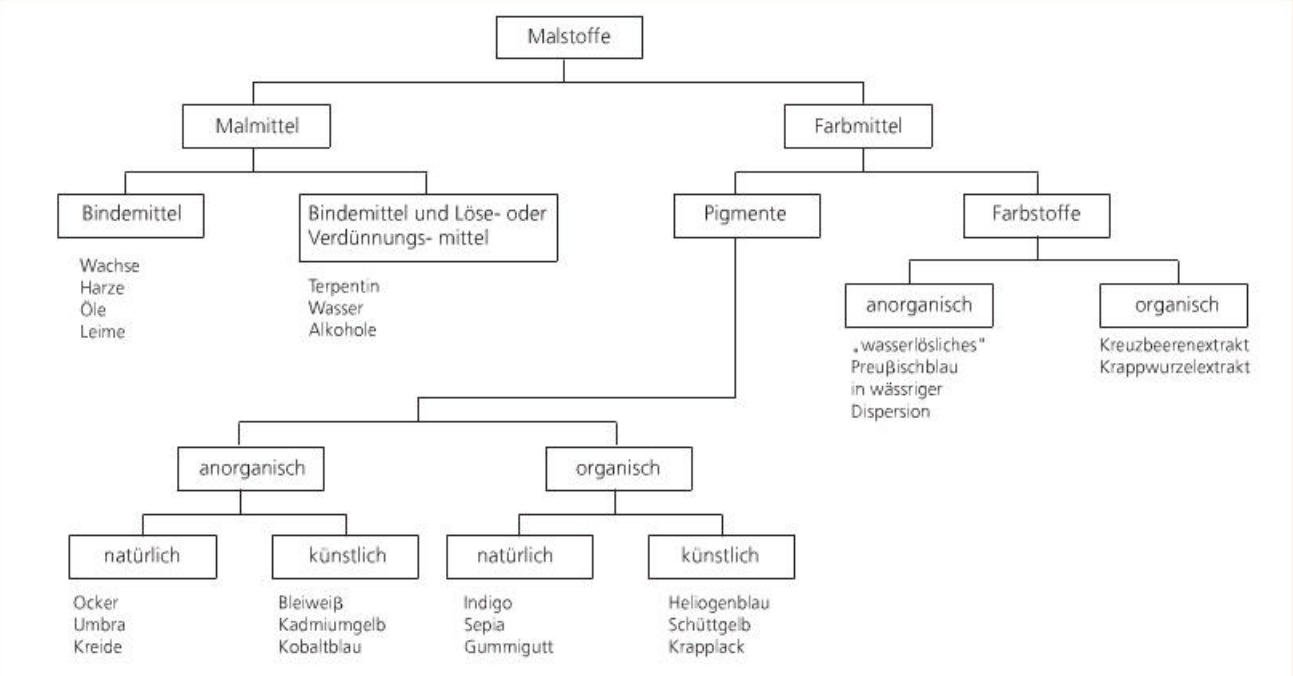
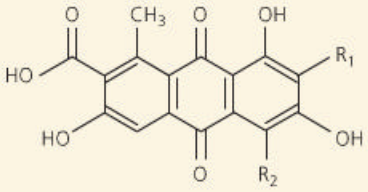
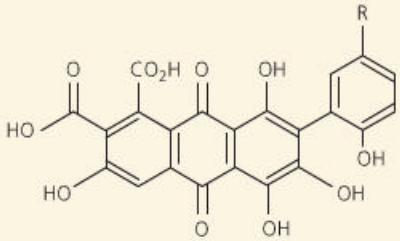


Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Arten von Karmin-Farbstoffen.

Name	Gewonnen aus	Ursprung	Zusammensetzung (%)
Scharlach	*Kermes vermilio* Planchon	Südeuropa (Frankreich, Italien, Griechenland), Türkei, Naher Osten	Kermessäure (75–100) Flavokermessäure (0–25) kein dc II
Polnische Cochenille	*Porphyrophora polonica* Linnaeus	Mittel- und Osteuropa, Deutschland, Polen, Ukraine	Carminsäure (62–88) Kermessäure + Flavokermessäure (12–38) dc II
Armenische Cochenille	*Porphyrophora hameli* Brandt	Armenien, Aserbaidschan	Carminsäure (95–99) Flavokermessäure + Kermessäure (1–4.2) dc II (0.1–1.2)
Cochenille	*Dactylopius coccus* Costa	Mexiko, Südamerika	Carminsäure (94–98) Kermessäure + Flavokermessäure (0.4–2.2) dc II (1.4–3.8)
Gummilack	*Kerria lacca* Kerr	Indien, Thailand, Kambodscha, Sumatra, Molukken	Laccainsäure A (71–96) Laccainsäure B (0–20) Flavokermessäure + Kermessäure (3.6–9)

Tabelle 2: Strukturen und spektrale Eigenschaften verschiedener roter Anthrachinon-Farbstoffe.

Verbindung	Struktur		Vis-Absorptionsmax. λ_{max} [nm]	Molekulargewicht [g/mol]
Cochenille und Kermes				
Carminsäure	$R_1 = CO(CHOH)_4CH_3$	$R_2 = OH$	491, 495	492,4
Kermessäure	$R_1 = COCH_3$	$R_2 = OH$	496, 545	372,3
Laccainsäure D = Flavokermessäure	$R_1 = H$	$R_2 = H$	429	314,3
Gummilack				
Laccainsäure A	$R = CH_2CH_2NHCOCH_3$		500	537,4
Laccainsäure B	$R = CH_2CH_2OH$		490	496,4
Laccainsäure C	$R = CH_2CH(NH_2)COOH$		k.A.	539,4
Laccainsäure E	$R = CH_2CH_2NH_2$		496	495,4
Färberröte				

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Vis-Absorptionsmax. λ_{max} [nm]	Molekulargewicht [g/mol]
Alizarin	OH	OH	H	H	H	422	240,2
2,6–Dihydroxyanthrachinon	H	OH	H	H	OH	k.A.	240,2
Chinizarin	OH	H	H	OH	H	480	240,2
Purpuroxanthin	OH	H	OH	H	H	422	240,2
Purpurin	OH	OH	H	OH	H	480	256,2
Lucidin	OH	CH_2OH	OH	H	H	k.A.	270,2
Lucidin–Primeverosid	OH	CH_2OH	O–prim	H	H	k.A.	564,5
Ruberythrinsäure	OH	O–prim	H	H	H	k.A.	534,5

k.A.: keine Angabe
O–prim = O-Primeverosid = O–β–D–Glucose–β–D–Xylose

ihrer Zusammensetzung unterscheiden können. Die unterschiedlichen Bestandteile der natürlichen Farbstoffextrakte weisen dabei nicht nur unterschiedliche Lichtechtheit auf – was deren Verwendung als Farbstoff mehr oder weniger geeignet machte –, sondern erlauben es heute noch, anhand der identifizierten Komponenten Rückschlüsse zu ziehen, Extrakte welcher Pflanze oder welches Tieres zum Färben benutzt wurden. Am Beispiel der Familie der roten Alizarin-Farbstoffe gibt Tabelle 1 einen Überblick, welche Alizarin-Derivate in tierischen Extrakten unterschiedlicher Herkunft (etwa aus den Cochenille-Läusen, die bevorzugt auf Kakteen wachsen) gefunden werden.

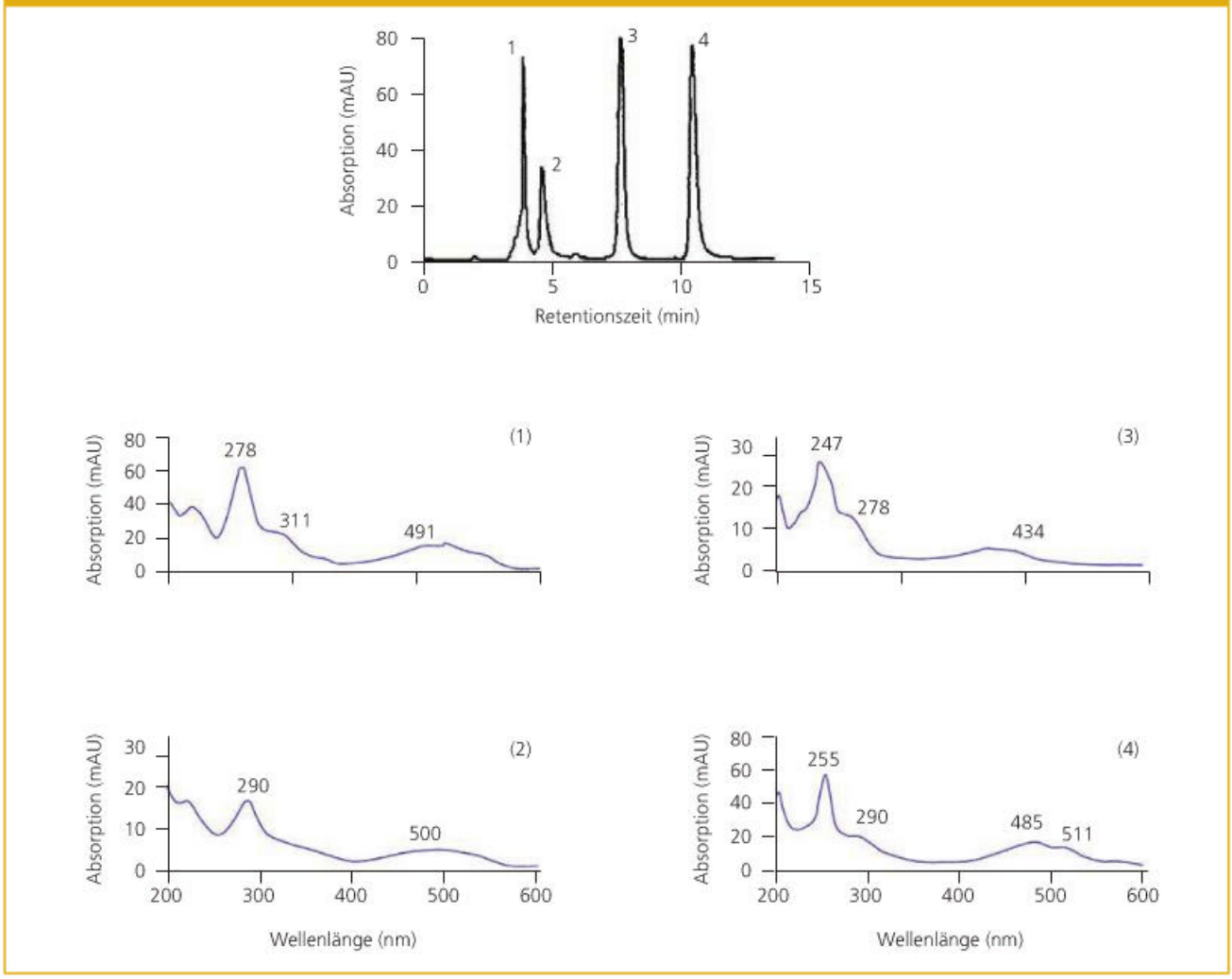
Die Kenntnis der farbgebenden Komponenten in einem Gemälde oder einer Tapisserie, und als Konsequenz, die Identifikation der vom Künstler verwendeten natürlichen Farbstoffe, ist notwendig für die Entwicklung geeigneter Maßnahmen für die Restaurierung und Konservierung eines Kunstwerkes. Bisher wurden erst wenige Methoden publiziert, mit denen historisch verwendete natürliche Farbstoffe identifiziert werden können: Zu diesen gehören klassische mikrochemische Methoden,[4] spektroskopische Techniken im sichtbaren und im IR-Bereich,[5] Dünnschichtchromatographie[6] und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), hauptsächlich gekoppelt mit UV/Vis-Detektion.[7–9] Die Verwendung von HPLC mit UV/Vis-Detektion liefert allerdings nur dann schlüssige Ergebnisse, wenn geeignete Referenzsubstanzen vorliegen.[10] Daher wurde in den letzten Jahren die Verwendung von HPLC mit massenspektrometrischer Detektion für diese Aufgabe vorgeschlagen,[11,12] die eine eindeutige Identifikation der natürlichen Farbstoffe ermöglicht. Außer für rote Farbstoffe der Anthrachinon-Familie wurde diese leistungsfähige Kopplungstechnik auch für die Bestimmung von indigoiden Farbstoffen[13,14] oder von Flavonoid-Farbstoffen[15] verwendet.

In diesem Artikel soll ein Überblick gegeben werden über die Verwendung von RP-HPLC/MS für die Identifikation ausgewählter natürlicher Farbstoffe aus der Familie der Anthrachinone wie Cochenille oder Färberröte.

Analytische Untersuchungen

Die hier beschriebenen Experimente stützen sich weitgehend auf die Arbeiten von Ackacha *et al.*[12] zur Auftrennung und Detektion von Anthrachinon-Farbstoffen, die auf einer Hewlett-Packard (jetzt: Agilent) Serie 1100 HPLC/DAD/MS

Abildung 2: Chromatogramm und UV/Vis-Spektren einer Standard-Mischung (c = 50 µg/mL) von 15 Carminsäure; 2= Laccainsäure; 3= Alizarin und 4= Purpurin. Die Nummern der Spektren entsprechen den Peaknummern im Chromatogramm.



durchgeführt wurden, bestehend aus einem Rheodyne (Cotati, California, USA) 7225i Injektionsventil mit 20 µL Probenschleife, einer isokratischen Pumpe, einem Diodenarray-Detektor und dem 1946A massenselektiven Detektor mit Elektrospray-Interface. Die Trennung erfolgte auf einer Zorbax SB-C18 Trennsäule (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) von Agilent (Wilmington, Pennsylvania, USA) isokratisch mit einem Laufmittel aus 80% (v/v) MeOH+0,2% AcOH / 20% H_2O + 0,2% AcOH. Die optimierten Bedingungen der Elektrospray-MS-Detektion (Detektion im negativ-Ionen-Modus) sind: 4000 V Ionisationsspannung; 90 V Blendenspannung; 11 L/min Trockungsgas bei 350 °C. Die UV-Detektion erfolgte bei 250 und 280 nm. Die Datenauswertung erfolgte mit der Chemstation 3D-Software.

Referenzsubstanzen Carminsäure und Purpurin stammten von Fluka, Alizarin von Riedel-de-Haën (p.a. Qualität, alle bezogen über Sigma-Aldrich). Die Farbstoffe Laccainsäure, granulierter Cochenille-Extrakt und Krapplack (hergestellt aus der Wurzel von *Rubia tinctorum*) in Pulverform stammen von Kremer Pigmente (Aichstetten, Deutschland). Die Farbstoffe wurden in Methanol gelöst (0,2 mg/mL) und Verdünnungen dieser Stammlösungen (50 µg/mL) wurden für die HPLC/MS-Messungen verwendet.

Da es sich bei allen hier behandelten Farbstoffen um saure Substanzen handelt (siehe Strukturen in Tabelle 2), erfordert die Trennung den Zusatz von Säure zur mobilen Phase, um unerwünschte Wechselwirkungen mit der stationären Phase, z.B. durch Ionenaustausch, zu minimieren. Da Trifluoressigsäure oft zu einer Unterdrückung des MS-Signales führt, wurde Essigsäure (0,2% v/v) als Zusatz zur mobilen Phase gewählt.

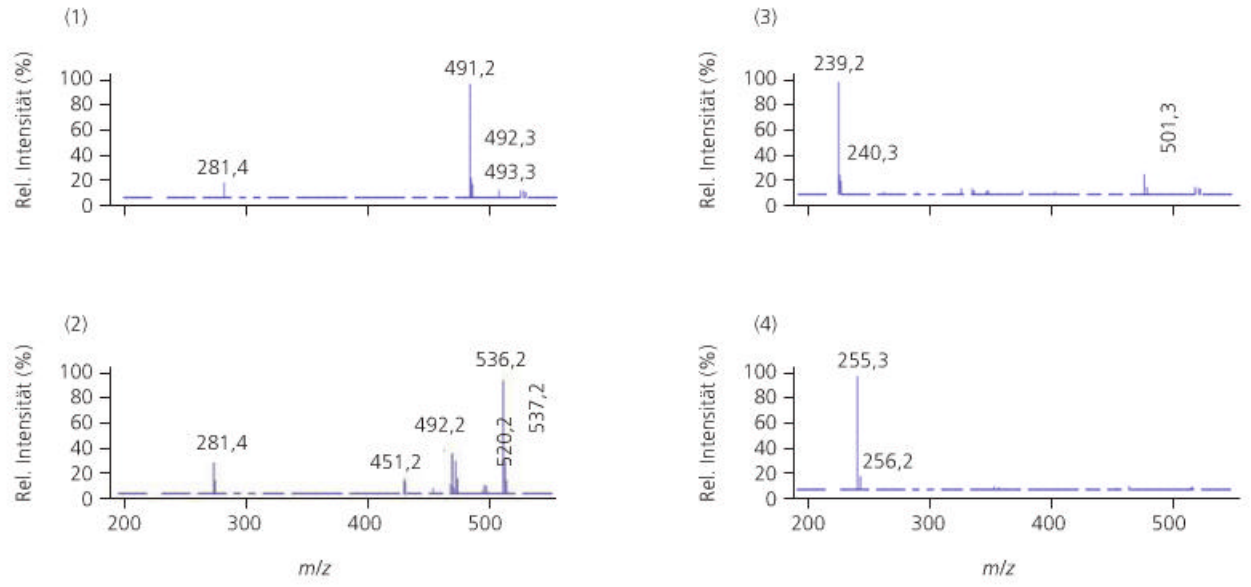
Die UV/Vis-Spektren der untersuchten Verbindungen sind, gemeinsam mit dem UV-Chromatogramm, in Abb. 2 wiedergegeben. Anhand der UV/Vis-Spektren können Alizarin und Purpurin sehr gut unterschieden werden, da ihre Absorptionsmaxima (bei 434 bzw. 485 nm) deutlich unterschiedlich sind. Der Unterschied in den Absorptionsspektren von Carmin- und Laccainsäure mit Absorptionsmaxima bei 491 bzw. 500 nm im sichtbaren Bereich ist bereits wesentlich geringer und erschwert deren eindeutige Identifikation. Allerdings zeigen sie auch Unterschiede in der Absorption im UV-Bereich (λ_{max} = 278 bzw. 290 nm), was insgesamt die Unterscheidung der beiden Farbstoffe erlaubt. Eine eindeutige Identifikation ist allerdings nur unter Zuhilfenahme des simultan aufgenommenen Massenspektrums möglich.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgt im negativ-Ionen-Modus, wobei die Massenspektren unter den gewählten Detektionsbedingungen in der Regel das quasi-Molekülion $[M-H]^-$ als intensivstes Signal und darüber hinaus nur wenige andere Peaks aufweist. Dies erleichtert einerseits die Zuordnung der Spektren, setzt aber andererseits eine Kenntnis der möglichen Strukturen voraus. Die Massenspektren der untersuchten Peaks sind in Abb. 3 wiedergegeben.

Anwendungsbeispiele

Die oben beschriebene Methode kann für die Identifikation natürlicher organischer Farbstoffe in Proben von authentischen Malmaterialien eingesetzt werden. Abb. 4(a) zeigt ein HPLC-Chromatogramm einer Cochenille-Probe.[3] Neben den durch authentische Referenzsubstanzen identifizierten Peaks (Carmin-, Flavokermes- und Kermessäure) lassen sich eine Reihe von weiteren Peaks detektieren, deren Struktur noch nicht aufgeklärt ist und die in der einschlägigen Literatur als dc II, dc IV und dc VII bezeichnet werden. Die UV/Vis-Spektren aller detektierten Substanzen sind in Abb. 4(b–f) wiedergegeben. Aufgrund der UV/Vis-Spektren lässt sich bereits schließen, dass es sich bei den unbekannten Substanzen um strukturell verwandte Substanzen zur Flavokermessäure (dc II) und zur Carminsäure (dc IV und dc VII) handelt; eine eindeutige Identifikation gelingt aber in Ermangelung aussagekräftiger Massenspektren nicht.

Abbildung 3: ESI- Massenspektren einer Standard-Mischung (c = 50 µg/mL) von 1= Carminsäure; 2= Laccainsäure; 3= Alizarin und 4= Purpurin. Die Nummern der Spektren entsprechen den Peaknummern im Chromatogramm in Abbildung 2.



Im Gegensatz dazu erlaubt der parallele Einsatz der MS- und UV/Vis-Detektion die Identifikation oder zumindest weitgehende Charakterisierung unbekannten Peaks. So zeigt Abb. 5 das Chromatogramm der Probe eines mit Aluminium fixierten Krapplackes. Der methanolische Extrakt der Probe wurde mittels HPLC/DAD/MS untersucht. Da die Konzentrationen der Farbstoffe im methanolischen Extrakt sehr niedrig waren, konnten keine aussagekräftigen UV/Vis-Spektren erhalten werden. Dennoch sind die ESI-Massenspektren von ausreichender Qualität, um wertvolle

Abbildung 4: (a) HPLC-Chromatogramm von Cochenille und UV/Vis-Spektren seiner verschiedenen Bestandteile: (b) dc II (Flavokermessäure-artige Verbindung), (c) Carminsäure, (d) dc IV (Carminsäure-artige Verbindung), (e) dc VII (Carminsäure-artige Verbindung), (f) Flavokarminsäure, (g) Kermessäure.

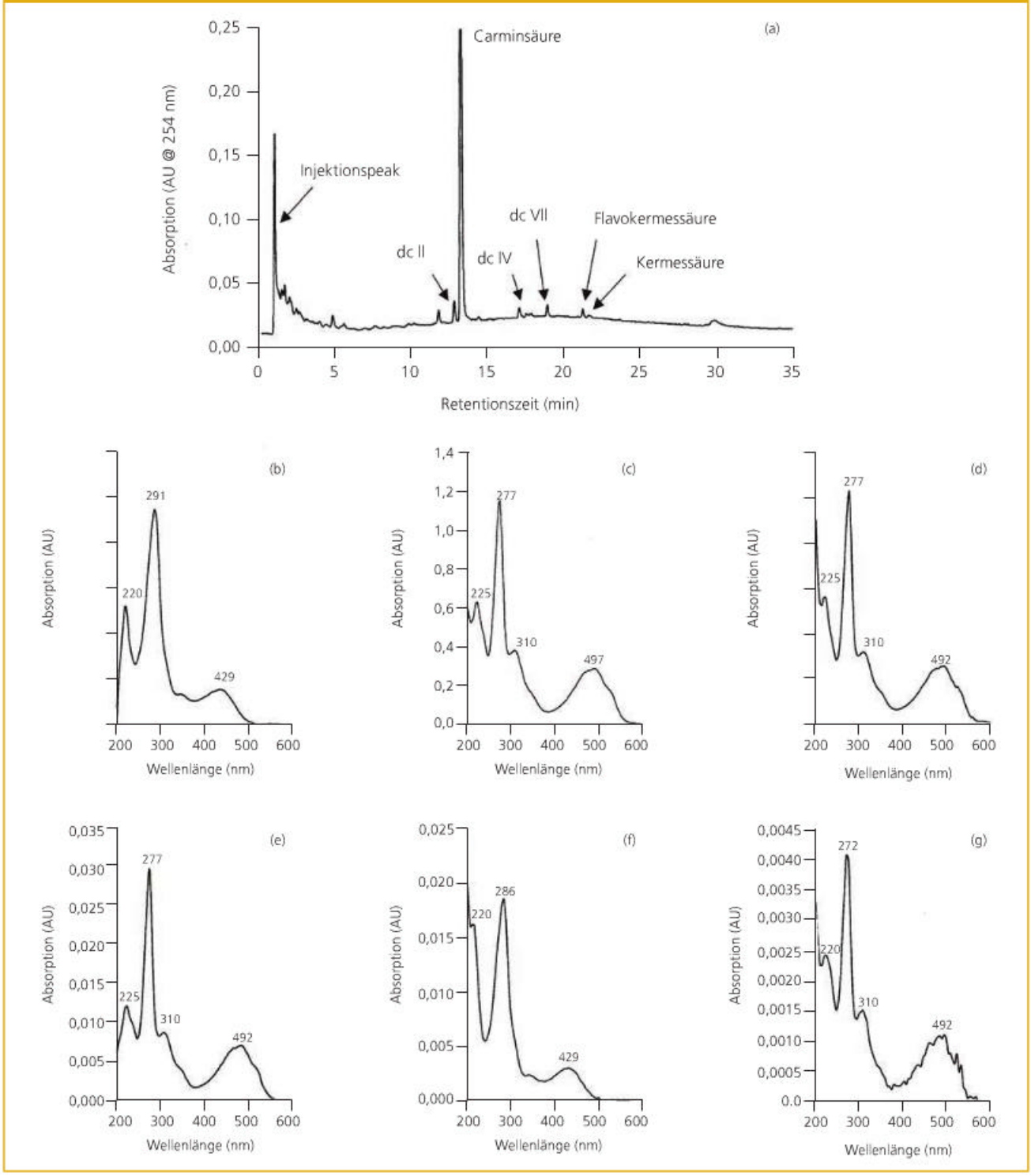


Abbildung 5: Chromatogramm und Massenspektren einer authetischen Krapplack-Probe.

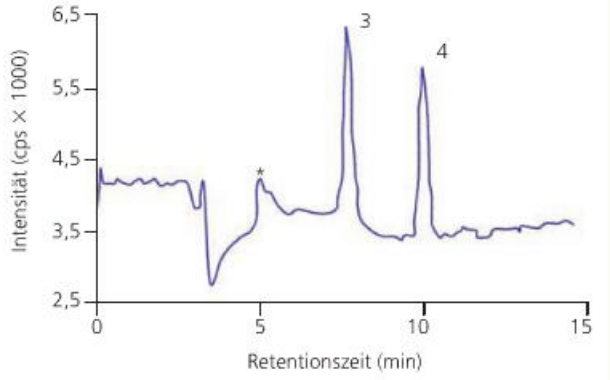
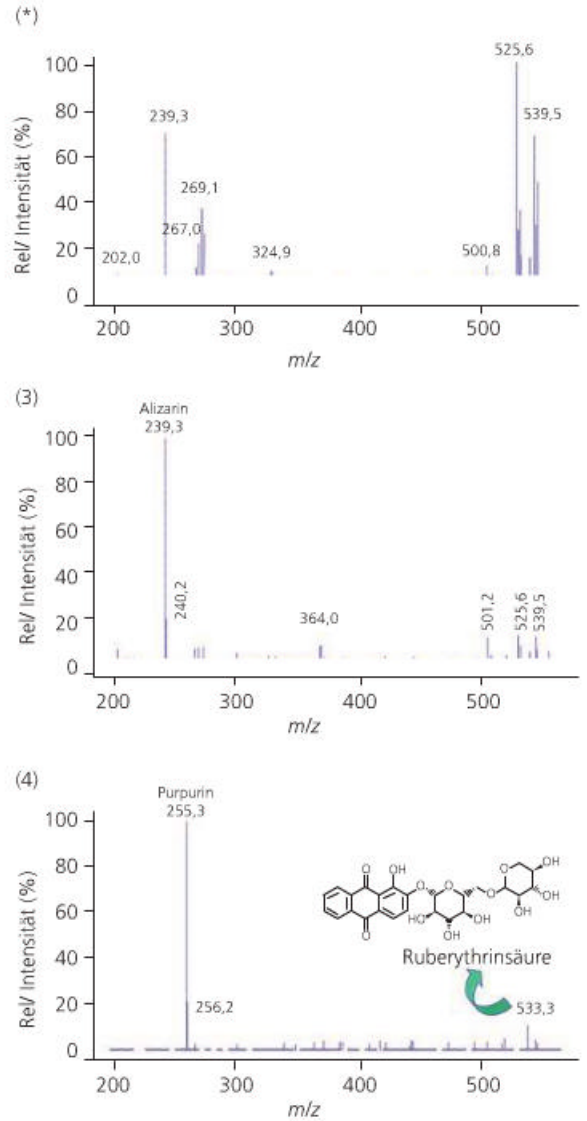


Abbildung 6: Massenspektren der einzelnen Bestandteile einer authetischen Krapplack-Probe. Die Bezeichnung der Peaks entsprichtt dem Chromatogramm in Abbildung 5.



Informationen für die Identifikation der Peaks zu liefern. Die Massenspektren der beiden identifizierten Substanzen Alizarin und Purpurin sind in Abb. 6 wiedergegeben. Die dritte Substanz, mit einem Stern im Chromatogramm gekennzeichnet, konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Die auftretenden Signale im Massenspektrum lassen sowohl die Interpretation zu, dass Lucidin anwesend ist (Signale bei m/z 269 für $[M\text{-}H]^-$ und eventuell auch bei m/z 539 für ein Dimeres des Lucidin $[2M\text{-}H]^-$) oder aber ein Ca-Al-Cluster des Alizarin ($[CaAl(Alizarin\text{-}2H)_2]^-$ für m/z 539). Auch wenn hier letztlich keine eindeutige Aussage möglich ist, so bringen die Massenspektren dennoch wesentliche Information in einem Konzentrationsbereich, der der UV/Vis-Detektion bereits nicht mehr zugänglich ist.

Schlussfolgerung

HPLC mit paralleler UV/Vis- und massenspektrometrischer Detektion ist eine aussagekräftige Methode für die Analytik natürlicher organischer Farbstoffe in historischen Kunstwerken oder authentischen (historischen) Referenzsubstanzen. Nach entsprechender Probenvorbereitung können sowohl Extrakte von Malpigmenten, als auch von gefärbten Textilien untersucht werden. Die gegenüber der UV/Vis-Detektion um rund eine Größenordnung verbesserte Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion erlaubt die Verwendung noch kleinerer Probenmengen für die Analytik, was besonders für die Materialuntersuchung in der Kunst ein sehr wichtiges Kriterium ist. Sind mögliche Strukturen bekannt, so können auch mit der sanften – und daher nur eingeschränkt Strukturinformation liefernden – Elektrospray-Ionisation und einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer Strukturvorschläge für unbekannte Farbstoffe in den Extrakten der Pigmente oder Textilien gemacht werden. Damit ist die HPLC/DAD/MS-Kopplung ein wertvolles analytisches Werkzeug, das Kuratoren, Restauratoren oder Konservatoren wichtige Informationen für Ihre Arbeit liefern kann. Es ist daher zu erwarten, dass der Einsatz von HPLC/DAD/MS in der Kunstanalytik in den kommenden Jahren signifikant zunehmen wird.

Referenzen

1. M. Doerner, Malmaterial und seine Verwendung im Bild, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 17. Auflage, 1989.
2. G. Schneider, Färben mit Naturfarben, Maier, Ravensburg (1979).
3. J.H. Hofenk-de Graaf, The Colorful Past: Origins, Chemistry and Identification of Natural Dyestuffs, Archetype Publications, London, 2004.
4. H. Schweppe, *J. Am. Inst. Conserv.*, 1979, **19**, 14–23.
5. J.H. Hofenk-de Graaff, Natural Dyestuffs: Origin, Chemical Constitution, Identification, ICOM, Committee of Conservation, Amsterdam, 1969.
6. L. Masschelein-Kleiner, *Mikrochim. Acta*, 1967, **6**, 1080–1085.
7. J. Wouters und N. Rosario-Chirinos, *J. Am. Inst. Conserv.*, 1992, **31**, 237–255.
8. P. Novotná et al., *J. Chromatogr. A*, 1999, **863**, 235–241.
9. G. Derksen et al., *J. Chromatogr. A*, 1998, **816**, 277–281.
10. S.M. Halpline, *Stud. Conserv.*, 1996, **41**, 76–94.
11. M. Puchalska et al., *J. Mass Spectrom.*, 2003, **38**, 1252–1258.
12. M.A. Ackacha, K. Poleć-Pawlak und M. Jarosz, *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 1028–1034.
13. I. Karapanagiotis, *Am. Lab.*, 2006, **38**(3), 36–40.
14. K. Pawlak et al., *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 613–622.
15. B. Szostek et al., *J. Chromatogr. A*, 2003, **1012**, 179–192.