

## МОДИФИКАЦИЯ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОТО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА 4-ХИДРОКСИПРОЛИН ЗА ЦЕЛИТЕ НА КОНСЕРВАЦИОННИЯ АНАЛИЗ

*Диана Николова<sup>1</sup>, Иван Гошев<sup>2</sup>, Боряна Михайлова<sup>2</sup>*

### **Въведение**

Структурният протеин, от който е изградена животинската кожа, е колагенът. При варенето ѝ с вода се получава желатин, който е намерил широко приложение в древните техники и технологии като лепило и свързвател [1, 2]. Колагенът и желатинът се характеризират с това, че те са единствените протеини, съдържащи иминокиселината 4-хидроксипролин [1]. В съответствие с това идентификацията им се основава на доказването на тази иминокиселина в изследваните проби. За целта се използва широк спектър от аналитични методи като колориметрия, HPLC, GC, капиларна електрофореза и др. [3, 4], изискващи минимални, но пречистени субстанции за анализ. Изолирането и пречистването на подлежащия на анализ протеин е свързано неминуемо със съответни загуби, а в консервационния анализ се работи с минимални количества проби за анализ, тъй като те се взимат от автентични обекти. Затова наред с инструменталните методи, в конкретни случаи е актуална и микрохимическата качествена ре-

акция за доказване на 4-хидроксипролин с реактива на Ерлих (p-диметиламино-бензалдехид) [5].

Проблем в консервационния анализ е установяването на деструктирала кожа в археологически обекти, където разпадните ѝ продукти са примесени с почвени замърсявания, корозионни продукти от метални предмети, багрила от текстилни материали или/и от самата кожа и др.

Целта на настоящето изследване е модифицирането на известен метод за идентификация на 4-хидроксипролин (4-Нур), позволяващо прилагането му за доказване на остатъци от кожа (дрехи, аксесоари и др.) в археологически обекти.

### **Материали и методи**

За основа на изследването е използван микровариант на реакцията на Ерлих (6).

Оригиналните проби, анализирани за наличие на деструктирала кожа са разпадни продукти от предмети, примесени с почва и налепи във вътрешността на спирали от символично могилно погребение на тракийски

---

<sup>1</sup> Национален исторически музей, София 1618, ул. Витошко лале 16, кв. Бояна

<sup>2</sup> Институт по органична химия с ЦФ-БАН, София 1113, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 9

жрец (VIII–VII в. пр.н.е.) край с. Белиш, Троянско.

Спектрите във видимата област са заснети на двулъчев спектрофотометър Shimadzu 3000 (Япония). Работено е с кювети с редуциран обем и  $d = 1$  cm.

p-диметиламино-бензалдехид (p-ДМАБ) е доставен от MERCK (Германия). Всички останали химикали са закупени от фирма Валерус (България).

Алкалните хидролизати от археологичния обект са получени като към 100 mg от изходните маериали се добавят 350  $\mu$ L 6N NaOH. След нагряване 10 min на водна баня, престой 2 h и центрофугиране (10 min, 5000 об/мин) се получават 150 – 180  $\mu$ L алкален хидролизат.

### Резултати и дискусия

За определяне а 4-Нур в почвени проби от археологически обекти най-подходящ би бил:

- Метод, при който не се налага изолиране и пречистване на разпадните колагенови продукти и съпътстващите онечиствания в изходната проба;
- Метод, който позволява идентификация на 4-Нур от деградирала кожа чрез неутрализиране изявата на останалите субстанции в пробата (най-вече багрила);
- Метод, при който може да се работи с минимални количества изходен образец (почвена проба).

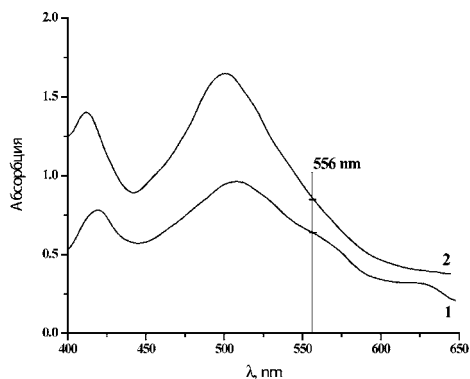
На тези изисквания отговаря спектрофотометричното доказване на 4-Нур с реактива на Ерлих – p-ДМАБ. В случая във VIS – спектъра на реак-

ционната смес се явява пик с  $\lambda_{max} = 556$  nm, държащ се на цветното съединение, резултат от взаимодействието на p-ДМАБ и пиrola, получен след окисление на 4-Нур.

Различните варианти на определянето се свеждат до използване като окислител на водороден пероксид [6] или хлорамин-Т [7].

В настоящето изследване бе възприет микровариант на определянето по Ненов [6] с окислител водороден пероксид. Реагентите бяха взети в четирикратно по-големи обеми, при което крайният обем от 1260  $\mu$ L позволяваше използването на кювети с редуциран обем и  $d = 1$  cm.

Първоначално бяха направени две определения с алкални хидролизати от почва от археологическия обект. Видимо и в двата случая реакцията на Ерлих бе положителна. На фиг. 1 са представени VIS-спектрите на съответните реакционни смеси. При



Фиг. 1. VIS-спектри на реакционни смеси с видимо положителна реакция на Ерлих за 2 определения на един и същи изходен археологически материал – почва от символично погребение на тракийски жрец VIII-VII в. пр.н.е. в околностите на с. Белиш, Троянско

тях обаче няма максимум при 556 nm. Само в спектър 2 се наблюдава рамо при тази дължина на вълната. Такива резултати бяха получени и при последващи определения.

Обяснението на тези резултати е, че VIS-спектрите са резултатни; При тях освен цветния комплекс, индикиращ наличието на 4-Нур, принос имат и всички налични цветни компоненти в пробата, поглъщащи във видимата област на спектъра, основно багрилата.

При предишно проучване [8] бе установено наличие на ализарин и индиго в анализираната почва, произхождащи от деградирани тъкани. При условията на реакционната смес

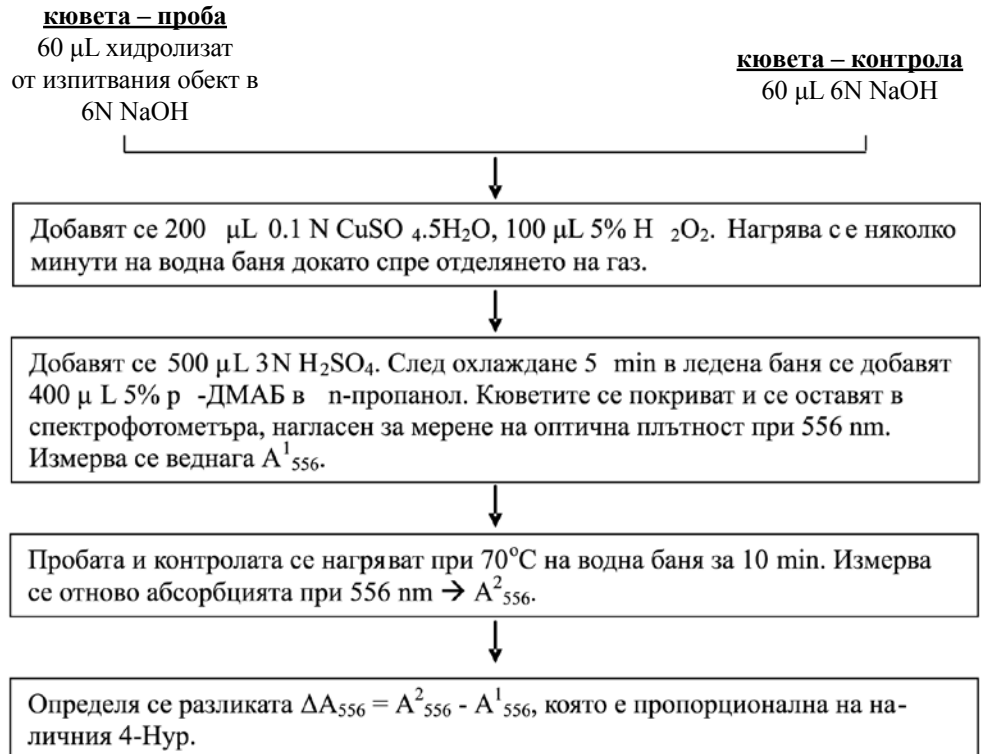
в алкалния хидролизат се извлича и ализарин [9].

Следователно при проведените експерименти приносът на цветното съединение на 4-Нур и р-ДМАБ във VIS-спектрите се маскира основно от ализарина.

Поради нехомогенността на изходните почвени проби, при тези с относително по-ниско съдържание на ализарин, в спектрите се наблюдава само рамо. Проверката показва, че ализаринът и индиго не взаимодействат с р-ДМАБ.

Реакцията на Ерlich протича при нагряване. Този факт и получените дотук резултати продиктуваха тър-

#### А. СХЕМА НА МОДИФИКАЦИЯТА:



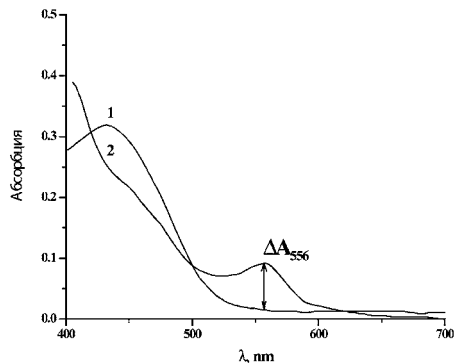
сената модификация. Същността ѝ се състои в измерване на оптичната плътност на една и съща проба (хидролизат от изследвания обект в 6N NaOH) след ( $A_{556}^2$ ) и преди нагряване ( $A_{556}^1$ ) на реакционната смес. Разликата в оптичните плътности  $\Delta A_{556} = A_{556}^2 - A_{556}^1$  е пропорционална на наличния 4-Нур в пробата.

VIS-спектрите на смес от ализарин и 4-Нур, заснети по горната модификация са представени на фиг. 2. Те потвърждават удачността на модификацията.

Схемата на определението по предлаганата модификация е следната: А.

За достоверни могат да се приемат резултати с  $\Delta A_{556}$  над 0.010, отговарящо на изходен разтвор за анализ с 2  $\mu\text{g}$  4-Нур в 100.0  $\mu\text{L}$ , т.е.  $3 \cdot 10^{-7}$  g 4-Нур в 150  $\mu\text{L}$  хидролизат, което е прагът на откриваемост на 4-Нур по предлаганата модификация. Както се вижда от таблица 1, стойностите на  $\Delta A_{556}$  са далеч по-високи от стойността, отговаряща на прага на откриваемост на 4-Нур, откъдето следва че за анализ могат да се вземат изходни образци деградирала кожа с почвени замърсявания до около 30 mg, третирани с 200  $\mu\text{L}$  6N NaOH.

Така изложената модификация на метода за доказване на 4-Нур с реактива на Ерлих е приложена за откриване на остатъци от деградирала кожа във вътрешните налепи на спирали от символично погребение на тракийски жрец – находка VIII – VII в. пр.н.е. от



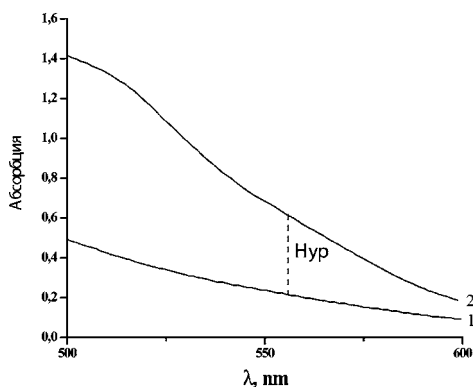
Фиг. 2. VIS-спектри на реакционна смес за определяне на 4-Нур с р-ДМАБ в присъствие на ализарин съгласно модификацията; спектър 1 – преди нагряване на реакционната смес; спектър 2 след нагряването ѝ

района на с. Белиш, Троянско (фиг. 3). Спиралите са силно деградирани с оригинални дължини около 10 cm.

На фиг. 4 са представени VIS-спектрите за налепите от спирали тип II, заснети съгласно модификацията. В таблица 1 са представени стойностите за  $\Delta A_{556}$  за трите вида спирали. Резултатът от изследването показва, че спиралите са били нанизани на кожен ивици. От вида на налепите следва заключението, че кожените ивици са имали ширини равни на вътрешните обиколки на спиралите. Изводът, който се налага е, че спиралите са били елементи на украса. Възможно е да са били под формата на наниз, а така също и украса на дреха.



Фиг. 3. Общ вид на трите типа спирали от символично погребение на тракийски жрец край с. Белиш, Троянско (VIII-VII в.пр.н.е.), налетите от вътрешността на които са изследвани за наличие на 4-Нур



Фиг. 4. VIS-спектри на реакционната смес за доказване на 4-Нур в спирали от тип II; спектър 1 – преди нагряване; спектър 2 – след нагряване.

Проба	$A_{556}^1$	$A_{556}^2$	$\Delta A_{556}$
Спирала I	0,214	0,766	0,552
Спирала II	0,205	0,609	0,404
Спирала III	0,216	0,437	0,257

Таблица 1. Спектрофотометрични данни от прилагане на модифицирания спектрофотометричен метод за доказване наличие на 4-Нур в налетите по вътрешната повърхност на спиралите от археологическия обект

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mills, J., R. White, The organic chemistry of Museum Objects, London, Butterworths, 1987, 75-76.
2. Шаренков, Ат., Технология и техника на възрожденската живопис. Възрожденската икона. София, Наука и изкуство, 1992, 40-43.
3. Birstein, V.J., On the technology of central Asian wall paintings: the problem of binding media, *Studies in Conservation*, 20, 1975, 8-9.
4. Dar Hong et al., Analysis of hydroxyprolin in collagen of pig skin tissue by low pressure chromatography separation and conductivity detection, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 89, 2004, 145-148.
5. Anheuser, K., Historische Klebstoffe und ihre Identifizierung, *Arbeitsblätter für Restauratoren*, 2, 2001, 247-263.
6. Ненов, Н., Практикум по химически проблеми в консервацията, София, Наука и Изкуство, 1984, 138-139.
7. Stegemann, H., Mikrobestimmung von Hydroxyprolin mit Chloramin-T und p-dimethylaminobenzaldehyd, *Z. Physiol. Chem.*, Bd. 311 (1958), 41-45.
8. Непубликувани резултати.
9. Федорович, Е. Ф., Простейшие методы исследования окраски древних и старинных тканей (хранение, исследование, реставрация), *3(33)*, 1977, 98-107.

## ATTESTING MORDANT DYES IN AUTHENTIC ARTIFACTS BY VIS-SPECTRA IN BUFFER SOLUTIONS

Diana Nikolova<sup>1</sup>, Boryana Mihaylova<sup>2</sup>, Ivan Goshev<sup>3</sup>

### *Summary*

The research paper illustrates the identification of mordant dyes, coloring red with Al<sup>3+</sup> attested by their VIS-spectra in buffer solution. The determination is based on the established fact that the conformation of the dyes under consideration depends on pH of their solutions. The suggested conditions for spectrophotometric attesting of mordant dyes provide representative and reproducible results. The same approach can be successfully applied to determine the presence of other dyes of pH dependable structures.

The suggested identification has been applied to attest the use of alizarin in dyeing the fur padding of a helmet from the tomb burial near Zlatinitza village, the district of Yambol (4<sup>th</sup>-3<sup>rd</sup> cent. BC)

---

<sup>1</sup> National Museum of History, Sofia, 1618, 16, Vitoshko lale str., Boyana

<sup>2</sup> Institute of Organical Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, Sofia, bl. 9, Acad. G. Bonchev str.

<sup>3</sup> Institute of Organical Chemistry with Centre of Phytochemistry, BAS, Sofia, bl. 9, Acad. G. Bonchev str.