

Roma, 15/01/2020

## Report SAL5-WP2-Task 2.2 – ADAMO-DTC Lazio

### INDAGINI SU CAMPIONI DI CUIOIO DORATO E DIPINTO PROVENIENTI DAL PALAZZO CHIGI DI ARICCIA.

WP2-Task 2.2 “*Tecniche di spettrometria di massa e tecnologie chimiche di analisi*”

L. Tortora (RM3), R. Curini, A. Bianco (RM1)

*Task leader: L. Tortora (RM3)*

#### Analisi e identificazione dei coloranti organici naturali nei cuoi di Palazzo Chigi

##### 1) Premessa

Nell’ambito del progetto ADAMO, progetto collegato al Distretto Tecnologico per i Beni e le Attività Culturali della Regione Lazio, è stata promossa la ricerca nel campo di metodologie analitiche per l’individuazione e l’identificazione di coloranti organici in matrici archeologiche e artistiche. In particolare, l’attività di ricerca è stata finalizzata all’individuazione di protocolli di analisi attraverso Tecniche di spettrometria di massa e tecniche chimiche di analisi per coloranti naturali da matrici tessili e pittoriche. Esso può inoltre costituire una fonte di dati per successive pubblicazioni.

Oggetto di questa prima sperimentazione sono stati alcuni campioni di cuoio dipinti appartenenti ai paramenti di Palazzo Chigi.

Scopo di questa indagine è stato lo sviluppo di un metodo di estrazione e analisi per l’identificazione dei coloranti impiegati per la realizzazione di questi materiali artistici.

##### 2) Metodi di indagine

###### - Analisi SERS

Grazie alla collaborazione con il gruppo del Prof. Postorino (Dip. di Fisica), il gruppo di ricerca ha consolidato un approccio multitecnica, con su un primo step basato sull’utilizzo di tecniche non invasive, come spettroscopia Raman e IR, e una seconda fase con tecniche microinvasive, quali HPLC-HRMS.

In particolare, per l’analisi dei cuoi di palazzo Chigi, la spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS) ha dato delle informazioni di notevole interesse.

###### Preparazione del colloide:

Argento nitrato ( $\text{AgNO}_3$ , purezza  $\geq 99.0\%$ ), idrossilammina idrocloruro (purezza = 99.0%) e la soluzione di idrossido di sodio (NaOH 10 M BioUltra) sono stati acquistati da Sigma Aldrich. Il colloide è stato preparato secondo il protocollo sviluppato da Leopold e Lendl [1].

###### Acquisizione degli spettri SERS

Sono stati prelevati 200  $\mu\text{L}$  di colloide e sono stati posti in una eppendorf. Si sono aggiunti 20  $\mu\text{L}$  di una soluzione di  $\text{MgSO}_4$  per indurre l’aggregazione delle nanoparticelle. Successivamente, 20  $\mu\text{L}$  di colloide aggregato sono stati posti a contatto con il frammento di campione (rif. campione analizzato:

4). Una volta che l'acqua è evaporata, si sono registrati gli spettri SERS in corrispondenza di cluster di nanoparticelle di argento. L'acquisizione degli spettri si è svolta non in corrispondenza diretta del frammento di cuoio, ma su cluster ad esso vicini: come osservato in altre misure SERS, infatti, tali spettri sono risultati generalmente di migliore qualità e affetti da un fondo di fluorescenza minore rispetto a quelli acquisiti da cluster presenti sulla superficie del campione. Lo strumento utilizzato è uno spettrometro Raman Horiba Jobin-Yvon HR Evolution accoppiato con microscopio (obiettivo utilizzato: 50X); il laser utilizzato è un laser He-Ne con lunghezza d'onda pari a 633 nm. La radiazione utilizzata aveva intensità pari a 0.38 mW, mentre si sono raccolte 60 scansioni di 2.5 secondi ciascuna. Per ogni campione, si sono raccolti spettri in tre punti diversi nel range 100-2000  $\text{cm}^{-1}$ , in modo da considerare la variabilità dello spettro in corrispondenza di cluster differenti. L'assegnazione dei picchi è stata svolta sulla base della letteratura [2-5] e mediante confronto con alcuni spettri SERS di coloranti, appartenenti al database SERS sviluppato all'interno del progetto ADAMO.

- Estrazione e clean up del campione:

Il gruppo di ricerca si è specializzato nello sviluppo di metodiche di estrazione soft per la caratterizzazione di coloranti organici da matrici tessili e pittoriche. Tuttavia, la scarsità di dati in letteratura sull'estrazione e caratterizzazione dei coloranti nei cuoi, ha stimolato la ricerca a muoversi sull'applicazione dell'innovativa metodica in ammoniacale per i cuoi di Palazzo Chigi.

Protocollo di estrazione

Il protocollo messo a punto, testato su provini di cuoio preparati in laboratorio, si articola nel seguente modo: i campioni da estrarre sono stati posti in una vial contenente 1.6 mL di soluzione estraente, composta da  $\text{NH}_3$  :  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1mM (1:1 v/v), con l'aggiunta di 4.4 mg di NaCl, secondo il protocollo per i materiali tessili descritto in letteratura [6]. I campioni sono stati lasciati per un'ora in immersione nella vial; successivamente, il frammento di cuoio è stato rimosso e la soluzione neutralizzata attraverso flusso di azoto.

Una volta neutralizzata, la soluzione, di circa 1 mL, è stata acidificata con 100  $\mu\text{L}$  di HCl (0.1 N) e sottoposta ad un clean up con una procedura di *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction* (DLLME). Nel dettaglio, come disperdente è stato scelto l'isopropanolo (300  $\mu\text{L}$ ) e l'1-pentanol (200  $\mu\text{L}$ ) come estraente. Dopo l'estrazione, il pentanol è stato neutralizzato e portato a secco per le successive analisi in HPLC-HRMS.

- HPLC-HRMS

Le analisi in HPLC-HRMS sono state eseguite su un sistema Thermo Scientific Ultimate 3000 RSLC accoppiato con uno spettrometro di massa Thermo Scientific Q Exactive Mass (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) con sorgente HESI. Per la separazione cromatografica, è stata usata una colonna Zorbax SB-Phenyl (4.6  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , 80 Å -Agilent Technologies-, insieme a una precolonna Zorbax SB-Phenyl (4.6  $\times$  12.5 mm, 5.0  $\mu\text{m}$  -Agilent Technologies). Per la separazione cromatografica, gli eluenti sono stati: (A)  $\text{H}_2\text{O}$  0.1%  $\text{HCOOH}$  + 10mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (B) Metanol 1%  $\text{HCOOH}$ .

Tutti i campioni sono stati solubilizzati in metanol prima dell'iniezione. Il volume di iniezione è di 20  $\mu\text{L}$  (Rheodyne model 7225i). Le condizioni di analisi sono state: ionizzazione negativa; capillary temperature 300°C; source temperature 300°C; RF lens 60; Sheat gas (nitrogen) 12 units; Auxiliary gas (nitrogen) 6 units.

MS parameters: Fullscan: Resolution 70000; scan range 50-600 m/z; AGC Target  $1 \times 10^6$

Maximum injection time 100 ms; MSMS (dds): resolution 17500; AGC target  $5 \times 10^5$ ; Maximun IT 100 ms; isolation window 2 m/z; NCE 20,30,40

### 3) Risultati

#### Analisi SERS

Gli spettri SERS ottenuti per il campione relativo alla zona dei rossi presentano una buona riproducibilità e una minima interferenza dei segnali caratteristici del colloide. Dallo spettro ottenuto dalla media dei tre spettri acquisiti, si osservano dei segnali caratteristici della cocciniglia: l'intenso picco a  $732\text{ cm}^{-1}$  viene attribuito al rocking del gruppo  $-\text{CH}_3$  nell'acido carminico e ai bending fuori dal piano dei legami C-H e C-OH, come anche il segnale a  $959\text{ cm}^{-1}$ . Si osserva poi una coppia di segnali, uno di bassa intensità a  $1290$  e uno più intenso a  $1334\text{ cm}^{-1}$ , che sono caratteristici dei coloranti antrachinonici. Il picco a  $1383\text{ cm}^{-1}$  presenta un'ottima corrispondenza con il picco analogo nello spettro del database. Si osserva poi un segnale a  $1464\text{ cm}^{-1}$ , che corrisponderebbe al picco a  $1472\text{ cm}^{-1}$  osservabile nello spettro di riferimento del colorante, attribuibile ai modi di stretching C-C e bending C-OH. Si osserva poi la presenza di altri picchi dello spettro di riferimento della cocciniglia nello spettro ottenuto dal campione di cuoio ( $1002, 1044, 1140, 1246\text{ cm}^{-1}$ ), sebbene con intensità differente. In ultimo, è opportuno notare che il picco del colorante a  $647\text{ cm}^{-1}$  non è praticamente osservabile nello spettro del campione: tale anomalia è in realtà riportata in letteratura, dove si osserva che tale segnale può sia essere presente che totalmente assente negli spettri SERS, sebbene non sia stata trovata una spiegazione convincente di tale fenomeno[2,5].

Nello spettro del campione si osservano inoltre altri segnali a  $1021, 1084, 1112, 1415, 1566\text{ cm}^{-1}$ , che non possono essere attribuiti alla presenza di cocciniglia. Dal confronto con la letteratura si osservano alcune corrispondenze con gli spettri SERS dei coloranti dell'aloè (picchi a  $1021$  e  $1566\text{ cm}^{-1}$ )[2], che risulterebbero presenti sulla base delle altre analisi, ma non è possibile individuare una corrispondenza certa senza il confronto con degli spettri di riferimento ottenuti con lo stesso colloide.

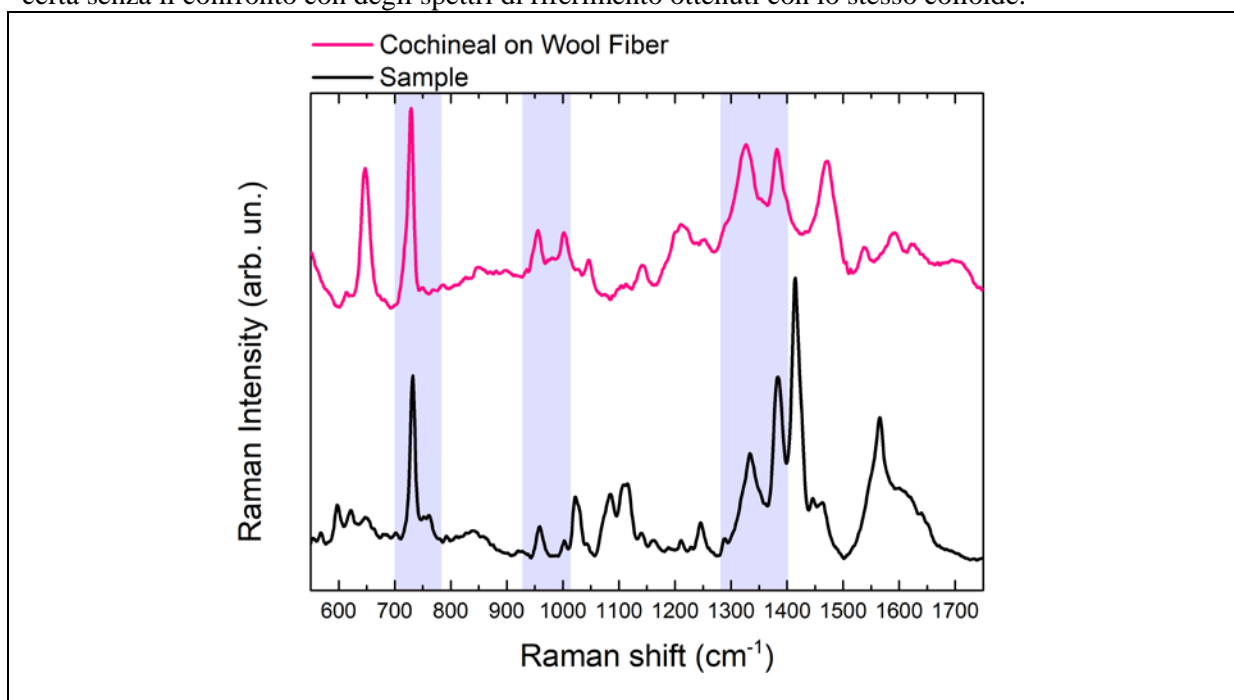


Figura 1: confronto dello spettro SERS ottenuto per il campione (linea nera) e per lo spettro di riferimento del database ADAMO ottenuto per la cocciniglia su fibra di lana (linea rosa). Sono evidenziati nei riquadri i picchi maggiormente corrispondenti tra i due spettri ed indicativi del colorante.

#### Analisi HPLC-HRMS



Le analisi in HPLC-HRMS si sono focalizzate principalmente sui campioni in oro e in rosso, facendo seguito a quanto già fatto dal gruppo del Prof. Tortora [7].

L'analisi dei campioni di cuoio dipinti o tinti in rosso ha messo in evidenza la presenza di coloranti antrachinonici, riferibili alla cocciniglia (Figura 2). Le diverse correnti estratte infatti riportano segnali relativi a rapporti  $m/z$  riferibili a dc8 e ai decarbossilati del dcIV, carminic acid, pp7 (ppII), pp9.

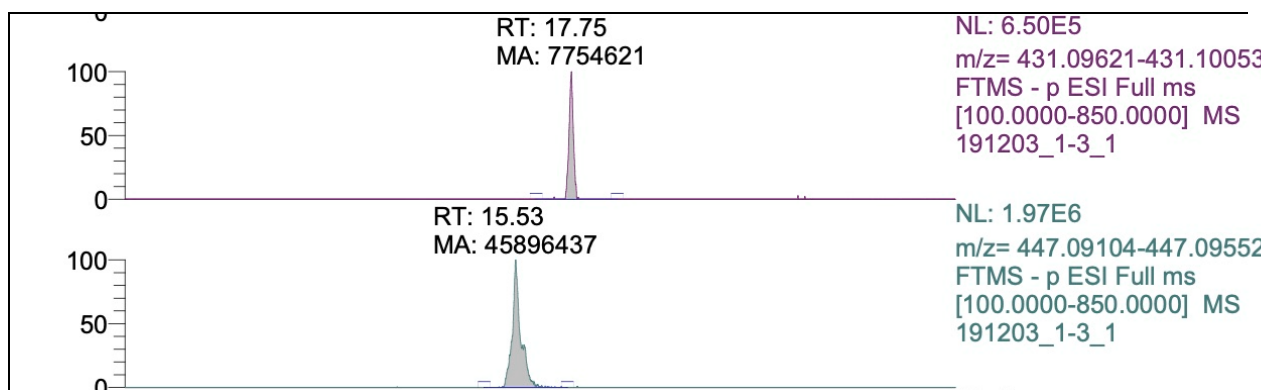


Figura 2. Alcune delle correnti estratte per rapporti  $m/z$  431  $[M-H]^-$  (riferibile a dc8) e 447  $[M-H]^-$  (riferibile al decarbossilato del dcIV, carminic acid, pp7 (ppII), pp9).

La presenza dell'acido carminico è confermata anche dallo spettro di frammentazione, visibile in figura 3. Nonostante l'assenza dello ione molecolare, i tre frammenti, 447, 357 e 327, sono caratteristici dell'acido carminico [6], e consentono quindi di confermarne la presenza.

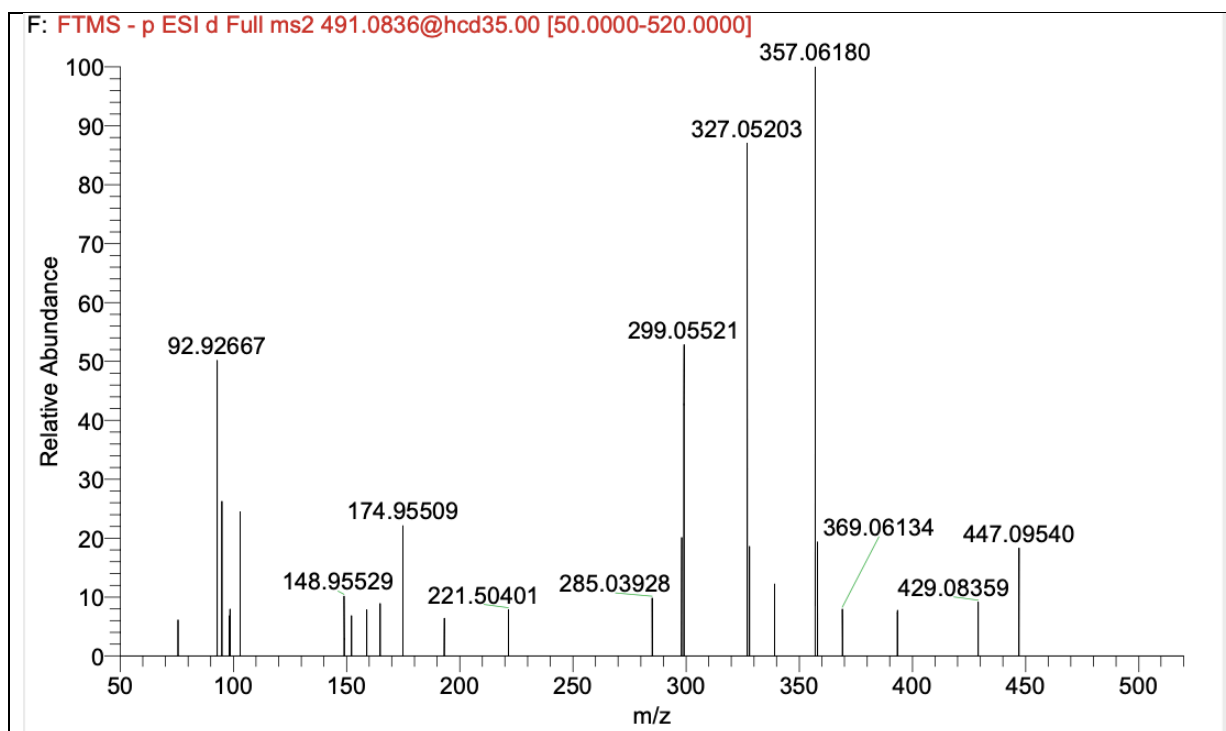


Figura 3. Spettro di frammentazione del picco  $[M-H]^-$ , a  $m/z$  491.

Insieme ai segnali riferibili ai composti della cocciniglia, è stato possibile individuare una serie di segnali, meno intensi, riferiti, ad esempio, a una massa accurata di 269.0442 (RT:22.42) e 311.0545 (RT:22.5 min).

I tempi di ritenzione e le formule brute sono ascrivibili a composti antrachinonici; in dettaglio, si può far riferimento a coloranti della robbia o dell'aloë, che presentano composti isomerici. Si sottolinea comunque che l'analisi HPLC-HRMS ha evidenziato la presenza di composti con massa accurata compatibile con aloesaponarina I e aloesaponolo I, che risulterebbero marker della sola aloë. Inoltre, l'assenza di alcuni composti tipici della robbia, come la purpurina, confermerebbe l'utilizzo dell'altro colorante; tuttavia, è noto in letteratura che la purpurina è uno dei componenti più facilmente degradabili.

Si sottolinea inoltre che nel lavoro condotto da Iorio su questi stessi campioni sono stati identificati alcuni composti tipici dell'aloë, come l'acido arachidonico o lignocerico, che quindi confermerebbe ulteriormente la presenza di coloranti di questa specie [7].

L'analisi su tre campioni dall'area in oro farebbe pensare invece all'impiego di coloranti flavonoidici. È stato possibile infatti identificare, dalle diverse correnti estratte, segnali relativi a rapporti m/z riferibili alla quercetina, in figura 4.

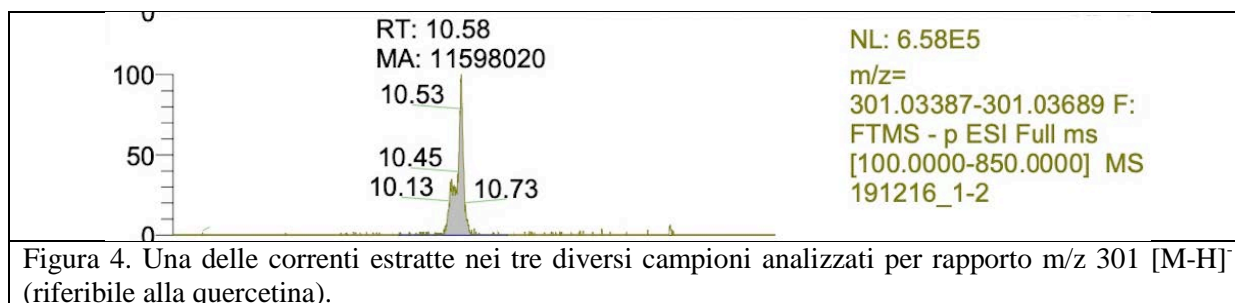


Figura 4. Una delle correnti estratte nei tre diversi campioni analizzati per rapporto m/z 301 [M-H]<sup>+</sup> (riferibile alla quercetina).

Insieme alla quercetina, è possibile riscontrare una serie di segnali ambigualmente attribuibili a coloranti flavonoidici o ad altre specie; tuttavia, i segnali di queste specie non sono sufficientemente intensi da poter dare luogo a una frammentazione. Questo aspetto non ci permette di fare un'ulteriore ipotesi sulla loro assegnazione.

Non sono stati identificati segnali relativi a composti dell'aloë.

#### Short Reference list

- [1] Leopold N. et al., A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107, 5723-5727, doi:10.1021/jp027460u
- [2] Bruni S. et al, Historical organic dyes: a surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectral database on Ag Lee–Meisel colloids aggregated by NaClO<sub>4</sub>, *Journal of Raman Spectroscopy*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011, 42, 1267-1281, doi:10.1002/jrs.2872
- [3] K. Chen et al., Application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the identification of anthraquinone dyes used in works of art, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37, 520–527. doi:10.1002/jrs.1426.

[4] M. Leona, et al., Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2006, 37, 981–992. doi:10.1002/jrs.1582.

[6] Serafini I et al. “How the extraction method could be crucial in the characterization of natural dyes from dyed yarns and lake pigments: The case of American and Armenian cochineal dyes, extracted through the new ammonia-EDTA method”, *Microchemical Journal*, 2017, 134, 237–245

[7] Iorio M et al., “Exploring Manufacturing Process and Degradation Products of Gilt and Painted Leather”, *Applied Science*, 2019, 9, 3016; doi:10.3390/app9153016

Report a cura di: Ilaria Serafini<sup>1</sup>

Gruppo di Lavoro: Alessandro Ciccola<sup>1,2</sup>, Flaminia Vincenti<sup>1</sup>, Francesca Ripanti<sup>2</sup>, Alessandro Nucara<sup>2</sup>, Paolo Postorino<sup>2</sup>, Camilla Montesano<sup>1</sup>, Roberta Curini<sup>1</sup>

Affiliazioni: <sup>1</sup>Dipartimento di Chimica, <sup>2</sup>Dipartimento di Fisica, Sapienza Università di Roma

*Luca Tortora Ph.D.  
Dipartimento di Scienze  
Università Roma Tre  
Via della Vasca Navale 84  
00146 Roma*

*tel. lab Secondary Ion Mass Spectrometry +39 06 57337385  
tel. ufficio +39 06 57337261*

*Responsabile del Laboratorio Analisi Superfici INFN Roma Tre  
Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN)  
Sec. Roma Tre  
Via della Vasca Navale 84  
00146 Rome*