

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Martin Pekař

OPTIMALIZACE CHEMICKÉ ANALÝZY VYBRANÝCH
SLOŽEK MATERIÁLŮ HISTORICKÝCH UMĚLECKÝCH DĚL

Optimization of Chemical Analysis of Selected Components in
Material of Historical Artworks

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23. května 2014.

Abstrakt

Předkládaná práce představuje pokus o zjednodušení postupu úpravy vzorků historických uměleckých děl. Úprava postupu byla testována na restaurátorsky významných materiálech, jako jsou damarová a kopálová pryskyřice, protože doposud publikované metody úpravy vzorků uměleckých děl se ukázaly jako nevhodné. K tomuto účelu byly použity instrumentální analytické metody, jako jsou HPLC-MS, HPLC-ELSD, GC-FID, GC-MS a pyrolyzní GC-MS. Metodou GC-MS se podařilo porovnat zastoupení mastných kyselin v reálném vzorku vajíčka a historického sousoší. Pro identifikaci monosacharidů v klovatinách se jako výhodná ukázala metoda GC-MS s derivatizací směsí hexamethyldisilazanu, trimethylchlorsilanu a pyridinu. Metodou GC-MS bylo potvrzeno kvalitativní složení damarové pryskyřice podle očekávaných analytů získaných z literárního zdroje. Ve vzorku historického sousoší byla metodou GC-MS zjištěna pravděpodobná přítomnost vajíčka a lněného oleje. Pro další práci byl navržen zjednodušený postup úpravy vzorků.

Abstract

The simplification of the historical pieces of work samples' treatment is described in the dissertation. The recent methods have been inappropriate therefore, modification of the treatment was necessary. The dammar and copal resin, important restoration materials, were used in the experiment. HPLC-MS, HPLC-ELSD, GC-FID, GC-MS and pyrolysis GC-MS were applied. The concentration of fatty acids in the historical sculpture was determined by GC-MS, and it was compared to the content of fatty acids inside an egg.

For identification of monosaccharide in the gum, GC-MS (hexamethyldisilazan, trimethylchlorsilan, and pyridine) is the suitable method. GC-MS determines the same composition of dammar resin as stated in the cited sources. The simple process for the samples' treatment was designed.

Seznam zkratek

BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoracetamid
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
FAME	methylestery mastných kyselin (fatty acid methylester)
HILIC	hydrofilní interakce v kapalinové chromatografii
HMDS	hexamethyldisilazan
HPSEC	vysokotlaká chromatografie dělicí podle velikosti (High Pressure Size Exclusion Chromatography)
MALDI-TOF	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby letu
TFA	trifluoroctová kyselina
TMCS	trimethylchlorsilan
Pyr	pyridin

Obsah

1. Teoretický úvod	7
1.1. Struktura malby a její složení	10
1.2. Matrice	13
1.3. Komponenty vzniklé degradací	16
1.4. Analýza vybraných složek	18
1.5. Derivatizace	20
1.6. Optimalizace	20
2. Experimentální část	21
2.1. Chemikálie	21
2.2. Přístroje a zařízení	22
2.3. Úprava vzorků	23
3. Výsledky	29
3.1. Sacharidy v klovatinách.....	29
3.2. Mastné kyseliny	29
3.3. Pryskyřice	32
4. Diskuze	37
5. Závěr	39
6. Citace	40

Úvod

K zachování maleb nebo jiných historicky cenných předmětů je nezbytná úzká spolupráce restaurátorů s analytickými chemiky, kteří napomáhají identifikovat materiály použité při tvorbě díla. Vzorky přijaté pro identifikaci jsou po chemické stránce pouze zaschlé směsi sacharidů, lipidů, kovů a bílkovin. Určení jednotlivých složek je pro restaurátory cenou informací k jejich práci, ale složitým úkolem pro analytické chemiky. Postupy pro určení použitého materiálu k tvorbě daného díla se neobejdou bez extrakční předúpravy vzorku na jednotlivé frakce. Metody založené na extrakci jsou pro chemickou analýzu komplexních vzorků doposud nenahraditelné. Frakcí získaných extrakcí vzorků může být několik podle druhu použitých rozpouštědel. K analýze jednotlivých frakcí je využíváno mnoho postupů s využitím instrumentálních chromatografických a spektrometrických metod. Často měly všechny navrhované postupy jedno velké omezení, které neumožňovalo identifikovat více analytů v jednom odebraném vzorku. Pokrok v analýze nastal rozdělením vzorku do tří základních frakcí umožňující identifikaci olejů, pryskyřic a bílkovin v jediném odebraném vzorku. Takový postup pak umožňuje ve velmi heterogenním systému obrazu lépe zachytit složení a zmenšuje potřebné množství vzorku k analýze.

Cílem diplomové práce je optimalizovat stávající metodu pro analýzu pryskyřic, sacharidů a olejů, kde by zajištění optimálních podmínek napomohlo k urychlení doposud zdlouhavé analýzy. Bílkoviny musely být z celkové optimalizace vynechány z důvodu dlouhé doby předúpravy vzorku, kterou lze významně zkrátit, pokud budou bílkoviny analyzovány zvlášť. Pro získání kvalitativních údajů z několika získaných frakcí malby, byly k dispozici následující metody: pyrolyzní plynová chromatografie, kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí, plynová chromatografie s hmotností detekcí a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s odpařovacím detektorem rozptylu světla (ELSD). Na instrumentu zvoleném jako optimální byl změřen i reálný vzorek nátěru získaného ze vzácného portugalského sousoší. K optimalizaci byly pořízeny standardy monosacharidů, methylesterů mastných kyselin (FAME mix 37) a dále damarová pryskyřice, kopálová pryskyřice, arabská klovatina, třešňová klovatina, kliš a slepičí vejíčko. Standardy byly zvoleny podle nejčastěji se vyskytujících materiálů v nástěnných malbách. Úkolem analýzy vzorku bylo určení použitého pojidla popřípadě jiných komponentů.

1. Teoretický úvod

Extrakce je dělicí metoda, při které přechází složka z analyzovaného vzorku (pevného, kapalného či plynného) do extrakční fáze. Principem je rozdělení analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze podle rozdělovacího koeficientu daného analytu. Metoda se vyznačuje jednoduchostí, rychlostí a často i účinností. Extrakce lze rozdělit podle mnoha kritérií, přičemž základní dělení je podle druhu použitých fází. Například extrakci vodného vzorku organickým rozpouštědlem lze pospat pro vybraný analyt Nernstovým rozdělovacím zákonem, který lze zapsat v této formě:

$$E = \frac{100 \cdot D_c}{D_c + \frac{V_{aq}}{V_{org}}}$$

kde E je procentuální výtěžek extrakce analytu, D_c je rozdělovací poměr analytu mezi obě fáze, V_{aq} je objem vodné fáze (vzorku) a V_{org} je objem extrakčního rozpouštědla (podrobnou teorii extrakce lze nalézt v učebnicích fyzikální či analytické chemie). [6]

Extrakce je rovněž nenahraditelnou metodou pro separaci látek a směsí, které jsou součástí historicky cenných objektů a uměleckých děl, např. maleb, soch apod. Z důvodů veliké komplexnosti chemického složení uměleckých děl je často nezbytné provést základní frakcionaci komponent do jednotlivých skupin se stejnými strukturálními nebo chemickými vlastnostmi, které mohou být dále snáze podrobněji analyzovány. Z obecného hlediska jsou všechna umělecká díla pouze kompozity složené z anorganických látek, sacharidů, lipidů, pryskyřic, vosků a bílkovin. Pro jejich důkladnou analýzu jsou zapotřebí dělicí, nejčastěji extrakční, metody, používané k frakcionaci uvedených skupin. Podle účelu, způsobu a cílů analýzy je zapotřebí příslušnou extrakční metodu náležitě navrhnout, vyzkoušet a optimalizovat. Dále jsou podrobněji uvedeny některé již publikované metody, které jsou výchozím bodem pro tuto práci.

Pro získání lipidové, pryskyřičné a sacharidové frakce, byla podle permitivity určena nejvhodnější rozpouštědla, kde pryskyřičná a lipidová frakce má podobnou permitivitu a tím i rozpouštědlo. Z tohoto důvodu je vhodnější analyzovat pryskyřice a lipidy dohromady. Obdobné separace bylo využito i v literatuře [16], která je níže důkladněji popsána.

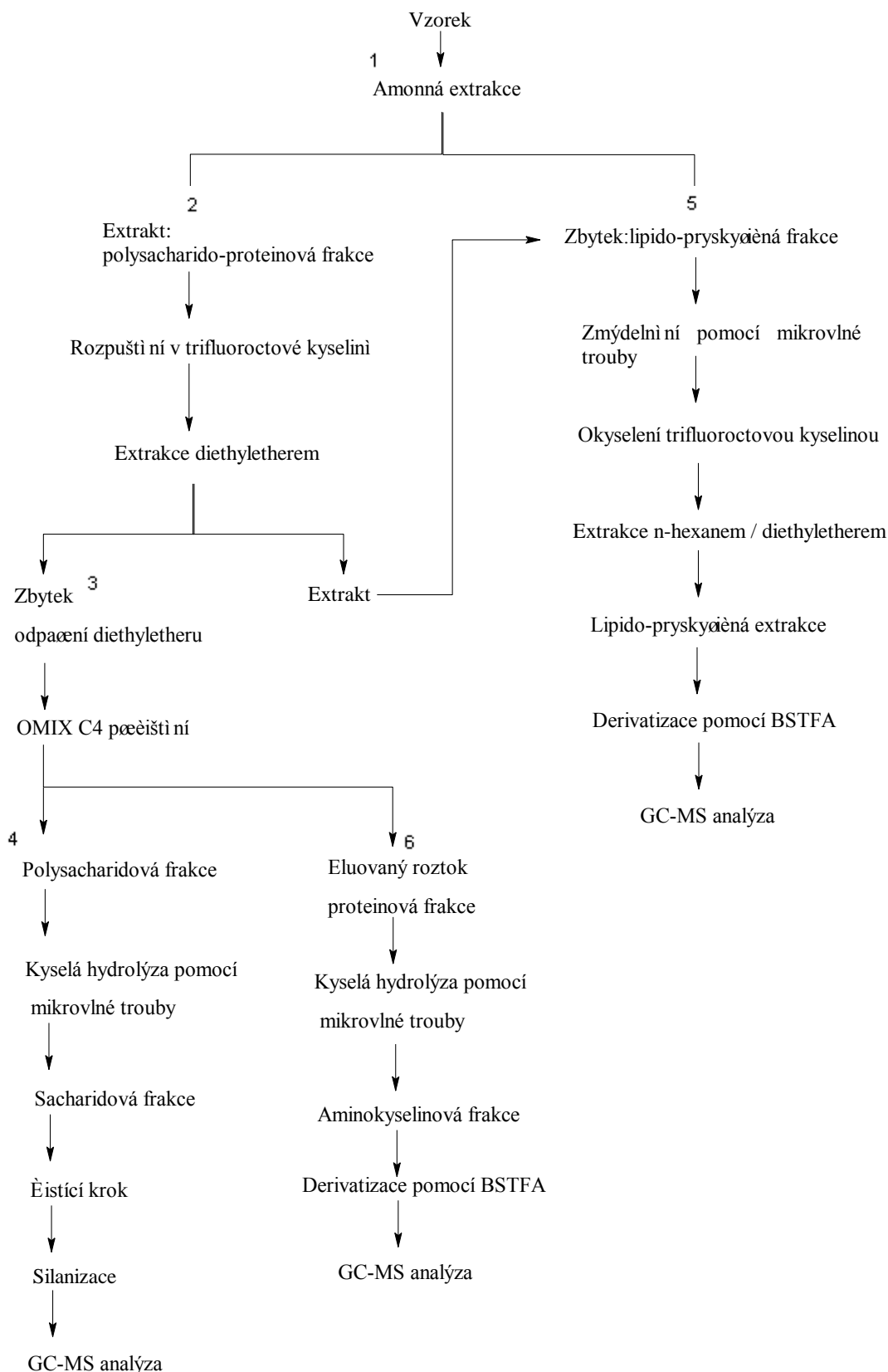


Schéma 1 Postup pro GC-MS analýzu historických maleb.

1. V prvním kroku byl vzorek navážen do skleněné vialky a převrstven amonným roztokem (2,5 mol/l; 200-400 µl). Takto připravený vzorek byl zahříván na 60°C v ultrazvukové lázni po dobu 2 hodin. Následně byla odebrána amonná část do jiné vialky jako polysacharidová-proteinová frakce. Vialka s nerozpuštěnými částicemi byla označena jako lipido-pryskyřičná frakce.

2. Amonný roztok byl odpařen pod proudem dusíku a následně rozpuštěn v 1% trifluoroctové kyselině (100 µl). Po promíchání byl vzorek třikrát extrahován pomocí diethyletheru, kde nepolární část byla převedena do skleněné vialky s lipido-pryskyřičnou frakcí.

3. Polární vyextrahovaná část byla zbavena zbytku diethyletheru proudem dusíku a následně přečišťována SPE kolonkou Omix C4, která byla promyta 0,1 % trifluoroctovou kyselinou. Jako eluční roztok byla použita směs kyseliny mravenčí (0,1 %), metanolu (75 %) a vody (25 %).

4. Promývací roztok byl smíchán dohromady a odpařen pod proudem dusíku. Následně bylo k roztoku pipetováno 0,5 ml trifluoroctové kyseliny (2 mol/l). Kyselá hydrolyza probíhala při 120°C po dobu 20 minut. Po kyselé hydrolyze byl roztok filtrován pomocí membrány a vysušen vakuovou odparkou. K rozpuštění byl použit přídavek (100 µl) destilované vody. Z roztoku byla separována sacharidová frakce na zeolitové pryskyřici v 0,5 cm skleněné kolonce. Sacharidová složka byla eluována destilovanou vodou (2 ml), která byla následně odpařena proudem dusíku a derivatizována ve třech krocích. Prvním derivatizačním krokem byl přídavek 25 µl ethanthiolu s trifluoroctovou kyselinou v poměru 2:1. Směs byla udržována 10 minut při laboratorní teplotě s občasným promícháním. Druhým derivatizačním krokem byla silanizace BSTFA činidlem (100 µl) a zahřívání na 60°C po dobu 15 minut. Po druhém derivatizačním kroku byl vzorek odpařen a opět rozpuštěn v 50 µl BSTFA s příměsí jednoho procenta trimethylchlorsilanu a 100 µl pyridinu. Třetí derivatizační krok byl ukončen udržováním reakce při 60°C po dobu 45 minut. Roztok byl závěrem odpařen pod proudem dusíku a rozpuštěn pomocí 50 µl hexanu, který byl dávkován na kolonu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Výsledek analyzované polysacharidové frakce vystihuje především možnosti po užitího tragantu, škrobu nebo klovatiny, které se nejčastěji vyskytují v temperách nebo v různých vrstvách maleb jako pojídlo.

5. Nepolární lipido-pryskyřičná frakce byla odpařena a následně zmýdelněna 300 µl ethanólatem draselným (10 %) a zahřívána na 60°C po dobu 120 minut. Reakce byla zastavena naředěním destilovanou vodou na dvojnásobný objem a okyselená

trifluoroctovou kyselinou (1:1). Následně byl vzorek extrahován třikrát hexanem a diethyletherem vždy po 200 μ l. Výsledný roztok byl odpařen proudem dusíku a znovu rozpuštěn ve směsi acetonu a hexanu (1:1). K roztoku bylo pipetováno 5 μ l tridekanové kyseliny (IS) a poté byl odpařen proudem dusíku. Posledním krokem byla derivatizace přidávkem 20 μ l BSTFA a 200 μ l isooktanolu při 60°C. Po 30 minutách zahřívání byl vzorek zchlazen a zalit 5 μ l hexadekanem. Isooktanový roztok byl dávkován na kolonu a analyzován plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Výsledek analyzované lipido-pryskyřičné frakce vystihuje použité pryskyřice a oleje, které jsou zastoupené v hojné míře v celé struktuře nátěru vytvořeného vrstevnatou technikou.

6. Eluovaný roztok odpařený pod proudem dusíku byl kyselě hydrolyzován přidávkem 30 μ l kyseliny chlorovodíkové (6 mol/l). Hydrolyza byla provedena v mikrovlnné troubě nastavené na 250 W po dobu 40 minut a ukončena přidávkem destilované vody (200-400 μ l). Aminokyselinová frakce s 10 μ l hexadekanem byla odpařena pod proudem dusíku a následně byla derivatizována 20 μ l MTBSTFA s 40 μ l pyridinu a 2 μ l triethylaminem při 60°C. Po 30 minutách byl roztok odpařen, rozpuštěn hexanem (200 μ l) a použit k analýze na plynové chromatografii s hmotnostní detekcí [3]. Výsledek analyzované amino- kyselinové frakce vystihuje použití kaseinu, albuminu, bílku, klišu a želatiny, které se nejvíce vyskytují ve spojovací mezivrstvě a podkladu.

1.1. Struktura malby a její složení

Pro lepší pochopení celé problematiky chemické analýzy uměleckých maleb je zapotřebí být obeznámen jednak s obecnou strukturou malby, tak i s použitými materiály. Ze znalosti struktury a materiálů lze tak snáze odhadnout obtíže, které musí analytik překonat. Obecně se každá malba skládá z různých vrstev, které mají svoje nezastupitelné role. Každá vrstva má zvláštní význam ať pro celkové cítění obrazu nebo z důvodů izolace mezi jednotlivými vrstvami. Sled jednotlivých vrstev a jejich obsahové látky jsou následující.

Podložka – spojovací mezivrstva – podklad – izolace – podmalba – imprimatura – malba – tónovací lazura – vrchní vrstva

Na připravenou podložku je nanášena jedna vrstva po druhé a nechávají se postupně zaschnout, aby bylo zabráněno sesuvu zaschlé vrstvy po nezaschlé vrstvě (krakelování).

Spojovací mezivrstva dle techniky může obsahovat kliš, želatinu nebo pryskyřičný lak, které slouží k lepší přilnavosti a izolaci mezi podložkou a podkladem. Brání tím i

popraskání dalších nanášených vrstev [2]. Podklad se dělí dle použitého pojidla na olejový, poloolejový a klišový. Je první vrstvou, která dodává homogenitu, stejnou hrubost, odstín, savost a hustotu po celé ploše malby. Občas bývá podklad obohacen bílým pigmentem, například sádrou, křídou, barytem, olovnatou bělobou, zinkovou bělobou, uhličitanem hořečnatým, kaolinem nebo bílou hlinkou. Mezi používaná pojidla patří škrob, pšeničná mouka, kliš, želatina, kasein, vejce, vysychavé oleje nebo pryskyřice [1]. Na připravený podklad je nanášena izolace, která izoluje podklad od podmalby a zabraňuje tím nežádoucím interakcím. U olejomalb jsou využívány olejopryskyřičné laky, především damarový a kopálový. Pro ostatní malby se využívá klišové nebo želatinové izolace [3]. Další vrstvou je imprimatura, tenká olejová vrstva, která barevně tónuje celý obraz. Pro klišovou nebo disperzní imprimaturu je přidávána trocha práškového pigmentu nebo temperové barvy do želatinové vody, nebo zředěné disperze. U olejopryskyřičné imprimatury se jedná o směs damarového laku s malým přídavkem olejové barvy [2]. Podmalba je tvořena především pálenou, přírodní nebo bílou ambrou a u olejomalby můžeme nalézt i směsi damarového nebo mastixového laku s olejovou barvou [4]. Následuje vrstva malby, která má až několik vrstev na sobě, kde je vykreslována a dotvořena samotná malba. Nanášeny jsou především pigmenty rozetřené ve vysychavém oleji s příměsí pryskyřic a rozpouštědel. Konečné tónování obrazu se dosahuje alkydovými pryskyřicemi s příměsí olejů, které se nanáší rozpuštěné v organickém rozpouštědle, především lihu [2]. Vrchní vrstva chrání proti vnějším vlivům. Většinou je složení odlišné od jiných vrstev. Příkladem jsou fermežové, akrylové nebo pryskyřičné laky [5].

V rámci diplomové práce byly analyzovány oleje, tuky, pryskyřice a klovatiny, které lze identifikovat ve dvou frakcích lišících se polaritou, získaných z jediného vzorku [3]. Analyzované oleje jsou nejčastěji děleny na živočišné a rostlinné podle původu.

Živočišné tuky obsahují triacyglyceroly s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin. Největší zastoupení zde mají kyselina stearová, olejová a palmitová. Živočišné tuky mají teplotu tání mezi 34 až 36°C, což je způsobeno vysokým obsahem dlouhých nasycených řetězců. Samotné tuky jsou doprovázeny látkami, které jsou v tucích rozpustné. Příkladem mohou být alifatické alkoholy, uhlovodíky, steroidy, vitamíny a barviva. V malířství jsou živočišné oleje zmýdelňovány pro získání glycerínu. Zbylé mýdlo je využíváno na vápenné omítky jako podklad klišové malby, kde reaguje vápno s mýdlem za vzniku vápenatých mýdel, která jsou vhodná pro podklad. Neznamena to ale, že se živočišné tuky nevyužívají k samotnému malování. Jeden z nejrozšířenějších materiálů je vaječný žloutek, který má vysoký obsah tuku. Celé vajíčko nebo jen jeho části

tvorily základ dodnes hojně používaných temper [41,42]. Rostlinné oleje jsou ve složení velice rozmanité. Obsahují triacylglyceroly s vyšším obsahem nenasycených mastných kyselin, které dávají olejům nižší bod tání. Počet dvojných vazeb je klíčový pro jejich využití. Každá dvojná vazba může reagovat s kyslíkovým radikálem, což má za následek polymeraci olejů. Dle počtu dvojných vazeb je dále dělíme na vysychavé, polovysychavé a nevysychavé oleje. Mezi nejvíce využívané patří lněný olej s vysokým obsahem dvojných vazeb. Nevýhodou olejů s vysokým obsahem dvojných vazeb je jejich tmavnutí a nižší viskozita. Z těchto důvodů je nezbytná variabilita olejů. Můžeme se setkat ještě s jedním druhem olejů nazývaným jako éterické (silice). Ty na vzduchu a hlavně na světle postupně pomalu pryskyřičnatí. Jejich základem je isopren, který tvoří základní kámen přítomným terpenům. Vyskytují se ve velkém množství jako alkoholy, aldehydy, ketony a estery. Z přítomných uhlovodíků je důležité zmínit limonen, sabinen, terpinen, pinen, kamfen a fenchon. V malířství jsou využívány hlavně terpentínová silice získaná ze dřeva, která je složena z 98% pinenu. Silice je v praxi nejdříve rozdělena na dvě frakce: těkavou terpentínovou silici a netěkavou kalafunu. Následně se využívá terpentínová frakce jako rozpouštědlo. Charakterem je řadíme mezi pomalu schnoucí oleje, které jsou využívány především k zabránění schnutí obrazů před dokončení malby. Principem je reakce se stejným radikálem jako u dvojných vazeb mastných kyselin [40].

Balzámy jsou přechodným stádiem mezi silicemi a pryskyřicemi. Svým obsahem látek jsou podobné částečně silicím a částečně pryskyřicím. Známým zástupcem je například kopaiva obsahující 50-90% silic a 10-40% pryskyřic, která se využívá k výrobě fermeží.

Dalším příkladem jsou balzámy benátský, štrasburský, kanadský a další [2].

Po odpaření rozpouštědla z balzámů a případnou polymerací vznikají pryskyřice. Pryskyřice jsou rostlinného původu, výjimku tvoří pouze šelak, který vzniká přetvářením mízy stromu červcem lakovým. Obsahují různé alkoholy, kyseliny, estery terpenů i aromátů, které jsou doprovázeny cukry, barvivy, glykosidy a alkaloidy. Hlavní složky jsou děleny na mono-, di-, tri- a sesquiterpenoidy. Postupně mají 10, 15, 20 a 30 atomů uhlíku v molekule. Mono- a sesquiterpenoidy jsou za normální teploty kapalné a slouží jako rozpouštědla pro di- a triterpenoidy. Mono- a sesquiterpeny se vyskytují společně, ale di- a triterpenoidy se nikdy společně nevyskytují. Terpenové alkoholy jsou nazývány resinoly, fenoly terpenové resinotannoly a pryskyřičné estery resiny [44].

Podobným materiálem jsou přírodní klovatiny získávané podobným způsobem jako při sběru pryskyřic. Liší se však od nich svým chemickým složením. Jedná se o komplikované polysacharidy znečištěné bílkovinami, fenolickými látkami, glykosidy a jim podobnými

látkami. V malířské praxi jsou využívány především arabské klovatiny, tragantu a klovatiny ovocných stromů. Jednotlivé klovatiny se liší rozmanitostí monosacharidových složek. Nejčastěji se můžeme setkat s L-arabinosou, D-xylosou, D-ribosou, D-glukosou, D-mannosou, D-galaktosou, L-fukósou, L-ramnosou, D-fruktosou a manitolem. Z těchto důvodů jsou využívány v čisté formě jako standardy pro analýzu těchto látek. Významnou vlastností přírodních klovatin je, že zůstávají rozpustné ve vodě i po dlouhém časovém období. Dříve byly využívány především jako pojivo vodových barev [18].

1.2. Matrice

Vzorek malby obsahuje i látky, které nejsou cílem identifikace. Patří mezi ně sikaiva, pigmenty, podložka, bílkoviny, rozpouštědla, pojiva a vosky. Svou přítomností komplikují předúpravu vzorku a identifikaci vybraných složek malby. Pro komponenty jednotlivých matričních složek bylo nezbytné začlenit některé kroky v předúpravě vzorku. Sikaiva jsou nezbytnou součástí každé malby, která obsahuje oleje nebo alkydové pryskyřice. Jejich funkcí je katalytické urychlení oxidace dvojných vazeb olejů. Kobaltové a manganové soli způsobují především zasychání na povrchu. Soli zirkonia, vápníku a zinku jsou využívány především jako pomocná sušidla pro rovnoměrné zakalení olejového filmu. Olovo je navzdory jeho jedovatosti a možnosti náhrady stále využívá jako pomocné sušidlo [8, 9]. Pigmenty existují organické nebo anorganické, které jsou následně děleny na přírodní nebo syntetické. Mezi přírodní anorganické pigmenty řadíme různé druhy hlinek například okry, sieny a umbry. Dále i látky minerálního původu, jako je sádrovec, těživec, křída, kaolín a další. Většina přírodních pigmentů je dnes nahrazeno umělými. Například:

Chrom – Žluté a zelené pigmenty, chromová žlut' (PbCrO_4), chromoxid tupý (Cr_2O_3), chromoxid ohnivý ($\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Kobalt – Kobaltová modř ($\text{CoO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$), kobalt fialový ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Cölinova modř

Železo – Pařížská modř, různé druhy hlinek obsahující oxid železitý

Zinek – Zinková běloba (ZnO) a zinková žlut' (ZnCrO_4)

Kadmium – Sulfid kademnatý (CdS) s přísádkem selenidu kademnatého (CdSe) vytváří nejrůznější odstíny žluté, červené a oranžové

Uhlík – Rozeznáváme čern' kostní, révovou nebo lampovou

Titan – Běloba titanová (TiO_2)

Olovo – Běloba kremžská ($\text{Pb}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$), neapolská žlut' ($\text{Pb}_2\text{Sb}_2\text{O}_7$)

Rtuť – Rumělka červená (HgS)

Z organických přírodních pigmentů známe například šafránovou žlut' (z květů šafránu), brazilský purpur (z barevných dřev), karmín (z nachových mšic) nebo dračí krev (z Dračince rumělkového) [10]. Identifikace zmíněných pigmentů je prováděno často metodou „*fiber optics diffuse reflectance spectroscopy*“ (FORS), která je přímo určena na analýzu malířských děl. Principem jsou dvě optická vlákna zaměřená na malbu, kde jedno vlákno poskytuje zdroj polychromatického záření a druhé vlákno odvádí odraz nepohlčeného záření do detektoru. Mezi další použitelné techniky můžeme zařadit skenovací elektronovou mikroskopii s energeticky disperzním rentgenovým analyzátozem nebo mikro-ramanovu spektrometrii [43]. Organické syntetické pigmenty lze rozdělit do tříd na monoazo pigmenty zastoupené arylidem kyseliny acetocetové (Hanušova žlutá), β -naftolem, naftolem AS (3-Hydroxy-2-naftanilid) a benzimidazolnem. Třída diazo pigmentů získané z diazo kondenzace jako diarylidy, bisacetoacetarylidy nebo pyrazolon. Mezi další azo pigmenty patří azomethin kovové komplexy. U polycyklických pigmentů jako jsou ftalocyaniny, diketopyrrolo-pyrroly, peryleny a perinony, chinakridony, isoindolinony, polykarbocyklické antrachinony a dioxaniny se azo skupina nevyskytuje [11]. V případě podložky jako další součásti matrice se může jednat o dřevo, papír nebo nejrůznější druhy tkaniny. Podložky se skládají především ze sacharidů, mastných kyselin, terpenových kyselin a jiných skupin látek. Od začátku 16. století se začaly používat převážně tkané podklady, jejichž strukturou je celulózový polymer obsahující dále hemi-celulózu, pektin, lignin a vosky. Lze tedy předpokládat ovlivnění identifikace jednotlivých komponentů obrazu [12]. Mezi proteinová pojiva nacházející se v obrazech patří zvířecí kliš, vejce, mléko nebo kasein. Obtížnost identifikace proteinů je stupňovaná v důsledku přítomnosti anorganických látek ve velmi vysoké koncentraci. Pigmenty mohou reagovat s médiem zejména prostřednictvím tvorby silných komplexů. Například ionty mědi v pigmentech, jako je azurit, mají velkou afinitu k aminokyselinám. Ostatní ionty kovů, včetně rtuťnatých, železitých, nikelnatých, vápenatých a hořečnatých, mohou působit stejným způsobem jako ionty mědi. Každá aminokyselina se liší svou afinitou k danému kovu, z těchto důvodů budou proteiny podrobené stárnutí reagovat odlišně. Analýza komplexů, volných aminokyselin nebo dlouhých peptidových řetězců, by při analýze vybraných složek komplikovala předúpravu vzorků [13]. Hlavní zástupce bílkovin je vaječný bílek a žloutek, které jsou svým složením značně rozdílné. Vaječný bílek je bohatý především na bílkoviny, narozdíl od žloutku, který obsahuje tukovou část. V malířství jsou využívány jak jednotlivé části zvlášť, tak i celé vajíčko. Z bílkovin jsou nejznámější ovoalbumin, ovotransferin, ovomukoid a mnoho dalších. Identifikaci lze provést pomocí

poměrů mastných kyselin, které jsou uvedeny v tabulce 8 [17,31]. Doprovodnou látkou zmíněných vaječných bílkovin jsou i tenzidy, které se vyskytují v používaných pojivech stejně jako i v některých éterických olejích. Tenzidy neboli povrchově aktivní látky zvyšují antimikrobiální efekt a solubilizaci, ale zhoršují viditelnost fázového rozhraní při extrakci rozpouštědlem [34]. Mezi pojivové materiály řadíme také kliš a želatinu, které jsou přírodním lepidlem vyráběným ze zbytků hospodářských zvířat. Podstatou jsou bílkoviny rozpuštěné ve vodě, které tvoří v případě klišu koloidní roztok. V umělecké tvorbě byl nejrozšířenější zaječí kliš, jehož přibližné složení je následující : glycin (17 %), valin (1 %), serin (3 %), asparagin (4 %), prolin (20 %), hydroxyprolin (22 %), glutamin (18 %) a fenylalanin (14 %).

Hlavní složkou lepidla je glutin získaný částečnou hydrolyzou kolagenu v živočišných tkáních. V klišu jsou často obsaženy, na rozdíl od želatiny, ještě další vedlejší produkty po štěpení kolagenu. Proces výroby želatiny je mírnější než u klišu, a narušovány jsou jen nad molekulární vazby v kolagenu. Hlavní řetězce v molekulách se příliš nemění, proto je želatina průhledná na rozdíl od klišu, který je zakalený. Ve studené vodě oba pouze bobtnají, po zahřátí na 35 °C se rozpouští a tvoří viskózní roztoky, při ochlazení přechází reverzibilně v gel. Při nadměrném zahřátí nad 55 °C klesá viskozita a molekulová hmotnost, a tím jsou zhoršovány pojivové vlastnosti. Štěpení je urychlováno působením kyselin nebo alkálií. Natřený film je poměrně elastický a lze jej dále plastifikovat přidáním změkčovadel. Dále jsou také aplikovány látky jako kamenec, formaldehyd nebo chromany zabraňující bobtnání [7].

Rozpouštědla jsou dělena především dle polaritativy a teploty varu. I když mezi nejznámější jsou řazeny lihová a terpentýnová rozpouštědla, existuje i celá řada uhlovodíkových rozpouštědel (chlorované, hydrogenované, éterické, estery a mnoho dalších). Ideální jsou rozpouštědla, která mají bod varu mezi 140-180°C z důvodu, že jsou zcela odpařeny. Rozpouštědla jako benzín nebo petrolej s vyšším bodem varu zůstávají v malbě a zvyšují její pružnost. Používaná rozpouštědla jsou velmi variabilní, a proto komplikují identifikaci olejů a pryskyřic, s nimiž mohou koeluovat [2]. Ve stejné frakci můžeme očekávat i vosky, jejichž struktura je velmi podobná olejům nebo tukům. Popisovány jsou jako dlouhé alkoholy vázané esterovou vazbou s mastnými kyselinami, mezi nimiž často převládá palmitová kyselina. Mastné kyseliny dosahují délky C16 - C50 uhlíků, a proto se bod tání pohybuje až okolo 70°C. Samotný bod tání má vliv na použití v malířství, kde jsou využívány především v enkaustice nebo pro výrobu vosko-klišových temper. Mezi nejznámější živočišné vosky patří včelí, lanolinový, karnaubský a spermacet z vorvaně. Z

rostlinných vosků je vhodné jmenovat japonský vosk získávaný z plodů lakového stromu. Doprovodné látky vosků bývají rozdílné a často i neznámé. Pro jejich identifikaci jsou často voleny metody „finger print“, která je schopna vosky identifikovat [14].

1.3. Komponenty vzniklé degradací

V historických uměleckých dílech se často vyskytují látky vzniklé z chemické nebo mikrobiální degradace. Postupné štěpení a přeměna na jiné komponenty, které mají jiné chemické a fyzikální vlastnosti než původní sloučeniny, komplikují tak identifikaci původních složek. Tyto degradační procesy se mohou projevovat praskáním, bobtnáním, odlupováním, ztrátou intenzity barvy a podobně. Identifikace původních složek obrazu ze zoxidovaných a částečně degradovaných analytů, je založena na znalostech degradačních mechanismů [18]. Degradace olejů patří mezi nejrychlejší znehodnocení malby, kterou způsobuje vzdušná vlhkost a kyslík, kdy molekula vody napadá esterovou vazbu mezi mastnými kyselinami a glycerolem. Vznikající karboxylové a alkoholové skupiny mohou poskytovat další možnosti degradace zvyšováním polaritu. Kyslík napadá převážně příčné peroxidové vazby mezi mastnými kyselinami. Vznikají tak v první fázi hydroperoxydy, které jsou dále štěpeny světlem na alkoxylové a hydroxylové radikály. Ty mohou napadat dvojnásobné vazby a opět zvyšovat polaritu. Mohou také vznikat chromogeny (1,3-ketony nebo konjugované sloučeniny s karbonylovou skupinou), které dávají klasické nažloutlé až hnědé zbarvení [19]. Proces stárnutí a degradace pryskyřic používaných v malířství nebyl doposud dostatečně pochopen. Přestože bylo dosaženo pokroku týkajícího se cesty procesu stárnutí, doposud zůstávají otevřené otázky rozdílné oxidace na světle a ve tmě, nebo žloutnutí vlivem oxidace. U zestárlých vzorků bylo zjištěno pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací zjištěny změny z vibrací dvojnásobných vazeb mezi uhlíky na vibraci jednoduché vazby. Dále také vibrace mezi uhlíkem a vodíkem v aromatickém kruhu byly změněny na vibraci alkoholové skupiny. Příklad oxidačních produktů a původní složení damarové pryskyřice jsou v následující tabulce 1.

Tabulka 1 Srovnání kvalitativního složení některých látek obsažených v původní a uměle oxidované damarové pryskyřici [20].

Základní složky damarové pryskyřice	
Původní složení	Zoxidované složení
Dammara-20,24-dien-3-on	Hexakis nor-dammaran-3,20-dion
nor- β -Amyron	20,24-epoxy-25-hydroxy-3,4-seco-4(28)-Dammaren-3-ová kyselina*
Dammaradienol	3,4-seco-2-carboxy-25,26,27-trisnor-4(28)-Dammareno-24,20-lakton*
nor- α -Amyron	20,24-epoxy-25-hydroxy-dammaran-3-on
Dammarenolová kyselina*	20,24-epoxy-25-hydroxy-dammaran-3-ol
α -amyrin	3-oxo-25,26,27-trisnordammarano-24,20-lakton
Oleanonová kyselina*	17-hydroxy-11-oxo-nor- β -amyron
Hydroxydammarenon	11-oxo-oleanonová kyselina*
Aldehyd oleanonové kyseliny	17-hydroxy-11-oxo-nor- α -amyron
Dammarenediol	11-oxo-ursonová kyselina*
Ursonová kyselina*	
Aldehyd ursonovové kyseliny	
Hydroxyhopanon	

* Látky, které byly methylovány v rámci analýzy.

K dalším přeměnám látek může docházet biodegradací, u které se opět můžeme setkat se vznikem hydroxylových a karboxylových skupin.

Přítomné monosacharidy z degradovaných klovatin nejčastěji potká osud enzymatického štěpení a využití energie ve prospěch bakterií, plísní nebo živočichů. Klovatiny vytékající z gumovníků jsou obohaceny o fenolické látky, deriváty cukrů a jiné látky, které mají působit antioxidačně a antimikrobiálně. Příkladem může být chitosan a chito oligosacharidy s prokázanými antimikrobiálními účinky. S přítomnými látkami v rostlinné klovatině je degradace zpomalena, a i přes široké použití klovatin a jejich historické využití, není doposud znám způsob rozkladu těchto látek [21]. Další postup v degradaci mohou sacharidy způsobit za účasti přítomných bílkovin, které spolu reagují pomocí Maillardových reakcí. Reakce jsou iniciovány neenzymatickou kondenzací redukujícího

cukru a aminu za vzniku nestabilní Schiffovy báze, která podléhá přesmyku až na výsledný Amadoriho (aldosy) nebo Heynsovův (ketosy) produkt. Amadoriho produkt se může nevratně oxidovat na N-karboxymethylalkylamin nebo dojde k jeho rozkladu na původní amin a 1-, 3-, nebo 4-deoxyglukoson. Při vyšším pH Amadoriho produkty enolyzují mezi druhým a třetím uhlíkem a eliminují amin z prvního uhlíku za vzniku 1-deoxyglukosonu. Při nižším pH ketoaminy přesmykují a enolyzují v pozici mezi prvním a druhým uhlíkem za vzniku 3-deoxyglukosonů. Deoxyglukosony jsou velmi reaktivní sloučeniny, které opět reagují s volnou aminoskupinou. Maillardovy reakce tak způsobují nenávratné molekulární změny [15].

1.4. Analýza vybraných složek

Oleje

Oleje jsou identifikovány na základě poměrů jednotlivých mastných kyselin vztažených nejčastěji na palmitovou nebo olejovou kyselinu. Mezi vhodné metody pro separaci řadíme izotachofórezu, plynovou chromatografii a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Izotachofóreza je vhodná pouze pro kratší mastné kyseliny. Důvodem omezeného využití je především rozpustnost delších mastných kyselin v methanolu. Plynová chromatografie, hojně využívaná komerčními laboratořemi, vyžaduje pro zplynění a následnou separaci jednoduchou derivatizaci narozdíl od vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která derivatizaci nevyžaduje. Samotnou detekci lze zajistit plamenově ionizačním detektorem, hmotnostním spektrometrem, spektrofotometrem, odpařovacím detektorem rozptylu světla a dalšími.

Tabulka 2 Poměry hlavních mastných kyselin u nejpoužívanějších olejů.

Oleje	C18:1/C16	C18/C16
Lněný	0.18	0.62
Makový	0.06	0.22
Ořechový	2.21	0.28
Saflorový	2.57	0.36
Tungový	2.83	0.72

[33, 35-38]

Pryskyřice

Nejvhodnějším způsobem identifikace pryskyřic ve vzorku je určení kyseliny specifické pro příslušnou pryskyřici nesoucí přímo její název (např. damarová pryskyřice - damarová kyselina). Samotné pryskyřice jsou často separovány pomocí plynové a pyrolyzní plynové chromatografie a kapalinové chromatografie (fénolické pryskyřice). Z dalších lze využít MALDI-TOF metodou „finger print“, dielektrometrie, ramanovy spektroskopie, skenovací kalorimetrie, a mnoho dalších. Polymerní struktura pryskyřic vyžaduje u většiny metod rozrušení struktury pomocí kyselin nebo zásad a následnou derivatizaci. Detekce je zajištěna obdobnými detektory jako pro analýzu olejů. [25, 32]

Klovatina

Klovatiny jsou identifikovány na základě zastoupení jednotlivých sacharidů. Stejně jako u pryskyřic je nezbytné strukturu rozrušit pomocí kyseliny nebo zásady. Následně jsou sacharidy separovány nejčastěji pomocí kapalinové chromatografie, plynové chromatografie, elektroforeticky, HPSEC a dalšími. Detekce je zajištěna nejčastěji hmotnostní spektrometrií, refraktometricky, pulzní ampérometrickou detekcí, MALDI-TOF, ELSD nebo po následné derivatizaci spektrofotometricky v ultrafialové oblasti.

Tabulka 3 Relativní složení nejpoužívanějších klovatin [%]

Monosacharidy	Arabská klovatina	Tragant	Třešňová klovatina	Švestková klovatina	Broskvová klovatina
Kys. glukuronová	7,0	3,5	13,0	13,0	14,0
Kys. galakturonová	-	13,8	-	-	-
Arabinosa	37,2	34,7	35,1	36,0	34,0
Galaktosa	44,7	10,8	37,0	36,0	38,0
Rhamnosa	11,2	3,4	2,8	2,8	2,8
Xylosa	-	14,9	6,6	6,9	6,1
Manosa	-	-	5,5	5,3	5,1
Fukosa	-	7,4	-	-	-
Glukosa	-	11,5	-	-	-

[23]

1.5. Derivatizace

Oleje a pryskyřice

Principem derivatizace je převedení stanovovaného analytu na jeho derivát, který se lépe separuje nebo deteguje. V případě plynové chromatografie jde o převedení na lépe zplynitelné, případně termolabilní na termostabilní, a vůbec nejčastěji o převedení polárních látek na méně polární. Podstatnou složkou olejů a pryskyřic jsou mastné kyseliny, které je nutné převést do těkavé formy. Prvním krokem derivatizace bývá kyselá hydrolyza způsobující rozrušení matrice nebo polymerní struktury. Následně se mohou nepolární látky extrahovat například diethyletherem nebo hexanem. K odpařené nepolární frakci je přidáván methanolát sodný, který v nevodném methanolickém roztoku reaguje transesterifikací s esterovými vazbami. Pro posunutí rovnováhy ve prospěch methylesterů kyselin, bývá směs často obohacena o druhé derivatizační činidlo reagující s volnými karboxylovými kyselinami. Příkladem může být například methyl-chlormravenčnan nebo tetramethylamonium hydroxid. Celá směs se na závěr vyextrahuje několikrát do rozpouštědla, poté jsou frakce spojeny a připraveny pro analýzu methylesterů mastných kyselin [22].

Klovatina

Monosacharidy jsou derivatizovány především pomocí přítomných hydroxylových skupin na methylethery, acetáty, trifluorované acetáty nebo trimethylsilyl éthery. V případě silanyzace jsou využívány trimethylchlorsilany nebo směs hexamethyldisilazanu trimethylchlorsilanu a pyridinu jako rozpouštědla. Dále lze také použít N-trimethylsilylimidazol, N-methyl-N-trimethylsilylacetamid, N-trimethylsilyldiethylamine, N-trimethylsilyldimethyl-amine, N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide, N,O-bis(trimethylsilyl) acetamid a N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid [23, 26].

1.6. Optimalizace

Obecně existují dva přístupy optimalizace. Při optimalizaci metodou „*one-factor-at-time*” (OFAT) se vždy optimalizuje jeden experimentální parametr postupu po druhém, kde vzájemné interakce mezi jednotlivými experimentálními parametry nejsou zahrnuté do optimalizace. Druhou nevýhodou OFAT metody je potřeba více analýz k optimalizaci.

U chemometrických metod (např. metody odezvové plochy, response surface method) je pomocí softwaru navržený postup optimalizace, při kterém je měněno více parametrů

najednou. Tímto postupem jsou snižovány počty nezbytných experimentů. Metoda rovněž umožňuje zkoumat vzájemné interakce zvolených parametrů a optimální nastavení celého postupu. Podrobnou teorii lze vyhledat v odborné literatuře [45].

Prvním bodem optimalizace byl výběr vhodného instrumentu, následně teplotní program a jako poslední předúprava vzorku. Mezi vyzkoušené instrumenty patřila kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí a detekcí odpařovacího rozptylu světla, plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a pyrolyzní plynová chromatografie. Předúprava vzorku byla převzata z článku [3] a optimalizována vyloučením kroků potřebných k separaci aminokyselin. Následné další změny byly vyvolány především potřebou snížení doby předúpravy vzorku.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Tabulka 4 Použité chemikálie

Látka	Výrobce	Čistota [%]
Trifluoroctová kyselina	Sigma-Aldrich	99
Diethylether	Fluka	>99
Hexan	Sigma-Aldrich	>97
Chloroform	Penta	>99
Methanol	Penta	Čistota pro HPLC
Fluorid boritý	Sigma-Aldrich	>99
Hydroxid sodný	Penta	-
Chlorid sodný	Penta	-
Amoniakální roztok 25%	Merck	Neznámé
Trimethylchlorsilan	Fluka	>99
Hexamethyldisilazan	Sigma-Aldrich	>99
Pyridin	Sigma-Aldrich	>99
Arabiosa	Sigma-Aldrich	>98
Xylosa	Sigma-Aldrich	>99
Ribosa	Sigma-Aldrich	>99
Glukosa	Sigma-Aldrich	>99
Mannosa	Sigma-Aldrich	>99
Galaktosa	Sigma-Aldrich	>99

Níže uvedené umělecké materiály byly dodány firmou Manahuna zakoupené v potřebách pro restaurátorské účely : třešňová klovatina, zaječí klich, kopál, damara

Roztoky

Methanolát sodný byl připraven rozpuštěním 2 g hydroxidu sodného ve 100 ml methanolu.

Zasobní roztok FAME mix 37 neat byl připraven rozpuštěním 10 mg standardu ve 100 ml hexanu.

2.2. Přístroje a zařízení

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Separace byla provedena na kapalinovém chromatogramu HPLC 1200 series vybaveným autosamplerm (Agilent). K separaci sacharidové frakce byla zvolena HPLC kolona YMC-Triart diol-HILIC (3 μm , 150 x 2,0 mm, Agilent). Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a destilované vody (75:25). Separace základních standardů monosacharidů probíhala při průtoku 2 ml/min s hmotnostní detekcí v módu scan v rozsahu 160-800 m/z (ESI 2 kV s napětím na kapiláře 3,2 kV). Po následné přípravě komplexnějších látek musela být z důvodu přítomnosti sikativ změněna detekce z hmotnostní spektrometrie na odpařovací detektor rozptylu světla (Alltech 3300), který byl provozován při 38°C a průtoku dusíku 1,5 l/min. Podmínky byly upraveny na celkový průtok 0,2 ml/min mobilní fáze s izokratickou elucí acetonitril : voda (90:10).

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Separace byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010+ vybaveným autosamplerm AOC-20i (Schimadzu, Japan). K separaci byla použita kolona DB-23 ((50%-kyanopropyl)-methylpolysiloxan, Agilent) vhodná pro separaci methylesterů mastných kyselin. Po celou dobu probíhala analýza za konstantního průtoku helia 0,4 ml/min (99,999%, Linde). Teplotní program začínal na 50°C po dobu 3 minut, následně s krokem 25°C/min stoupala teplota až na 175°C/min, dále se zvyšovala teplota s krokem 4°C/min až na teplotu 230°C, která byla udržována 5 minut. Pro zjištění retenčních časů methylesterů mastných kyselin byl využit komerčně dostupný standard FAME Mix 37 Supelco neat, kterým byla ověřena linearita, opakovatelnost a robustnost měření. Všechna měření byla prováděna minimálně v dubletech.

Pyrolyzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

V experimentu byla zajištěna pyrolýza zařízením Pyroprobe CDS 5000, separace plynovým chromatografem GC trace ultra (Thermo) vybaveným autosamplerm. K separaci byla použita kolona se stacionární fází difenyl (5%) dimethyl (95%) polysiloxan (30 m, 0,25 mm i. d., 0,25 mm film). Detekce byla zajištěna a hmotnostní detektorem v režimu EI (70 eV) a ve scan módu v rozsahu 20 – 800 m/z. Průtok nosného plynu helia (99,999%) byl nastaven na 10 ml/ min. Teplotní program začínal na 50°C po dobu 5 minut, následně s krokem 10°C/min byla teplota zvýšena až na 325°C, která byla držena 10

minut. Vzorek byl pyrolyzován při 600°C.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Separace byla provedena na plynovém chromatografu GC 2010+ vybaveným autosamlerem AOC-20i (Schimadzu, Japan). Jako kolona byla použita kapilární kolona RTx- 200MS (20 m, 0,25 mm i. d., Restek). Stacionární fází byla trifluoropropylmethyl polysiloxan o tloušťce 0,25 μm . Teplotní program začínal na teplotě 50°C, která se držela 3 minuty, pokračuje 25°C/min na teplotu 175°C s následným zvyšováním teploty rychlostí 4°C/min až na teplotu 230°C, která se drží 5 minut. Hmotnostní detektor v režimu ionizace EI (70 eV) skenoval hmoty v rozsahu od 35 - 800 m/z. Vždy byl dávkován 1 μl ve split módu 1:10 při teplotě 250°C. Průtoková rychlost na koloně byla nastavena na 2 ml/min helia (99,999%). Za stejných podmínek byl na plynové chromatografii s hmotnostní detekcí upraven pro další postup teplotní program následovně: program začínal na teplotě 50°C, která byla udržována po dobu 3 minuty. Rampa pokračovala 25°C/min na teplotu 175°C s následným zvyšováním teploty rychlostí 4°C/min až na teplotu 230°C, která byla udržována po dobu 5 minut. Dále byla teplota zvýšena až na 310°C krokem 20°C/min.

2.3. Úprava vzorků

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Vzorek o hmotnosti řádově jednotek miligramů byl třikrát extrahován ve skleněné baňce diethyletherem a extrakt samovolně odpařen v digestoři. K nepolární frakci bylo pipetováno 5 ml bezvodého methanolátu sodného (0,5 mol/l). Baňka byla následně připojena na zpětný chladič a zahřívala na teplotu 60°C, 15 minut. Dále bylo k roztoku pipetováno přes zpětný chladič několik mililitrů fluoridu boritého (20 % v methanolu) a roztok byl zahříván dalších 15 minut. Reakce byla ukončena přilítím velkého množství studeného, nasyceného roztoku chloridu sodného a vytřepáním do hexanu, který byl dávkován na kolonu. Touto metodou byly stanoveny mastné kyseliny.

Pyrolyzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Analyzovaný materiál byl navážen v řádech jednotek miligramů do skleněné vialky a převrstven roztokem amoniaku (2,5 mol/l; 100 μl). Skleněná vialka byla uzavřena a zahřívána na ultrazvuku při 60°C po dobu 60 minut. Zahřátá směs byla následně odpařena pod proudem dusíku a znovu rozpuštěna v 1 % roztoku trifluoroctové kyseliny. Připravený

roztok byl extrahován postupně hexanem a diethyletherem a rozdělen na polární a nepolární frakci, které byly odpařeny pod proudem dusíku. Tato metoda se ukázala jako vhodná pouze pro stanovení nepolárních frakcí.

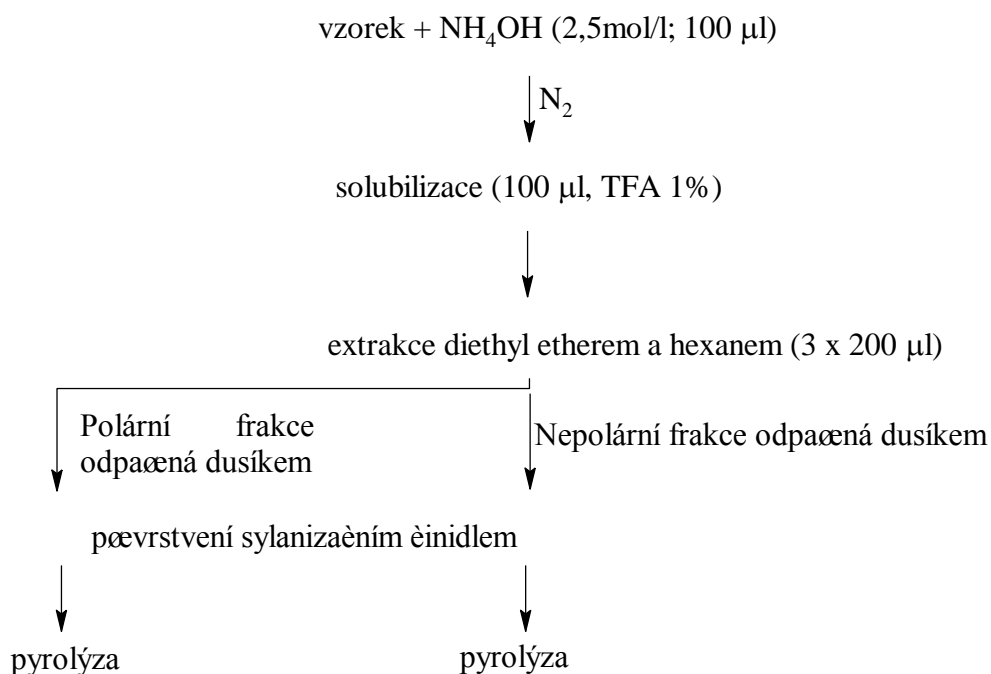


Schéma 2 Postup přípravy vzorku na pyrolyzní plynovou chromatografii.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Jednotky miligramů vzorku byly naváženy do skleněné vialky, převrstveny roztokem amoniaku (2,5 mol/l, 100µl) a v ultrazvukové lázni zahřívány 1 hodinu na 60°C. Amoniakální roztok by měl dobře narušovat strukturu malby a vytvářet solubilizovaný roztok vzorku. Reálný vzorek však nebylo možné dle literárního zdroje [16] jednoduše extrahovat amonným roztokem, protože s amoniakálním roztokem vytvářel nehomogenní směs, ze které nešla oddělit extrakční kapalina. Proto byl celý vzorek včetně amoniakálního roztoku odpařen pod proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn přidavkem trifluoroctové kyseliny (1%, 100 µl). Roztok byl třikrát extrahován diethyletherem (200 µl) a následně třikrát hexanem (200 µl). Spojením diethyletherové a hexanové frakce získáme nepolární frakci, zatímco zbývající roztok představuje polární frakci. Základní rozdělení vzorku na polární a nepolární část byla nezbytná kvůli možné koeluci monosacharidů a mastných kyselin ve výsledném chromatogramu a potřebě použití rozdílných derivatizačních činidel.

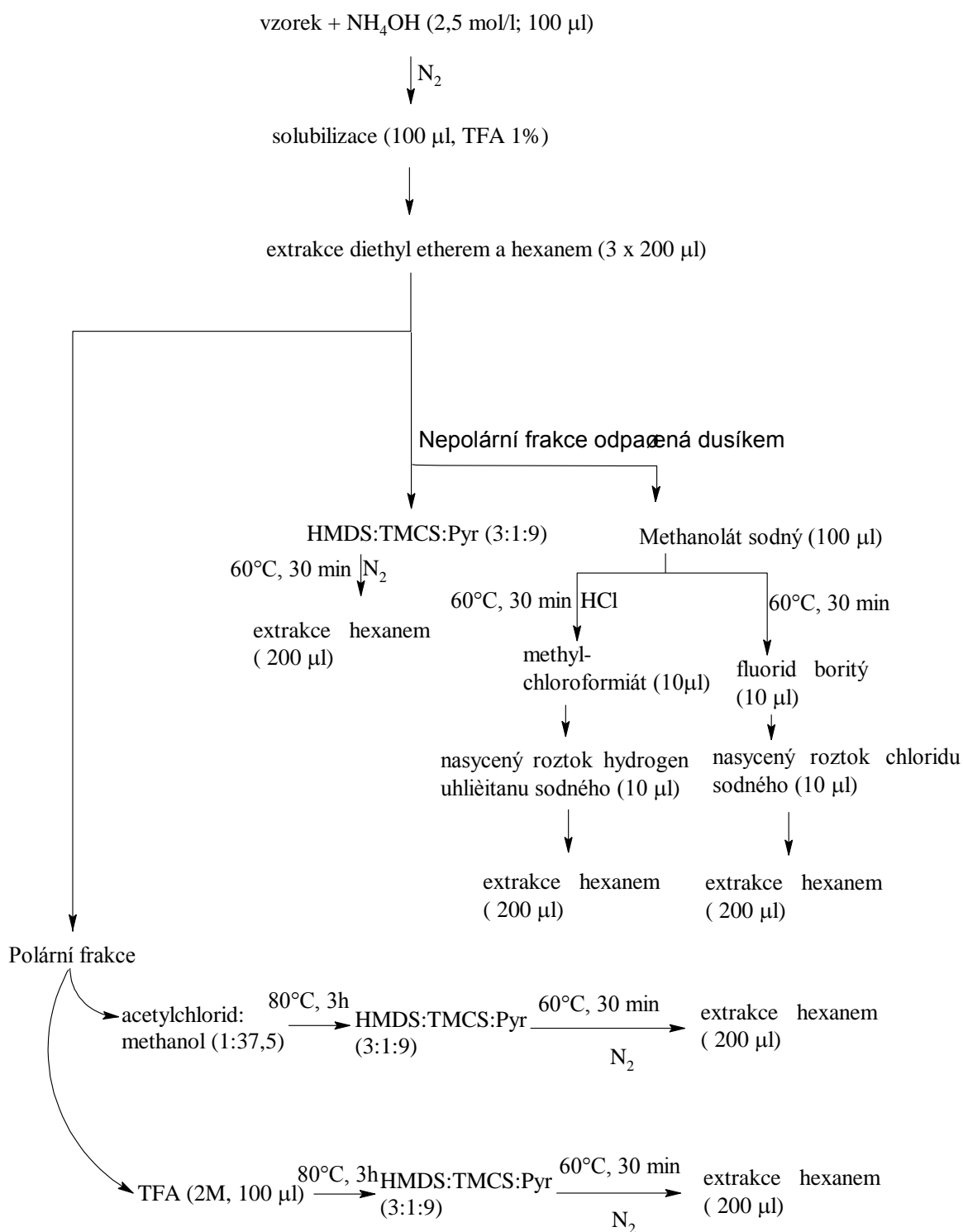


Schéma 3 Postup přípravy vzorku na plynovou chromatografii.

Polární frakce

Frakce byla předupravena dvěma různými postupy.

1. Z polární frakce byly odpařeny proudem dusíku zbylé části hexanu a diethyletheru. K roztoku bylo pipetováno 100 μl trifluoroctové kyseliny ve vodě (2 mol/l), roztok zahříván na 80°C po dobu 3h a následně odpařen proudem dusíku do úplného vymizení trifluoroctové kyseliny. Takto připravený vzorek byl derivatizován silanizační směsí. Silanizační směs je složena z pyridinu, hexamethydisilyzanu a trimethylchlorsilanu v poměru 9:3:1 na celkový objem 130 μl . Reakce probíhala se vzorkem při 60°C po dobu 30 minut, který byl následně odpařen pod proudem dusíku. Silanizované látky byly rozpuštěny v hexanu (200 μl), který byl dávkován na kolonu.
2. Celá polární část byla vysušena pod proudem dusíku. Do vialky byl posléze pipetován acetylchlorid v methanolu (1:37,5) o objemu 200 μl a následně 3 hodiny zahříván na teplotu 80°C. Dále byla směs odpařena proudem dusíku a sylanizována kombinací hexamethydisilyzanu, trimethylchlorsilanu a pyridinu jako rozpouštědla. Reakce probíhala se vzorkem při 60°C po dobu 30 minut, který byl následně odpařen pod proudem dusíku. Silanizované látky byly rozpuštěny v hexanu (200 μl), který byl dávkován na kolonu.

Nepolární frakce

Společná frakce s diethyletherem a hexanem byla odpařena proudem dusíku a následně derivatizována třemi rozdílnými postupy.

1. Odparek byl převrstven 100 μl roztoku methanolátu sodného (2 mol/l) a transterifikace probíhala při 60°C po dobu 30 minut. Následně byl přidán fluorid boritý (10 μl), kterým byl katalyzátorem reakce. Reakce byla ukončena přidavkem nasyceného roztoku chloridu sodného (10 μl). Methylované a nepolární látky byly extrahovány (200 μl) hexanem.
2. Odparek byl převrstven 100 μl roztoku methanolátu sodného (2 mol/l) a transterifikace probíhala při 60°C po dobu 30 minut. Následně byl přidán methylchloroformiát (10 μl) se kterým zreagovaly volné karboxyové skupiny. Reakce byla ukončena přidavkem nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (10 μl). Methylované a nepolární látky byly extrahovány hexanem (200 μl).
3. Odparek byl převrstven směsí hexamethydisilyzanu, trimethylchloroformiátu a

pyridinu a silanizace probíhala při 60°C po dobu 30 minut. Následně byl roztok odpařen proudem dusíku a extrahován hexanem (200 µl).

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Postup byl aplikován na kopál a damarovou pryskyřici, které byly naváženy v jednotkách miligramu a převrstveny amonným roztokem. Roztok byl zahříván na 60°C v ultrazvukové lázni a po jedné hodině byl vzorek vysušen proudem dusíku. Následně byl vzorek opět rozpuštěn v 1% rozoku trifluoroctové kyseliny a postupně extrahován diethyletherem, hexanem, chloroformem s hexanem (1:2) a methanolem s chloroformem (1:2). Extrakce byla provedena třikrát každým rozpouštědlem, a to vždy jednou minutou na vortexu. Jednotlivé frakce včetně zbylého roztoku byly odpařeny pod proudem dusíku a následně derivatizovány směsí hexamethyldisilazanu, trimethylchlorsilanu a pyridinu, přičemž reakce trvala 30 minut při 60°C. Derivatizované frakce byly odpařeny proudem dusíku a extrahovány hexanem (200 µl), který byl dávkován na kolonu.

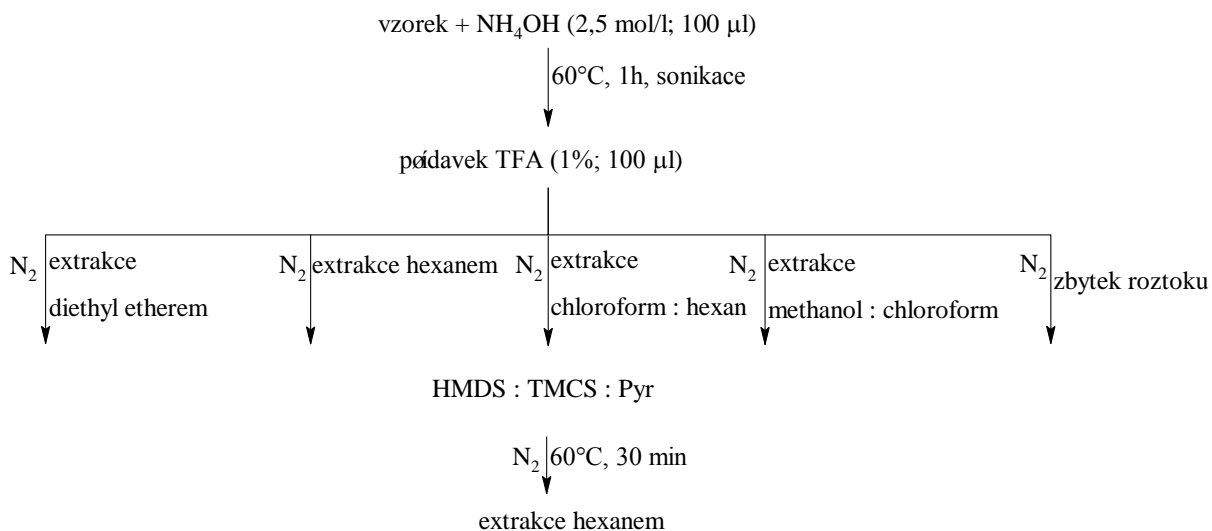


Schéma 4 Postup přípravy vzorku na plynovou chromatografii s upraveným teplotním programem

3. Výsledky

3.1. Sacharidy v klovatinách

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Za použití HILIC kolony bylo možné v systému HPLC-MS úspěšně separovat galaktozu a manozu. Po zjištění, že reálné vzorky obsahují nezanedbatelné množství sikařin bylo jasné, že z důvodu nebezpečí kontaminace nebude možné proměřit i reálné vzorky, bylo od další práce s HPLC-MS upuštěno. Všechny pokusy o separaci použitých standardů sacharidů v systému HILIC- HPLC-ELSD selhaly. Důvodem byla potřeba použití menšího průtoku mobilní fáze pro ELSD, která způsobila nedostatečnou separaci sacharidů. Dalším důvodem byla nízká citlivost ELSD. Uvedené důvody znemožnili další použití HPLC systému.

Měření z plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Polární frakci při použití acetylchloridu v methanolu se nepodařilo dostatečně rozštěpit na monosacharidy. Svědčí o tom přítomné disacharidy, především maltóza. Štěpením trifluoroctovou kyselinou se podařilo identifikovat patřičné monosacharidy analyzovaných klovatin.

Nepolární frakce při použití methanolátu sodného poskytla ve výsledném chromatogramu jeden velký a neidentifikovatelný pík. Reakční cesta nepolární frakce ve schématu 3 se směsí hexamethyldisilazanu, trimethylchlorsilanu a pyridinu, byla pozitivní na přítomnost monosacharidů. Každý jednotlivý monosacharid však eluoval ve více retenčních časech, a proto jsou uvedené výsledky relativního zastoupení monosacharidů v tabulce 6 rovny součtu ploch odpovídajících píků a jsou pouze přibližné. Jiným způsobem úpravou vzorků a derivatizace by asi bylo možné dosáhnout lepších výsledků. Z těchto výsledků vyplývá, že použitá GC-MS není příliš vhodnou metodou pro tyto účely.

Tabulka 6 Procentuální zastoupení monosacharidů v polárních frakcích příslušných vzorků.

Monosacharidy	Arabská klovatina	Damara	Třešňová klovatina	Kopál	Klih
Kys. glukuronová	3.9	-	-	-	-
Arabinosa	14.1	-	3.6	25.8	13.8
Galaktosa	34.6	38.6	-	0.3	-
Xylosa	36.5	-	5.0	5.1	-
Manosa	3.3	-	14.0	27.6	8.7
Glukosa	-	3.0	-	30.9	63.9

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Vzhledem ke komplexnímu složení rostlinných klovatin a vlivů matrice by nebylo možné identifikovat jednotlivé monosacharidy pouze z retenčního času. Od realizace samotného experimentu bylo tedy upuštěno.

3.2. Mastné kyseliny

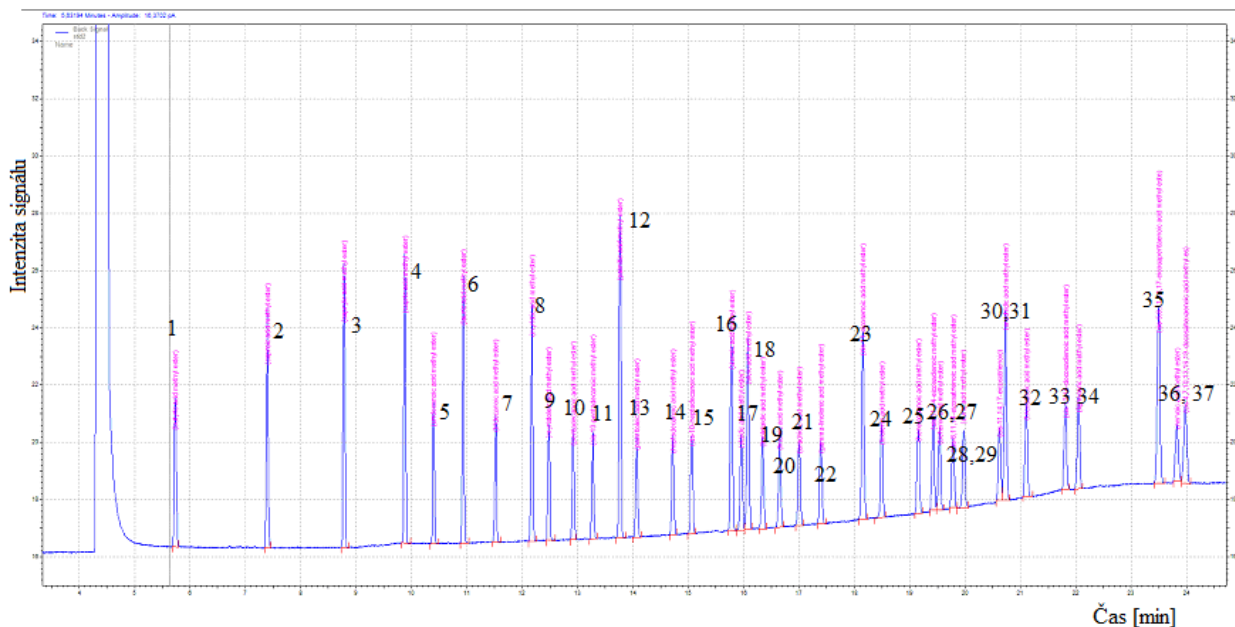
Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Předúprava vzorku byla provedena podle postupu uvedeného v normě ČSN ISO EN 5508 a 5509, kterým byl měřen standard FAME mix 37. Chromatogram separace standardu mastných kyselin je zobrazen v obrázku 1.

Tabulka 7 Linearita a směrodatná odchylka kalibračních závislostí methylesterů mastných kyselin separovaných na GC-FID

Pořadí	Methylestery	Směrnice a (10^6)	Úsek B (10^2)	Retenční čas	Regresní koeficient	RSD ploch píků [%]
1	Butanová k.	1.5	1.3	5.7	0.9999	1.10
2	Kapronová k.	1.9	32.3	7.4	0.9998	0.39
3	Kaprylová k.	2.0	96.9	8.8	0.9995	0.37
4	Dekanová k.	2.0	109.7	9.9	0.9994	0.37
5	Undekanová k.	2.0	51.4	10.4	0.9994	0.42
6	Laurová k.	2.0	58.5	10.9	0.9995	0.62
7	Tridekanová k.	2.0	-8.5	11.5	0.9995	0.32
8	Myristová k.	2.0	-21.6	12.1	0.9994	0.43
9	Myristoolejová k.	2.0	-8.5	12.4	0.9995	0.34
10	Pentadekanová k.	2.0	-27.6	12.9	0.9992	0.48
11	cis-10-pentadekanová k.	2.0	-19.3	13.2	0.9993	0.46
12	Palmitová k.	2.1	-141.6	13.7	0.9990	0.67
13	Palmitoolejová k.	2.1	-44.7	14.0	0.9990	0.61
14	Heptadekanová k.	2.2	-63.6	14.7	0.9987	0.89
15	Heptadecenová k.	2.1	-41.6	15.0	0.9987	0.69
16	Stearová k.	2.2	-136.3	15.7	0.9987	0.78
17	Elaidová k.	2.2	-67.3	15.9	0.9988	0.82
18	Olejová k.	2.2	-121.9	16.0	0.9989	0.81
19	Linolelaidová k.	2.2	-61.0	16.3	0.9989	0.82
20	Linolová k.	2.2	-63.1	16.6	0.9989	0.99
21	Arachová k.	1.1	-60.5	16.9	0.9989	0.71
22	gama-linolenová k.	2.1	-62.8	17.3	0.9988	0.78
23	Cis-11-eikosenová k.	4.7	-144.1	18.1	0.9987	0.91
24	Alfa-linolenová k.	2.3	-45.3	18.4	0.9983	0.83
25	Heneikosanová k.	2.2	-77.2	19.1	0.9989	0.97
26	cis-11,14-eikosadienová k.	2.4	-99.6	19.4	0.9985	0.93
27	Behenová k.	1.0	-83.8	19.5	0.9988	1.10
28	cis-8,11,14-eicosatrienov k.	1.9	-78.4	19.7	0.9986	0.39
29	Eruková k.	2.1	-64.6	19.9	0.9989	0.37
30	Cis-11,14,17- eicosatrienová k.	2.1	-76.8	20.5	0.9990	0.37
31	Arachidonová k.	4.9	-101.7	20.6	0.9990	0.42
32	Trikosanová k.	2.3	-55.8	21.0	0.9990	0.62
33	cis-13,16-dokosadienová k.	2.3	-61.9	21.7	0.9990	0.32
34	Lignocerová k.	1.2	-44.5	22.0	0.9988	0.72
35	cis-5,8,11,14,17- eicosapentaenová k.	4.9	-36.6	23.4	0.9990	0.80
36	Nervonová k.	2.0	-48.8	23.7	0.9993	0.95
37	cis-4,7,10,13,16,19- docosahexaenová k.	2.4	-12.2	23.9	0.9994	0.96

Stejným postupem bylo zacházeno i s reálným vzorkem pocházejícím ze sousoší a vzorkem vajíčka pro identifikaci pojidla v reálném vzorku. Relativní zastoupení mastných kyselin vajíčka bylo porovnáno nejdříve s literaturou [5] v tabulce 8 a následně s reálným vzorkem sousoší v tabulce 9.



Obrázek 1 Separace standardů methylesterů mastných kyselin (FAME mix 37) na plynové chromatografii s plamenově ionizačním detektorem. Experimentální podmínky jsou uvedeny v kapitole stroje a zařízení (Ke každému číslu je přiřazen název mastné kyseliny z tabulky 7.)

Tabulka 8 Porovnání výsledků měření nepolární frakce vajíčka s literaturou [5].

Název	Vzorek vajíčka					
	Obsah mastné kyseliny vztažený ke k. palmitové			Relativní zastoupení mastných kyselin ve vajíčku [%]		
	Vajíčko	Slepice z klece*	Volně žijící*	vajíčko	Slepice z klece*	Volně žijící*
Palmitová	1	1	1	5.78	23.06	23.06
Stearová	0.29	0.37	0.40	1.68	8.57	9.20
Palmitolejová	0.11	0.14	0.15	0.65	3.30	3.47
Olejová	0.46	1.89	1.92	12.65	43.54	44.29
Gama-Linolenová	0.03	0.65	0.55	0.18	15.07	12.65
Alfa-linolenová	0.01	0.02	0.03	0.08	0.42	0.65
Arachidonová	0.00	0.11	0.10	0.00	2.62	2.28
Eicosapentaenová	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.05
Docosapentaenová	-	0.01	0.01	-	0.17	0.34
Docosahexaenová	0.00	0.05	0.06	0.00	1.11	1.47

Hodnoty získané z literatury byly stanoveny s nejistotou do 10 %

*Výsledky získané z literatury [5]

Z tabulky je viditelná shoda obsahu kyseliny stearové, palmitolejové a alfa-linolenové vztažené na kyselinu palmitovou. U kyseliny olejové a gama-linolenové bylo zjištěno menší zastoupení než je v uvedené literatuře.

Tabulka 9 Porovnání výsledků zastoupení mastných kyselin v reálném vzorku a vajíčku získané plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem.

Název	Obsah mastné kyseliny vztažené ke k. palmitové		Relativní zastoupení mastných kyselin	
	Vajíčko	Sousoší	Vajíčko	Vzorek sousoší
Palmitová	1	1	5,78	7.32
Stearová	0.29	0.72	1.68	5.28
palmitolejová	0.11	0.00	0.65	-
Olejová	0.46	0.87	12.65	6.40
Gama-Linolenová	0.03	0.00	0.18	-
Alfa-linolenová	0.01	0.36	0.08	2.64
Arachidonová	0.00	0.00	0.00	-
Eicosapentaenová	0.00	0.00	0.01	-
Docosahexaenová	0.00	0.00	0.00	-

Mastné kyseliny obsažené ve vzorku vajíčka, především kyselina alfa-linolenová, se svým obsahem od vzorku sousoší značně liší. Jelikož je vzorek komplexní materiál a jedná se o směs, může být neshoda poměrů mastných kyselin s vajíčkem způsobena přítomností jiných olejů. Nalezené poměrně velké zastoupení alfa-linolenové kyseliny ve vzorku sousoší ukazuje na možnou přítomnost lněného oleje. Výsledky získané měřením methylesterů mastných kyselin ve vzorku, nebyly z plamenově ionizačního detektoru dostatečně intenzivní a není tedy tato metoda vhodná pro tak malé množství vzorku.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Z postupu pro plynovou chromatografií s hmotností detekcí byly získávány trimethylsilylderiváty mastných kyselin, a proto se retenční časy neshodovaly s použitým standardem FAME mix 37, který byl použit na zvolení vhodného teplotního programu a průtoku nosného plynu. Za optimalizovaných podmínek byl měřen vzorek sousoší a vajíčko, ve kterých se zdařilo mastné kyseliny pouze identifikovat, ne však kvantifikovat.

V polární frakci: L-galaktopyranosa, mannososa, D-glukosa, D-galaktosa, L-alanin

V nepolární frakci: borneol, enanthoná k., oxid kyseliny linaloové, kaprilová k., levandulol, nonanová k., terbutol, nervonová k., laurová k., palmitová k., L-alanin N-isobutoxycarbonyl-, butyl ester, globulol, lupenon, camphor

Lepší výsledky lze očekávat změnou stacionární fáze na vhodnější (DB-1, DB-23), kterou se během měření diplomové práce nepodařilo zajistit. Důvodem byla souběžně měřená diplomová práce, při které záměna kolony nebyla možná. Při experimentálním měření mastných kyselin v podobě methylesterů se nezdařilo separovat standardy bez koeluce, a proto byly měřeny jako silylderiváty, které však také do značné míry koeluovaly. Metodu by bylo po další optimalizaci možné doporučit.

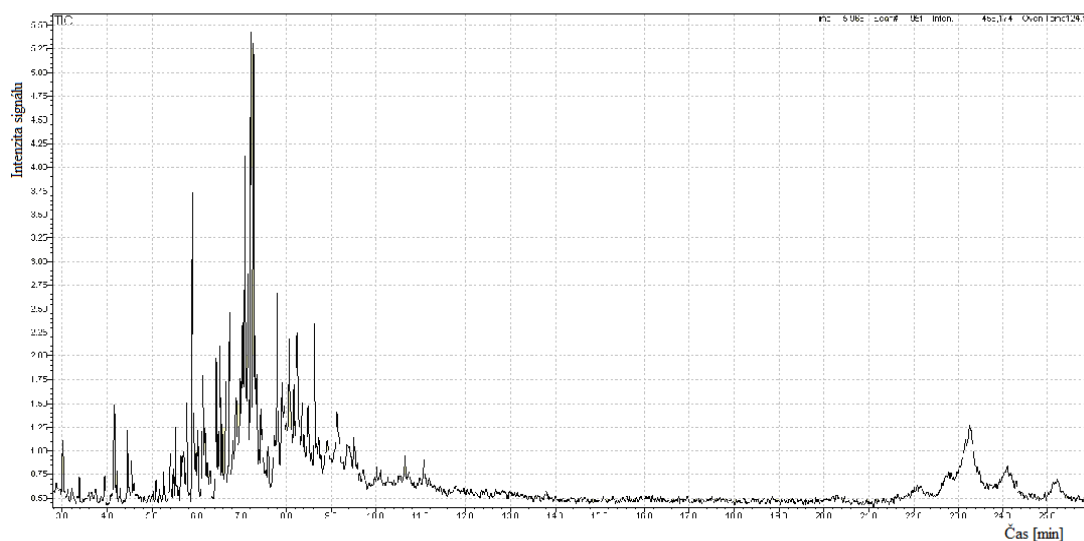
3.3. Pryskyřice

Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

Vzhledem ke komplexnímu složení použitých přírodních materiálů k optimalizaci by nebylo možné určit jednotlivé analyty v chromatogramu pouze z retenčního času. Z těchto důvodů nebyly na plynové chromatografii s plamenově ionizační detekcí měřeny žádné pryskyřice.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro optimalizaci teplotního programu byla měřena damarová a kopálová pryskyřice, nejdříve podle schématu 3. Příklad chromatogramu vzorku damarové pryskyřice je uveden na obrázku 2. Dále byl za stejných podmínek změřen i reálný vzorek sousoší. Identifikované analyty z měření pryskyřic jsou uvedené v tabulce 10 a rozděleny podle reakční doby, a výsledky z reálného vzorku v tabulce 11. Následně byl teplotní program analýzy pozměněn podle postupu s upraveným teplotním programem uvedeného na straně 24. Důvodem bylo odhalení eluce dalších analytů damarové pryskyřice s delším retenčním časem. Za stejných podmínek byl opět změřen vzorek sousoší.



Obrázek 2 Napolární frakce damarové pryskyřice změřená na GC-MS.

Tabulka 10 Identifikované látky v nepolární frakci damarové pryskyřice, získané GC-MS a porovnané s literaturou.

Očekávané složení dle literatury [30]	Doba zahřívání při silanizaci		
	3h termoblok	2h termoblok	20 min mikrovlnka
Elemen	ano	ano	Ano
Cubeben	-	-	-
Acifyllen	ano	ano	-
Copaen	ano	ano	Ano
Bourbonen	ano	-	Ano
Caryofyllen	ano	ano	Ano
Muurolen	-	ano	-
Humulen	-	-	-
Germacren D	ano	-	Ano
Viridifloren	-	ano	-
Germacren B	-	-	Ano
Cadinen	ano	ano	Ano
Spathulenol	ano	-	-
Caryofyllen oxid	-	-	-
Longifolen-12	-	-	-
2,6-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydro naphthalen	-	-	-
3H-3a,7-methanoazulen-2,4,5,6,7,8-hexahydro-1	ano	ano	-
Dimethyl naphthalen	-	-	-
Dihydro-ar-curcumen	-	-	-
Methyl ionen + 4-Isopropyl-1,6-dimethyl-1	ano	-	-
2,3,4,4a,5,6,8a-oktahydro naphthalen	-	-	-
Selinen	-	-	-
Calamenen	-	-	-
Calacoren	-	-	-
5,6,7,8-tetrahydro cadalen	ano	-	-
Ursa-9(11),12-diene-3-on	-	-	-
Ursa-9(11),12-diene-3-ol	-	-	-
Nor- β -amyrin	-	-	-
β -Amyrin	-	-	-
Lupenon	-	-	-
Hop-22(29)-en-3 β -ol	-	-	-
Hydroxydammaranon	-	-	-
Aldehyd kyseliny oleanonové	-	-	-
Aldehyd kyseliny ursonové	-	-	-

Z výše uvedené tabulky výsledků je patrná shoda získaných dat měření damarové pryskyřice s literárním zdrojem. Podle zmíněné literatury byl reakční čas 24h. Experimentálně změřené hodnoty s pozměněnou reakční dobou potvrzují, že se prodlužující reakční dobou se zvyšuje počet identifikovaných látek charakterických pro danou pryskyřici.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a upraveným teplotním programem

Použití stejného postupu aplikovaného jako při analýze damarové pryskyřice neposkytla analýza kopálové pryskyřice použitelné výsledky. Z důvodu podezření na neúplnou eluci všech složek vzorku z kolony, byl teplotní program upraven do formy uvedeného v postupu pro plynovou chromatografii s prodlouženým teplotním programem. Ze změřených pěti frakcí získaných podle schématu 4 byla na analyty pozitivní pouze diethyletherová frakce, ve které byl z očekávaného složení nalezen copaen, bourbonen, caryofyllen, humulen, germacren B, cadinen, dihydro-ar-curcumen, selinen, urša-9(11),12-diene-3-on, urša-9(11),12-diene-3-ol, amyryl a lupenon.(procent z publikovaných)

Výsledky a očekávané analyty kopálové pryskyřice jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 Složení frakcí vzorku kopálové pryskyřice získaných podle schématu 4 a její publikované složení z plynové chromatografie.

Očekávané složení [29]	diethylether	Hexan	Chloroform : hexan	Methanol : chloroform	Polární frakce
Communová k.	-	-	-	-	-
Agathová k.	-	-	-	-	-
Totarol	-	-	-	-	-
Manool	-	-	-	-	-
Acetoxy agatholová k.	-	-	-	-	-
Primarová k.	ano	ano	ano	ano	-
Sandarakopimarová k.	-	-	-	-	-
Isoprimarová k.	-	-	-	ano	-
Lae voprimarová k.	-	-	-	-	-

Přes provedné úpravy teplotního programu se jeví, že použitý postup neposkytuje očekávané složení kopálové pryskyřice, protože se podařilo identifikovat pouze kyselinu primarovou ve čtyřech frakcích a kyselinu isoprimarovou v methanol-chloroformové

frakci. Důvodem může být nedostatečná účinnost extrakce nebo odlišné složení použité pryskyřice oproti publikované.

I přes uvedená zjištění byl stejným postupem jako kopálová pryskyřice upraven a změřen za stejných podmínek i reálný vzorek sousoší a výsledky jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 Látky identifikované v jednotlivých frakcích vzorku sousoší při měření na GC-MS s upraveným teplotním programem.

Diethylether	Hexan	Chloroform : hexan	Nerozdělitelné	
			Methanol : chloroform	Polární frakce
Undekanová k.*				L-Alanine, N-
Tridecylester kyseliny propionové	Tridecyl ester kyseliny propionové	Tridecyl ester kyseliny propionové		isobutoxycarbonyl-, butyl ester
Hexylester kyseliny salicylové				
Kyseliny suberová*	Palmitová kyselina			
Tetradekanová kyselina				
Hexyl aldehyd kyseliny skořicové	L-Alanine, N-			
Methylester kyseliny jasmónové	isobutoxycarbonyl-, butyl ester	Palmitová kyselina		
Azelaová kyselina*				
Sebaková kyselina *	1-Oxa-			
Palmitová kyselina*	spiro[4.5]deca-6,9-			
Olejová kyselina	diene-2,8-dione, 7,9-di-tert-butyl	1-Oxa- spiro[4.5]deca-6,9-diene-2,8-dione, 7,9-di-tert-butyl		
Stearová kyselina				
1-Oxa-spiro[4.5]deca-6,9-dien-2,8-dion, 7,9-di-tert-butyl-	Dodecyl ester kyseliny stearové			
Palmitoolejová kyselina		Dilauryl thiodipropionát		
Kyselina nervonová	Dilauryl thiodipropionát			
Dilauryl thiodipropionát				

*změřeny jako trimethylsilylderiváty stavu

Jak je vidět z tabulky 12, podařilo se ve vzorku identifikovat podstatně větší množství látek než v případě kopálové pryskyřice. Bohužel se jedná v převážné míře o mastné kyseliny a

jejich deriváty, které se do značné míry opakují ve všech frakcích extrakce. Z výsledku lze tedy usoudit, že provedená extrakce nebyla dostatečně účinná a získané frakce neměly pro analýzu žádný význam. Jelikož metoda nebyla spolehlivá pro všechny pryskyřice, není pro analýzu reálných vzorků použitelná.

Pyrolyzní plynová chromatografie

Na základě literárních zdrojů byla v rámci optimalizace vyzkoušeny metoda pyrolyzní GC s použitím dvou druhů silanizačních činidel (BSTFA a HMDS:TMCS:Pyr). Byl pozorován úbytek identifikovaných analytů u vzorků s kratší reakční dobou a s méně reaktivním silanizačním činidlem.

BSTFA

Činidlo N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacet amid je silné silanizační činidlo, které je schopno lehce derivatizovat méně reaktivní skupiny. Vzhledem k rozmanitému složení přírodních pryskyřic bylo zvoleno jako vhodné derivatizační činidlo. Výsledky pyrolýzy damarové pryskyřice jsou uvedeny v tabulce 13.

HMDS : TMCS : Pyr

Využitím derivatizační trojkombinace bylo dosaženo ekonomicky příznivějších podmínek analýzy. Vzhledem k nižší reaktivitě činidla byl přizpůsoben potřebný čas k silanizaci funkčních skupin, která se ukázala jako nezbytná. Výsledky pyrolýzy damarové pryskyřice a její srovnání s pyrolýzou pomocí BSTFA jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13 Srovnání kvalitativních údajů získaných pyrolyzní plynovou chromatografií z nepolární frakce damarové pryskyřice

BSTFA (1 min, bez ohřevu)	HMDS : TMCS : Pyr (1 min, bez ohřevu)	HMDS : TMCS : Pyr (30 min, 60°C)
Copaen	Copaen	Copaen
Caryofyllen	Caryofyllen	Bourbonen
3H-3a,7-methanoazulene-	-	3H-3a,7-methanoazulene-
2,4,5,6,7,8-hexahydro-1	-	2,4,5,6,7,8-hexahydro-1
Elemen	-	Elemen
Viridifloren	-	-
Caryofyllen	-	Caryofyllen
2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	-	Calamenen
naphthalen	-	-
Candinen	-	-
Cubenen	-	Cubenen
2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	-	Longifolen-12
nafthalen	-	-
Selin	-	-
Spathulenol	-	-

Z uvedených výsledků je zřejmé, že BSTFA je účinnější než trojkombinace HMDS:TMCS:Pyr. U použité trojkombinace lze dosáhnout vyšší účinnosti zahřátím na vyšší teplotu a prodloužením reakčního času.

4. Diskuze

Použité umělecké materiály jsou složitými heterogenními soustavami, které se liší složením podle druhu a země původu. Degradace a stupeň poškození reálných vzorků narušuje poměr zastoupených látek oproti nedegradovaným materiálům. Rozsah od originálního složení může být způsoben i z důvodu různé reaktivity jednotlivých složek. Z těchto důvodů nelze tedy předpokládat úplnou shodu výsledků získaných z pryskyřic a reálných vzorků nebo s výsledky z literatury. V rámci diplomové práce bylo navrženo několik možných postupů pro identifikaci velkého počtu přítomných látek. Pozorovatelné jsou vedlejší, nechtěné, reakce s matricí, které rovněž snižují pravděpodobnost shody výsledků s literaturou. Z výsledků měření různými postupy lze doporučit pro další zkoumání následující postup znázorněný schématem 5, které nebylo možné v rámci časového limitu diplomové práce ověřit.

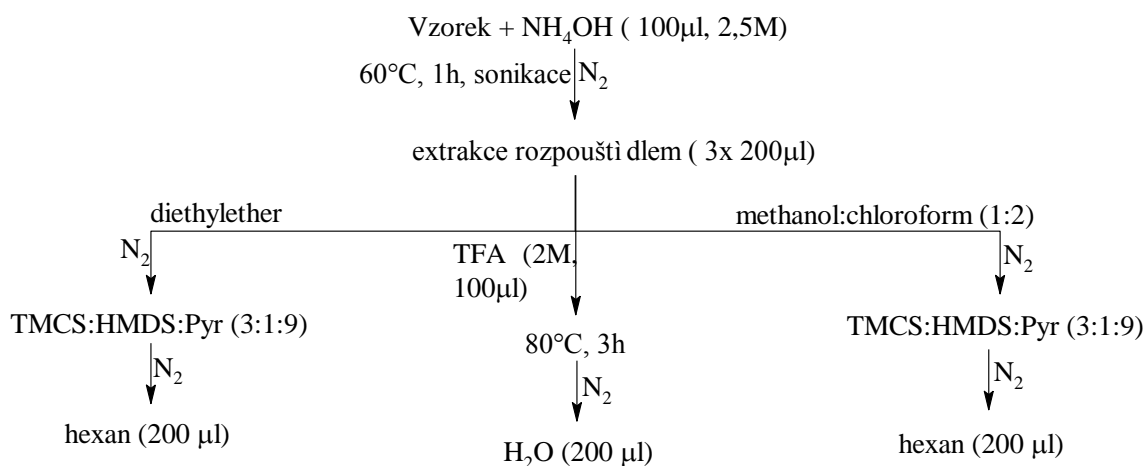


Schéma 5

Pro uvedenou a zjednodušenou úpravu vzorku navrhuji, aby vzorek byl sonikován v amonném roztoku po dobu 1 hodiny při 60°C. Narušený vzorek bazickým prostředím by byl následně odpařen proudem dusíku a opět rozpuštěn v 1 % trifluoroctové kyselině. Dále by se vzorek extrahoval třikrát 200 µl diethyletherem a následně směsí methanolu s chloroformem (1:2). Vzniklé dvě nepolární frakce by byly derivatizovány směsí trimethylchlorsilanu : hexamethylidisilazanu : pyridinu (3:1:9) hned po odpaření rozpouštědla proudem dusíku. Reakce by probíhala při 60°C po dobu 30 minut. Zbytky derivatizačního činidla by byla odpařena a suché sylanizované analyty rozpuštěny v hexanu. Takto připravený roztok by se dávkoval na kolonu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Zbylá vyextrahovaná frakce trifluoroctové kyseliny, označovanou jako

polární frakce, je nezbytné zahřívát na 80°C po dobu 3 hodin s přidavkem trifluoroctové kyseliny (2 mol/l), aby byly přítomné polysacharidy rozštěpeny na monosacharidy. Rozštěpená, polární frakce by se odpařila pod proudem dusíku a opět rozpustila v destilované vodě. Připravená frakce by byla centrifugována a roztok by byl dávkován na kolonu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Doporučené podmínky pro další analýzu vycházejí ze získaných dat v této diplomové práci. Rozpouštědla z důvodů velké rozdílné permitivity, ve kterých bylo potvrzeno rozdílného složení látek vyextrahovaných ze směsi. Derivatizační činidlo bylo doporučeno, jelikož výsledky získané silanizací dosahovaly lepších výsledků než jiné použité derivatizační činidla v této diplomové práci. Předúprava a analýza polární frakce je zmíněna postupem, který by byl pravděpodobně možný v případě, že obsažené sole ve vzorku by eluovali s mrtvým časem. Sole by tak mohli za podmínky eluce v mrtvém čase, být odstraněny ještě před hmotnostním detektorem a nedocházelo by k jeho znečištění.

5. Závěr

U zkoušených postupů pro předúpravu vzorku se v případě schématu 4 nedokázalo použitím více extrakčních kroků dosáhnout lepšího rozdělení látek podle polarity. Postupem podle schématu 3 bylo dosaženo viditelného rozdílu mezi polární a nepolární frakcí z vyextrahované směsi. Pryskyřice změřené uvedenými postupy bylo možné do jisté míry identifikovat podle analytů uvedených v literatuře. U reálného vzorku nebylo poměrem mastných kyselin vajíčko potvrzeno jako pojivový materiál. Avšak relativně vysoký obsah alaninu napovídá, že vajíčko požití být mohlo. Dále byla ve vzorku sousoší nalezena linolová kyseliny a její produkty, která je ve velké míře zastoupena v lněném oleji. Z pryskyřic byly nalezeny některé analyty, které však vzhledem k malé databázi změřených pryskyřic nebylo možné s jistotou určit.

6. Citace

- 1 Dallongeville S., Koperska M., Garnier N., Reille-Taillefert G., Rolando Ch., Tokarski C.
Identification of Animal Glue Species in Artworks Using Proteomics.
Analytical Chemistry. **83** (2011), 9431-9437.
- 2 Slánský, B.
Technika malby, díl I.
Státní nakladatelství krásné literatury. (1953)
- 3 Brůnova L.
Rentoaláž olejomalby na platně.
Bakalářská práce. Masarykova univerzita (2011)
- 4 Tammaro T.
Look beneath the surface.
Artist's Magazine. **8** (2000), str 52.
- 5 Kiplik D. I.
Technika Malby.
Orbis. (1952)
- 6 Zíha J.
Analytická příručka I
Nakladatelství technické literatury. (1979), str. 106
- 7 Caruso F., Orecchio S., Cicero G. M., Stefano D. C.
Gas chromatography-mass spectrometry characterization of the varnish and glue of an ancient
18th century double bass.
Journal of Chromatography A. **1147** (2007), 206-212.
- 8 Soucek M. D., Khattab T., Wu J.
Review of autoxidation and driers.
Progress in Organic Coatings. **73** (2012), 435-454.

- 9 Deffar D., Deffar M., Souček D.
Synergistic effect of driers on soybean oil-based ceramer coatings.
Journal of Coatings Technology. **73** (2001), 95-104.
- 10 Hrabě K.
Technické rozbory: Rozbory barev a laků.
Československá společnost chemická. (1948)
- 11 Scherrer, Nadim C., Zumbuehl S., Delavy F., Fritsch A. a Kuehnen R.
Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints.
Molecular and Biomolecular Spectroscopy. **73** (2009), 505-524.
- 12 Drago F., Chiba N.
Canvas synthesis.
The Visual Computer. **20** (2004), 314-328.
- 13 Gautier G., Colombini M.
GC-MS identification of proteins in wall painting samples.
Talanta. **73** (2007), 95-102.
- 14 Milbauer, J.
Organická technologie: Průmysl tuků, olejů, silic a pryskyřic.
Jos. R. Vilmínek. Díl VI, (1923), str 424.
- 15 Obšil T., Pavlíček Z.
Glykace proteinů a fosfolipidů: Maillardova reakce *IN VIVO*.
Chem. Listy. **91** (1997), 558-569.
- 16 Lluveras A., Bonaduce I., Andreotti A., Perla M. C.
GC/MS Analytical Procedures for the Characterization of Glycerollipids, Natural Waxes,
Terpenoid Resins, Proteinaceous and Polysaccharide Materials in the Same Paint Microsample
Avoiding Interferences from Inorganic Media.
Analytical Chemistry. **82** (2010), 376-386.

- 17 Vassilios R., Rasmus H., Lydia C., Stehen R. E.
Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS-PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry.
Food Chemistry. **99** (2006), 702-710.

- 18 Colombini M. P., Modugno F., Fuoco R., Tognazzi A.
GC-MS study on the deterioration of lipidic paint binders.
Microchemical Journal. **73** (2002), 175-185.

- 19 Hradilová I.
Biochemické aspekty studia a restaurování starých výtvarných děl.
Bakalářská práce. Univerzita Karlova (2012)

- 20 Dietemann P., Higgitt C., Kälin M., Edelmann J. M., Knochenmuss R., Zenobi R.,
Aging and yellowing of triterpenoid resin varnishes.
Journal of Cultural Heritage. **10** (2009), 30-40.

- 21 Xing-Cun Yao, Yan Cao, Sheng-Jun Wu
Antioxidant activity and antibacterial activity of peach gum derived oligosaccharides.
International Journal of Biological Macromolecules. **62** (2013), 1-3.

- 22 Christie W. W.
Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis.
Lipid Methodology. **2** (1993), 69-111.

- 23 Bonaduce I., Brecolaki H., Colombini P. M., Lluveras A., Restivo V., Ribechini E.
Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of plant gums in samples from painted of art.
Journal of Chromatography A. **1175** (2007), 275-282.

- 24 Torri C., Soragni E., Prati S., Fabbri D.
Py-SPME-GC-MS with on fiber derivatization as a new solvent-less technique for the study of polar macromolecules: Application to natural gums.
Microchemical Journal. **110** (2013), 719-725.

- 25 Watts S., René de la Rie E.
GCMS Analysis of triterpenoid resin: In situ derivatization procedures using quaternary ammonium hydroxydes.
Studies in Conservation. **47** (2002), 257-272.
- 26 Ruiz-Matute A. I., Hernández-Hernández O., Rodríguez-Sánchez S., Sanz M. I., Martínez-Castro I.
Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses.
Journal of Chromatography B. **879** (2011), 1226-1240.
- 27 Ikegami T., Horie K., Saad N., Hosoya K., Fiehn O., Tanaka N.
Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC.
Analytical and Bioanalytical Chemistry. **391** (2008), 2533-2542.
- 28 Hradil D., Fogaš I., Miliani C., Daffara C.
Neinvazivní analytické metody při průzkumu obrazů vídeňské školy 18. a v 19. století.
Technologia artis. (2006)
- 29 Romero-Noguera J., Martínez-Sánchez I., Doménech-Carbó M. T., Osete-Cortina L., López-Miras M. M., Bolívar-Galiano F.
Analytical characterisation of the biodeterioration of diterpenoid labdanic varnishes used in pictorial techniques: Sandarac and Manila copal.
International Biodeterioration and biodegradation. **90** (2014), 99-105.
- 30 Mallick M., Dutta S., Greenwood P. F.
Molecular characterization on fossil and extant dammar resin extracts: Insights into diagenetic fate of sesqui- and triterpenoids.
International Journal of Coal Geology. **121** (2014), 129-136.
- 31 Simič M., Stibilj V., Holcman A.
Fatty acid composition of eggs produced by the Slovenian autochthonous Styrian hen.
Food chemistry. **125** (2011), 873-877.

- 32 Hardis R., Jessop J. L. P., Peters E. F., Kessler R. M.
Cure kinetics characterization and monitoring of an epoxy resin using DSC, Raman spectroscopy, and DEAM.
Composites: Part A. **49** (2013), 100-108.
- 33 Svítlová L.
Možnosti stanovení těkavých mastných kyselin.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické (2009)
- 34 Dubničková M., Yaradaikin S., Lacko I., Devínsky F., Gordel'iy V., Balgavý P.
Effects of gemini surfactants on egg phosphatidylcholine bilayers in the fluid lamellar phase
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. **34** (2004), 161–164.
- 35 Bada J. C., Leon-Camacho M., Prieto M., Copovi P., Alonso L.
Characterization of Walnut Oils (*Juglans regia* L.) from Asturias, Spain.
Journal of the American Oil Chemists' Society. **87** (2010), 1469-1474.
- 36 Anonymous.
GLA Safflower Oil.
Nutraceutical business and technology. **30** (2008), str 34.
- 37 Gimeno-Adelantado J. V., Mateo-Castero R., Doménech-Carbó M. T., Bosch-Reig F., Doménech-Carbó A., Casas-Catalán M. J., Osete-Cortina L.
Identification of lipid binders in paintings by gas chromatography.
Journal of Chromatography A. **922** (2001), 385-390.
- 38 Park J. Y., Kim D. K., Wang Z. M., Lu P., Park S. CH., Lee J. S.
Production and Characterization of Biodiesel from Tung Oil.
Applied Biochemistry and Biotechnology. **148** (2008), 109-117.
- 39 Kopecká I., Nejedlý V.
Průzkum historických materiálů: Analytické metody pro restaurování a památkovou péči.
Grada. 1. vyd. (2005)
- 40 Zelinger J., Heidingsfeld V., Kotlík P., Šimunková E.
Chemie v práci restaurátora.
Akademie věd. (1987)

- 41 Cchadler K.
Egg tempera
Watercolor. **5** (1999), str 56.
- 42 Kraouz C.
Průmysl tuků, olejů, silic a pryskyřic.
Vysoké učení technické. (1923)
- 43 Cheilakou E., Troullinos M., Koui M.
Identification of pigment on byzantine wall paintings from Crete (14th century AD) using non-invasive Fiber Optics Diffuse Reflectance Spectroscopy (FORS)
Journal of Archaeological Science. **41** (2014), 541-555.
- 44 Jirát E., Pflanzler F., Trepková E., Vonášek F.
Látky vonné a chuťové.
Státní nakladatelství technické literatury. (1964)
- 45 Miller N. J., Miller C. J.
Statistics and chemometrics for analytical chemistry
Harlow: Pearson Prentice Hall. (2005), 268s.