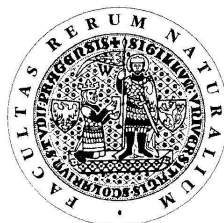


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Iva Křížová

ANALÝZA ORGANICKÝCH PŘÍMĚSÍ V HISTORICKÝCH
MALTOVÝCH MATERIÁLECH

Analysis of Organic Additives in Historical Mortars

Diplomová práce

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

Praha 2012

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

Prohlášení

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

Jsem si vědoma 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 1. srpna 2012.

Abstrakt

Úkolem této diplomové práce bylo posoudit možnosti identifikace proteinových a lipidových aditiv, jakými jsou například krev, želatina, tvaroh, sádlo nebo vejce, v modelových vzorcích vápenných malt metodou Ramanovy spektroskopie a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Podařilo se zjistit, že Ramanovou spektroskopií lze určit přítomnost organických aditiv od řádu jednotek hmotnostního procenta. Pomocí plynové chromatografie lze detekovat lipidové aditivum dokonce již od řádu setin hmotnostního procenta. Proteinová aditiva lze ale touto metodou jednoznačně rozlišit až od řádu jednoho hmotnostního procenta.

Abstrakt

The aim of this diploma thesis was to determine the possibility of identifying the protein and lipid additives, such as blood, gelatine, curd, lard and eggs, in the model samples of lime based mortars using Raman spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry.

It was proved that the method of Raman spectroscopy can determine the presence of organic additives in the order of one weight percent. The gas chromatography enables to detect lipid additives from the order of hundredths weight percent. Unambiguous resolution of protein additives can be done in the samples with the concentrations up to the order of one weight percent of the additives.

Klíčové předměty:

Analytická chemie

Klíčová slova:

Malta

Proteinová aditiva

Lipidová aditiva

Ramanova spektroskopie

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Key items:

Analytical chemistry

Keywords:

Mortar

Protein additives

Lipid additives

Raman spectroscopy

Gas chromatography – mass spectrometry

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali při tvorbě této práce. Především mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D., konzultantům Doc. RNDr. Ivanu Němcovi, Ph.D., a Ing., Mgr. Štěpánce Kučkové, Ph.D., za trpělivost a velmi cenné rady a Ing. Dagmar Michoinové, Ph.D., z Národního památkového ústavu v Praze za metodiky přípravy a přípravu modelových vzorků malt. Děkuji také kolegům v laboratoři za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji rodině za podporu při studiu a při sepisování práce.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1	PŘÍRODNÍ PŘÍSAKY POUŽÍVANÉ V HISTORICKÝCH MALTÁCH	11
2.2	SLOŽENÍ HISTORICKÝCH MALT	12
2.2.1	<i>Plniva</i>	13
2.2.2	<i>Pojiva</i>	13
2.2.3	<i>Přírodní aditiva</i>	13
2.2.3.1	Organická aditiva.....	14
3	ANALÝZA HISTORICKÝCH MALT	17
3.1	PLYNOVÁ CHROMATOGRÁFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ.....	18
3.1.1	<i>Identifikace proteinových aditiv</i>	19
3.1.1.1	Hydrolyza	19
3.1.1.2	Derivatizace	21
3.1.2	<i>Identifikace lipidových aditiv</i>	24
3.2	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	26
4.2	POUŽITÁ ADITIVA	26
4.3	SLOŽENÍ A PŘÍPRAVA MALT S ADITIVY	27
4.4	ÚPRAVA VZORKU PŘED MĚŘENÍM.....	29
4.5	PŘÍSTROJE	30
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
5.1	ANALÝZA ADITIV POMOCÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRÁFIE.....	31
5.2	ANALÝZA ADITIV METODOU RAMANOVY SPEKTROSKOPIE.....	38
5.3	POROVNÁNÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE A PLYNOVÉ CHROMATOGRÁFIE	45
6	ZÁVĚR	46
7	LITERATURA	47

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AFM	atomic force microscopy (mikroskopie atomárních sil)
DSC	differential scanning calorimetry (diferenční skenovací kalorimetrie)
DTG	differential thermal gravimetry (diferenční termická gravimetrie)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (heterogenní imunoanalýza)
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací)
GC-FID	gas chromatography – flame ionization detector (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem)
GC-MS	gas chromatography – mass spectrometry (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysoko účinná kapalinová chromatografie)
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí)
MALDI-TOF	matrix – assisted laser desorption/ionisation time of flight (laserová desorpční ionizace s pomocí matrice ve spojení s průletovým analyzátozem)
NIR	near infrared (blízká infračervená oblast)
m/z	poměr hmota/náboj u hmotnostní detekce
Py-GC/MS	pyrolysis – gas chromatography – mass spectrometry (pyrolýza kombinovaná s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem)
RS	Raman spectroscopy (Ramanova spektroskopie)
SEM	scanning electron microscopy (skenovací elektronová mikroskopie)
SIM	single/selected ion monitoring (sledování vybraného iontu)
TG	thermogravimetry (termogravimetrie)
XRD	x-ray diffraction (rentgenová difrakce)

1 ÚVOD

Od dávných dob se do stavebního materiálu přidávaly různé přísady, kterými se vylepšovaly jeho vlastnosti. Tyto přísady, neboli aditiva, mohla být jak živočišného, tak i rostlinného původu. Identifikace organických materiálů používaných v historických maltách dosud není uspokojivě vyřešena. Jedním z možných důvodů je, že analyzované vzorky jsou různorodé směsi, kde je aditivum přítomno pouze v nepatrném množství. Dalším důvodem je, že mnoho organických aditiv podléhá degradacím způsobeným například vlivem světla, působením kyslíku či vlhkosti, a proto může být jejich složení v historických maltách značně odlišné od původního. To se týká zejména lipidových a pravděpodobně i některých proteinových aditiv.

Tato diplomová práce je zaměřena na identifikaci proteinových a lipidových aditiv (tvarohu, želatiny, krve, sádla a vejce) v modelových vzorcích vápenných malt Ramanovou spektroskopií a plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Hlavním cílem práce bylo definování citlivosti jednotlivých metod na přítomnost těchto aditiv.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Přírodní přísady používané v historických maltách

Malty vyrobené smícháním pojiva a kameniva bývaly a stále jsou používány na podklad, spojování a omítání zdiva a kamene.¹ Omítky naproti tomu pokrývají stěny budov a chrání materiál tvořící stěnu před povětrnostními podmínkami.² Malty se dělí podle druhu pojiva na hliněné, vápenné, cementové a polymerní. Lze je též dělit i podle použitého druhu plniva (říční písek, kopaný písek, cihelná drť, sláma atd.).³

Nejstarší používanou maltou na stavební práce bylo bláto, které se dodnes používá v mnoha zemích po celém světě. Ve starověkém Egyptě byla blátěná malta používána na výrobu cihel, které se vysušovaly sluncem. Později byla používána sádra jako pojivo u cihlových kleneb u monumentálních staveb. Vápenné malty byly běžně používány při stavbách ve starověkém Řecku (1. století př. n. l.) až do počátku 19. století. Vápenné malty jsou primárně složené z vápna jakožto anorganického pojiva a jako výplň bylo použito kamenivo.¹ V Brazílii byla v 16. století poprvé použita vápenná pojiva, která byla získána z lastur ze zálivu Baía de Todos os Santos. Místní obyvatelé potvrzují, že směs „mušlového vápna“, písku a velrybího nebo rybího oleje byla použita pro výrobu malt při stavbě mnoha historických budov v Brazílii.⁴

Dalším pojivem byl přírodní cement, někdy také nazývaný „římský cement“, který byl objeven na konci 19. století v Anglii. Toto pojivo, pocházející z vápenatění jílového kamene, bylo použito zejména při práci, kde bylo vyžadováno rychlé zavedení vodotěsnosti. Jeho objev se rychle rozšířil po celé Evropě, kde bylo v průběhu 19. století objeveno několik lomů. Vlastnosti tohoto cementu způsobily velký převrat ve stavitelství, zejména při budování soukromých obydlí, kde byl používán až do roku 1870, kdy byla objevena výroba portlandského cementu. Další využití přírodního cementu nastalo při restaurování budov právě kvůli jeho specifickým vlastnostem – je tvrdý jako kámen a má i podobnou barvou, ale zároveň je mnohem levnější.⁵

Použití různých organických přísad, zaměřených na zlepšení vybraných vlastností malt, je staré jako malta sama. Byli to staří Egyptané, Řekové a Římané, kteří začali do malt přidávat různé přírodní látky jako je krev, živočišný tuk nebo mléko.⁶ V Egyptě byly jako přírodní přísady používány např. vaječný albumin, keratin a kasein. V Řecku používali hroší krev, šťávu z fíků smíchanou s vaječným žloutkem a v Indii se

používaly různé druhy květin, fazole, dužina z ovoce nebo listy namočené v oleji.⁷

Ve druhé půlce 20. století potlačily použití přírodních látek nové chemické produkty. V posledních letech se s nárůstem ekologických trendů u stavebních materiálů objevil zájem o používání dřívějších technologií a materiálů. Použití práškové krve, která se přidávala do betonu pro lepší odvod vzduchu, bylo zaznamenáno například v Rusku.⁶

Přehled některých organických přísad i s jejich účinky je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Účinek organických přísad na vlastnosti čerstvé a zavadlé malty.³

Druhov \acute{e} vlastnosti	Přirodní látka
Urychlovače	Bílek, cukr, sádlo, tvaroh
Zpomalovače	Volská krev, lepek, bílek
Plastifikátory	Mléko, bílek, tuky
Provzdušňovače	Slad, pivo, moč
Těsnící a hydrofobní přísady	Tuky, oleje, vosky, asfalt
Adheziva	Kasein, kliš, želatina
Zpevňovače	Kasein, sražené mléko, sýr, krev

2.2 Složení historických malt

Složení historických malt se může značně lišit v závislosti na geografické poloze a stáří stavby. Jejich složení je také značně závislé na úrovni poškození, vzhledem k jejich vysoké degradaci ve srovnání s cihlou nebo kamenem. Malty jsou jako celek, protože obsahují majoritně pouze dvě složky – písek a kamení různé velikosti, velice morfologicky podobné klasickým sedimentárním horninám obsahujícím uhličitanový cement. Tato geologická metodika je proto velmi vhodná k jejich charakterizaci.⁸ Malty se skládají z pojiva (2.2.2), kamene nebo plniv (kap 2.2.1) a někdy i z různých přírodních aditiv (2.2.3) jako jsou například vejce, zvířecí kliš, olej, sádlo atd.

2.2.1 Plniva

Plniva používaná na stavbách jsou dělena na anorganická a organická. Mezi anorganická plniva patří hlavně písky, různé kamenné drti a jiné materiály, které zlepšují vlastnosti malt. Jako organická plniva byla často používána různá rostlinná a zvířecí vlákna, která výrazně zlepšovala strukturu malt. V současné době byla ale přírodní vlákna nahrazena vlákny umělými.⁹

2.2.2 Pojiva

Malty s různými typy pojiv se používají od dávných časů na různé aplikace: na zdění mezi cihly nebo kameny, jako dokončovací materiál na stěny, jako základy na podlahy, výplně stěn, dekorace atd. Kompoziční změna historických malt je překvapivě velká s rozdíly jak geografickými, tak časovými. Bláto, sádra a vápno byly tradičně tři nejběžnější typy stavebních pojiv již od 2. tisíciletí př. n. l., Později byly nahrazeny přírodními druhy cementu a poté portlandským cementem, který je v současné době dominantním typem pojiva ve stavebnictví.¹⁰

Bahno je nejstarším typem pojiva, a bylo například nalezeno ve stavbách v Catal Huyuk v Turecku (6000 let př. n. l.). Použití vápna jako pojiva sahá až do 6. tisíciletí před naším letopočtem. Teracová (terrazzo-druh podlahové krytiny) podlaha v Canjenü ve východním Turecku z vápenné malty byla datována mezi 12 000 až 5 000 let př. n. l. Vápenné malty používané na podlahy chat rybářů v Srbsku a Černé Hoře se datují přibližně k 5600 př. n. l. I když se bahno a sádra jako pojiva používaly v některých oblastech v Evropě jen během určitých časových období, tak většina historické malty v Evropě je na bázi vápna. Sádra byla použita na většinu staveb ve faraonském Egyptě a dalších zemích Středního východu, ale také ve středověku v severním Německu a dokonce i v pařížské oblasti.¹⁰

2.2.3 Přírodní aditiva

Pojivové materiály jsou přírodní produkty, které mohou být rozděleny podle jejich hlavní složky do několika kategorií. Mezi hlavní dvě kategorie patří složky anorganické (kap 2.2.2) a organické (kap 2.2.3.1). V této práci jsme se zaměřili na

složky organické, a to hlavně na bílkovinné a lipidové pojiva. Pojiva bílkovinné povahy jsou například zvířecí kliš (želatina), kasein, mléko, vaječný albumin (vaječný bílek) a vaječný žloutek, protože mají vysoký obsah proteinů, ačkoliv mléko a vaječný žloutek obsahují také značný podíl tuku. Mezi lipidová pojiva patří např. olej (lněný olej, olej z vlašských ořechů, olej z máku) a vosk. Jinými typy organických pojiv, která obsahují vysoký obsah polysacharidů, jsou rostlinná lepidla nebo šťávy (škrob, semena tamarindu atd.) anebo přírodní pryskyřice obsahující terpenoidy.¹¹

2.2.3.1 Organická aditiva

Velkou skupinu organických aditiv tvoří tzv. proteinová aditiva získávaná hlavně z živočišné říše. Z proteinů se používaly zejména kaseiny ve formě tvarohu, sraženého mléka, sýra nebo podmásli, dále proteiny syrovátky, kolagen připravovaný z kůží, kostí a šlach, keratin z vlasů a kopyt a v neposlední řadě také vaječné bílkoviny; používal se jak žloutek, tak bílek i celé vejce.¹²

Další, hojně používanou skupinou organických aditiv jsou lipidové materiály, ze kterých se nejčastěji používal lněný olej, fermež či sádlo.

Bílek

Hlavní složkou vaječného bílku kromě vody (88 %) jsou bílkoviny. Ve vaječném bílku jsou přítomny různé typy proteinů, například ovalbumin (55 %), konalbumin (13 %), ovomukoid (10 %), ovomucin (2 %), lysozym (3,5 %) a globuliny (4 %).¹³

Bílek může v maltě v závislosti na koncentraci fungovat jako urychlovač, ale i zpomalovač tuhnutí, podle toho, jde-li o čerstvou nebo mírně zavadlou maltu.³

Žloutek

Žloutek je zhruba z jedné třetiny tvořen bílkovinami (16,6 %) a ze dvou třetin lipidy (32,6 %). Hlavní bílkoviny ve vaječném žlutku jsou lipoproteiny, které zahrnují lipovitelininy a lipovitelininy. Lipidy ve vaječném žlutku jsou zastoupeny mastnými kyselinami jakými jsou kyselina palmitová, stearová, olejová, linolová, linolenová a arachidonová.¹³

Žloutek má v maltě hydrofobizující efekt.³

Krev

Krevní plasma je kapalná složka krve, tj. krev zbavená krevních tělísek (krvinek a krevních destiček), tvoří asi 60 % objemu krve. Obsahuje asi 90 % vody, 7–8 % bílkovin, 1 % solí, glukosu, některé kyseliny a žlučová barviva.¹⁴ Nejhojněji zastoupený protein krevního séra (tvoří asi 60 % sérových bílkovin) je albumin, který reversibilně váže a tím transportuje různé ionty, mastné kyseliny, bilirubin, hormony atd.¹⁵

Krev se používala v maltě jako zpevňovač.³

Tvaroh

Tvaroh je mléčný výrobek vzniklý srážením mléčných bílkovin kaseinů například za pomoci kyseliny mléčné (tzv. kyselé srážení). Nebo za pomoci činností mikroorganismů, které se používají v mlékárenském průmyslu (syřidla obsahující enzym chymozin) tzv. sladké srážení. Tímto postupem vzniká sýřenina, která se používá při výrobě sýrů.¹⁶

Tvaroh v maltě působí zejména jako urychlovač tuhnutí a zároveň také zvyšuje tvrdost malty. Nevýhodou těchto malt je náchylnost k mikrobiální kontaminaci.³

Kostní klič

Kostní klič je středně silné lepidlo živočišného původu vyrobené z kolagenu přítomného v kostech. Všechna lepidla pocházející z živočišných tkání jsou slabě kyselá a hodí se na všechny typy povrchů – dřevo, papír, stěny a mnoho dalších.¹⁷

V maltě slouží hlavně jako ztužovací činidlo a přidával se také pro prodloužení doby zpracovatelnosti malty.³

Želatina

Želatina je kolagen z částečně hydrolyzovaných kůží, pojiv, vaziv a kostí zvířat. Klihy se získávají vyvařením z materiálů jako jsou výše zmíněné kůže, kosti nebo šlachy. Želatina se získává delším varem, a proto kolagen v ni obsažený je mnohem více naštěpen. Je to čistá, lehce stravitelná bílkovina, skládající se obvykle z 18 typů aminokyselin. Želatina s výjimkou tryptofanu obsahuje veškeré esenciální aminokyseliny.¹⁸

Želatina slouží v maltě jako ztužovací činidlo.³

Lněný olej

Lněný olej pochází ze lnu setého. Obsahuje kyseliny označované jako omega-3 (alfa-linoleová kyselina) a omega-6 mastné kyseliny (kyselina linolová) obsahuje také fytoestrogeny.¹⁹

Lněný olej slouží v maltě jako těsnící a hydrofobizující přísada.³

Sádlo

Sádlo – vepřový, ale též drůbeží tuk, patřilo dlouhá staletí ve výživě člověka mezi důležité energetické zdroje. Lipidy tvoří kolem 85 % hmoty sádla. Vedle absolutního množství tuku je důležitá jeho kvalita, která se řídí zastoupením mastných kyselin. Vepřové sádlo obsahuje nasycené mastné kyseliny, ale též kyselinu olejovou a malé množství polynenasycených mastných kyselin.²⁰

Sádlo slouží v maltě jako urychlovací a hydrofobizující přísada.³

3 ANALÝZA HISTORICKÝCH MALT

Analýza historických malt a omítek je nezbytná pro odhalování starých technologických postupů a pro pochopení jejich neobvyklých vlastností a následně pro výběr správného technologického postupu při jejich restaurování. Identifikace anorganických složek malt je již dobře propracována, ale identifikace organických přísad byla dosud neprávem opomíjena. Ačkoli organické přísady výrazně mění vlastnosti malty, nebyly do nedávné doby k dispozici žádné analytické metody k jejich rutinní identifikaci.⁹

Omítky a malty jsou značně ovlivněny faktory životního prostředí, proto se na historických objektech opravují nejčastěji. I když slouží v rámci budovy k různým účelům, jejich analýza by měla být prováděna společně, protože jsou v podstatě ze stejných materiálů. Historické malty jsou složité systémy, které obsahují pojiva nebo jejich směsi, agregáty (ne vždy krystalické) a přísady, které interagují s pojivem. Použití technik pro charakterizaci mikrostruktury materiálu umožňuje stanovit složení a některé vlastnosti malty. Nicméně každá technika má své limity a v mnoha případech musí být použito několik různých technik k získání spolehlivých výsledků.⁴

Analytické techniky, například termická analýza včetně termogravimetrie (TG), derivační termogravimetrie (DTG) neboli diferenční termická analýza a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), rentgenová difrakce (XRD) a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), byly prokázány jako nejvhodnější metody pro chemický rozbor historických malt. Mikroskopie, zejména optická mikroskopie v polarizovaném světle (PLM), rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM), jsou stále oblíbenější pro jejich morfografické pozorování. Některé výsledky ukázaly, že malty jsou složeny hlavně z anorganických materiálů jako je vápno, pucolán, soli barya a hořčíku a v některých případech obsahují i organické pojivo jako vaječný bílek a žloutek, krev, mléko, řízek, kasein, zvířecí klůň, pivo, zeleninové šťávy, tanin, moč atd.²¹

Dnes se nejčastěji používají ke stanovení organických přísad chromatografické metody. Jde především o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s UV detekcí, plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí (GC-MS) nebo s plamenově ionizačním detektorem (GC-FID) či pyrolyzní plynovou chromatografii (Py/GC-MS).

Nedílnou součástí chromatografický metod je derivatizace vzorku. U plynové chromatografie se používá ke zlepšení těkavosti vzorku.²²

Mezi používané spektroskopické metody můžeme zařadit infračervenou spektroskopii s Fourierovou transformací (FTIR) nebo Ramanovu spektroskopii. Infračervená spektroskopie, zejména ve spojení s mikroskopem, umožňuje rozpoznat přítomnost bílkovinné látky nedestruktivním způsobem. Nicméně v případě složitých směsí může být výklad spekter komplikovaný, neboť rozdíl mezi vejcem, kličem a mléčnou bílkovinou lze provést jen v ojedinělých případech.²² Snadněji interpretovatelná spektra poskytuje Ramanova spektroskopie, a to jak u anorganických, tak i organických látek. Přesto se pro analýzu organických látek příliš často nepoužívá, a to z důvodu maskování rozptylu fluorescencí. Nicméně, zlepšení ve vybavení Ramanova spektrometru (zahrnující blízkou infračervenou (NIR) excitaci s disperzí, nebo Fourierovu transformaci atd.) je slibné pro překonání problémů s fluorescencí.²³

V současné době se rozvíjí používání imunologických technik, jakými jsou například heterogenní imunoanalýza (ELISA) nebo imunofluorescence. Nevýhodou těchto metod je ale jejich vysoká finanční náročnost a zejména obtížná identifikace degradovaných proteinových poživ.²²

3.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Spojením plynové chromatografie s hmotnostním detekčním systémem (ať iontovou pastí nebo kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem) je možné získat informace o struktuře neznámých složek. Další výhodou použití hmotnostní detekce je, že lze rozlišit analyty s různými stabilními izotopy, které nabízejí možnost jejich použití jako vnitřní standardy pro kvantifikaci analytu. Použití metod s hmotnostní detekcí může mít velký vliv na přesnost a citlivost, které mohou být dále posíleny vždy, když je derivatizační reakce součástí chromatografického protokolu. Tento unikátní aspekt detekce, specifičnosti a citlivosti je spolu s větší dostupností a s nízkými náklady na provedení analýzy přijatelný a je jedním z důvodů, proč jsou tyto techniky používané stále častěji.²⁴

Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí je vhodná k identifikacím minoritních komponent ve velmi malých množstvích komplexních vzorků

(1 µg až 1 mg), např. k identifikaci směsi vaječného žloutku a olejů v uměleckých dílech.²⁵

3.1.1 Identifikace proteinových aditiv

Bílkoviny obsažené v uměleckých dílech a historických maltách mohou být identifikovány pomocí relativního obsahu aminokyselin, respektive pomocí sledování poměrů mezi svými jednotlivými aminokyselinami. Pro tento typ analýzy musí být vzorek hydrolyzován za účelem uvolnění aminokyselin a následně je nutné tento hydrolyzát derivatizovat pro zlepšení těkavosti aminokyselin.²⁶ Jiný způsob identifikace bílkovin využívá enzymové štěpení za vzniku peptidů a je využíván především hmotnostně spektrometrickými technikami MALDI-TOF a LC-MS/MS.²⁷

3.1.1.1 Hydrolýza

Dvě typické metody k dosažení hydrolýzy peptidové vazby jsou enzymatická a chemická katalýza.²⁸ Reakční časy enzymatické hydrolýzy se pohybují zpravidla v rozmezí 4–8 h.²⁹ Dále je potřeba vzorek purifikovat, aby došlo k odstranění přebytečného enzymu, který by mohl negativně ovlivnit identifikaci bílkoviny. Tento způsob hydrolýzy není vhodný pro metody (GC-MS, HPLC) používající sledování poměrů jednotlivých aminokyselin k identifikaci proteinových aditiv. Pro takové metody je vhodnější použití alkalické nebo kyselé analýzy, které se ukázaly být velmi efektivní s reakčními časy v rozmezí 1 až 24 h.

Kyselá hydrolýza pomocí kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol dm⁻³ a teplotě 110 °C se běžně používá pro rozštěpení proteinů a peptidů obsažených v barevných vrstvách uměleckých děl na jednotlivé aminokyseliny.^{23, 30-33} Tento proces se provádí ve vakuu nebo v inertním prostředí dusíku či argonu po dobu několika hodin. Různé experimentální podmínky kyselé hydrolýzy poskytují různé zastoupení aminokyselin, což je kompromisem mezi účinnou hydrolýzou nejstabilnějších peptidových vazeb (Ile-Ile, Val-Val, Ala-Ala, Ile-Ala) a minimální ztrátou méně stabilních aminokyselin (fenylalaninu, argininu, threoninu, tyrosinu, serinu). Tryptofan, cystin, cystein, methionin obvykle podléhají úplnému nebo částečnému rozkladu.

Hydrolýza v plynné fázi byla přijata jako nástroj pro snížení možnosti kontaminace související s přidáním roztoku HCl ke vzorku.^{34-36, 29} Jiným způsobem

hydrolyzy je použití mikrovlnného záření (250 W), které byla použito například při podmínkách: HCl o koncentraci 6 mol dm⁻³ v dusíkové atmosféře za tlaku 8 atm a teplotě 160 °C po dobu 40 minut²⁹ nebo pomocí HCl o koncentraci 10 mol dm⁻³ při výkonu 240 W po dobu 90 min.³⁷ Asistence mikrovlnného záření výrazně zlepšila výsledky kyselé hydrolyzy vedoucí buď k srovnatelným, nebo lepším výnosům a výrazně snížila dobu trvání hydrolyzy. Elektromagnetická energie zlepšuje účinnost hydrolyzy peptidové vazby a snižuje ztráty aminokyselin způsobené jejich oxidací a degradací, které jsou charakteristické pro metody, které vyžadují delší reakční časy. Ke ztrátám aminokyselin ale dochází i kvůli přítomnosti dalších organických látek ve vzorku. Kromě bílkovin se totiž v barevných vrstvách vyskytují například polysacharidy (škrob, med atd.), které v průběhu hydrolyzy reagují s aminokyselinami.

K překonání tohoto typu negativního ovlivnění analýzy byla navržena šetrná metoda hydrolyzy, která se provádí ve vakuu při 110 °C po dobu 24 h v přítomnosti silně kyselého ionexu. Ionex je rozmíchán v roztoku voda/ethanol, který působí jako katalyzátor.^{38,39} Jakmile jsou peptidové vazby hydrolyzovány, uvolněné aminokyseliny a kationty z pigmentů jsou vyměněny za kationty v pryskyřici, zatímco záporně nabitě polysacharidy zůstávají v roztoku. Aminokyseliny jsou z ionexu eluovány roztokem čpavku o koncentraci 7 mol dm⁻³. Typy kyselé hydrolyzy jsou dále shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2. Srovnání různých podmínek kyselé hydrolyzy.

Činidlo	Podmínky	Čas	Teplota (°C)
6 mol dm ⁻³ HCl	ve vakuu, inertním prostředí dusíku nebo argonu	24 h	110
6 mol dm ⁻³ HCl	dusíková atmosféra (8 atm), 250 W mikrovlnná trouba	40 min	160
10 mol dm ⁻³ HCl	dusíková atmosféra (8 atm), 240 W mikrovlnná trouba	90 min	160

Alkalická hydrolyza, oproti kyselé, umožňuje pro identifikaci proteinových poživ využití dokonce i tryptofanu.^{40,41} Vzorky (25 mg) jsou váženy ve skleněných

zkumavkách z varného skla se šroubovacím uzávěrem s teflonovou vložkou, které se používají jako hydrolytické nádoby. Ke vzorkům se přidají 3 ml 4,2 mol dm⁻³ hydroxidu sodného a směs se pod dusíkovou atmosférou míchá v ultrazvukové lázni po dobu 2 minut. Následně jsou vzorky hydrolyzovány zahříváním při 120 °C po dobu 4 h a ochlazeny v ledové lázni. Poté se koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou upraví pH na hodnotu 9. Výsledný roztok musí být vakuově přefiltrován přes Whatmanův filtrační papír č. 41. Filtrát se zředí na 50 ml borátovým pufrem v odměrné baňce a 5 µl výsledného roztoku je použito k analýze.⁴²

Jiní autoři navrhují použít místo kyselé hydrolyzy alkalickou za použití hydroxidu barnatého o koncentraci 1 mol dm⁻³ při 108 °C po dobu 48 h.⁴⁴ Srovnání typů alkalické hydrolyzy je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3. Srovnání alkalické hydrolyzy.

Činidlo	Podmínky	Čas (h)	Teplota (°C)
3 ml 4,2 mol dm ⁻³ NaOH	ultrazvuková lázeň (2 min) ochlazení po hydrolyze upravení pH na 9 s konc. HCl filtrace přes Whatmenův p., zředění 50 ml borátovým pufrem, 5 µL výsledného roztoku analyzujeme	4 h	120
1 mol dm ⁻³ BaOH		48 h	108

3.1.1.2 Derivatizace

Analýza aminokyselin pomocí plynové chromatografie vyžaduje derivatizační krok ke zvýšení těkavosti aminokyselin. Obecně platí, že norleucin a/nebo norvalin jsou jako vnitřní standardy přidávány do hydrolyzátu, aby byla umožněna kontrola výnosu derivatizace. Podle experimentálních metod se používá mez detekce (LOD) pohybující se v rozmezí 10 až 100 pg pro každou aminokyselinu. U chromatografických kolon, kde většina derivátů jsou estery – jen polárních sloučenin – jsou nejčastěji používané kapilární kolony z taveného křemene s minimálním unikáním stacionární fáze, jako je

5% fenyl/95% methylpolysiloxan. Tyto kolony umožňují lepší citlivost a malý základní nástřík při programování teploty. Pro analytické účely se ale používají i více polární stacionární fáze jako je například polyethylen glycerol.

Tabulka 4 shrnuje derivatizační metody nejčastěji používané pro analýzu aminokyselin v hydrolyzátu získaném z historické malty.

Modifikace aminokyselin na jejich N-trifluoroacetyl methylestery³⁰ nebo na jejich odpovídající propylestery⁴⁴, butylestery^{38,39} nebo N-pentafluoropropionyl n-propylestery⁴⁵, vyžaduje dva odlišné reakční kroky. V prvním kroku je methanol, propanol, butanol, nebo n-propanol použit na esterifikaci kyselých funkčních skupin, a následně se odpaří chemikálie a rozpouštědla. V dalším kroku se provádí trifluoroacylace nebo pentyfluoropropionylace aminoskupiny. Sušící krok k odstranění veškeré vody je třeba v obou dvou těchto krocích. Zatímco N-trifluoroacetylová skupina se vyznačuje dobrou stabilitou, O-trifluoroacetylová snadno podléhá hydrolyze. To znamená, že aminokyseliny s OH skupinami, jako je například hydroxyprolin, poskytují pouze kvalitativní výsledky. Jednou z výhod tohoto typu derivatizace je přítomnost fluoru v molekule, který umožňuje detekci těchto derivátů pomocí negativní chemické ionizaci spojené s hmotnostní spektrometrií nebo pomocí detektoru elektronového záchytu (ECD). Detekce pomocí ECD umožňuje stanovení obsahu aminokyselin v tak nízkém rozsahu, jak jsou pikogramy.

Silylace s tvorbou trimethylsilylového (TMS) derivátu^{39,41} nebo terc-butyl dimethylsilylového (TBDMS) derivátu^{29,25,46-48} má tu výhodu, že současně derivatizuje kyselá a aminová funkční skupiny. Nicméně, nepřítomnost vlhkosti je v této metodě také rozhodující, protože voda by degradovala silylační činidla. To je důvod, proč je důležité se ujistit, že aminokyselinový hydrolyzát je dobře vysušen. Tyto typy derivatizace jsou rozšířené v GC-MS metodách, kvůli získávání komplementárních vlastností látek. Tento způsob analýzy poskytuje podrobnou identifikaci, např. alfa-aminokyselin, které mohou být selektivně detekovány sledováním významných fragmentů od m/z 218 [TMS-NH₂CH-COOTMS⁺]. Kromě toho, TBDMS deriváty jsou poměrně stabilní sloučeniny. Fragmentační vzor je poměrně jednoduchý. Dominující výsledný vzorec, ionty s m/z odpovídají [M-57]⁺ (ztráta terc-butyl skupiny), může umožnit určení molekulové hmotnosti, a jsou velmi vhodné pro kvantitativní analýzu sledování vybraných iontů (SIM – single/selected ion monitoring). Pouze v případě

prolinu nebo hydroxyprolinu dochází k těžší fragmentaci a jsou získány dva odvozené produkty.

Derivatizace pomocí alkylchloroformiátů ve směsi ethanol/voda/pyridin ⁴⁹ se provádí v jediném kroku, který vyžaduje pouze několik sekund a řídí se podle skupin aminokyselin a hydroxylové skupiny. Derivatizace s methyl- a ethylchloroformiátem byla použita při analýze proteinových poživ a prezentovala výhodu, že reakce není ovlivněna přítomností vody, a tak je přímo použitelná po hydrolyze. Nicméně jednoduchost práce s vodným roztokem je mírně komplikována tím, že vyžaduje přísnou kontrolu pH, aby byla provedena efektivní derivatizace a nastala jen částečná ztráta aminokyselin, které zůstávají nezreagované a současně se ve vodné fázi vyskytují jako sole.⁵⁰ Tato omezení spolu s rozsáhlou fragmentací ethylchloroformiátových derivátů, činí tuto metodu méně efektivní pro kvantitativní stanovení pomocí akvizice v režimu SIM. Nedávno byl testován nový fluoroalkylchloroformiát se třemi a čtyřmi atomy uhlíku pro okamžitou přeměnu aminokyselin na hydrofobní deriváty ve vodném prostředí.⁵¹ Tato derivatizační činidla se zdají být velmi slibná vzhledem k vysoké reaktivitě aminokyselin ve vodném prostředí, a to i bez přídavku alkoholu, při vytváření vysoce těkavých derivátů s molekulovou hmotností 850 Da. Obecně platí, že je třeba zdůraznit, že při práci s chloroformiáty, by mělo být vzato do úvahy, že patří mezi toxická činidla s korozivními účinky.

Tabulka 4. Derivatizační metody používané pro GC analýzu proteinů

Derivační činidlo	Derivované aminokyseliny	literatura
Trifluoroacetamid + methanol	ala, val, gly, ile, leu, thr, met, ser, pro, asp, glu, phe, lys, hyp	30
Trifluoroacetamid + isopropylalkohol	ala, val, gly, ile, leu, thr, ser, pro, asp, glu, phe, hyp	32,52,53
Trifluoroacetamid + butanol	ala, val, gly, ile, leu, thr, met, ser, pro, asp, glu, phe, lys, hyp, tyr	38
N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid	ala, val, gly, ile, leu, thr, ser, pro, asp, glu, phe, hyp, tyr	39
N-tert-butyl dimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid	ala, val, gly, ile, leu, thr, met, ser, pro, asp, glu, phe, lys, hyp, arg, his, tyr	25,29,46
Methylchloroformiát, Ethylchloroformiát	ala, val, gly, ile, leu, thr, met, ser, pro, asp, glu, phe, lys, his, hyp, tyr, cis	33,54

3.1.2 Identifikace lipidových aditiv

Pro analýzu sterolů složených z mastných kyselin a kyselých nezmýdelnitelných frakcí je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí vhodnou chemickou metodou. Plynová chromatografie je také výhodná pro zkoumání chemického složení lipidové hmoty ve vzorcích malt. Umožňuje identifikaci rozkladných produktů, stejně jako rozlišení mezi lipidy pocházejícími z vajec a sušených olejů.⁵⁵

Plynová chromatografie se používá k identifikaci a případně i kvantifikaci lipidů po hydrolýze mastných kyselin a následné derivatizaci. Methylestery jsou obvykle použity v běžných analýzách lipidů, používají se taky ethyl nebo 2-propylestery, alkylace s alkylchloroformiáty je velice jednoduchá a může být provedena ve vodných roztocích.⁵⁶ Analýza lipidů pomocí plynové chromatografie předpokládá, že sloučeniny mastných kyselin, nejčastěji mono-, di- a triacylglyceridů, budou převedeny na další těkavé deriváty. Pro minimalizaci manipulace se vzorkem a ztráty analytu se používá v jednom kroku transesterifikačně derivatizační postup, tedy převedení vázané i volné mastné kyseliny přímo na methylestery mastných kyselin.

Postup zahrnuje přidání bezvodého methanolu a methanolické HCl přímo do vzorku. Methanol tvoří ester s uhlíkem karbonylové skupiny, a tak vytvoří di-ester v případech, kdy jsou mastné kyseliny připojeny ke glycerolu. Přenos protonu přeruší vazbu mezi glycerolem a esterem, což vede k přímé přeměně vazeb mastných kyselin za vzniku methylesterů mastných kyselin.⁵⁷

Mezi možné způsoby jak analyzovat lipidová aditiva patří zmýdelnění, při němž se vzorky zmýdelní pomocí 10% KOH (4 h, 60 °C), poté jsou ponechány při pokojové teplotě přes noc. Steroly a jiné organické neutrální sloučeniny, obsažené v nezmýdelněné frakci, se extrahují n-hexanem a zbytkový roztok je okyselen a mastné kyseliny jsou extrahovány diethyletherem. Zbytky obou extraktů jsou vysušeny proudem dusíky a silylovány pomocí MTBSTFA (*N-t*-butylmethyl-silyl *N*-methyl trifluoroacetamid) a/nebo BSTFA (bis trimethyl-silyl-trifluoro-acetamid) jakožto derivatizačními prostředky. Derivatizace se provádí přidáním 15 µl silylačních činidel a 180 µl iso-oktanu jako rozpouštědla, poté se směs zahřívá při 60 °C po dobu 30 min. Do plynového chromatografu s hmotnostním detektorem se aplikují 2 µl vzorku a jako vnitřní standardy se používají hexadekan a tridekanová kyselina.²⁴

3.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní, rychlá analytická technika, která vyžaduje pouze malé vzorky a při analýze nedochází k téměř žádnému rušení vodou. Ramanova spektra jsou dobře řešitelná v porovnání s podobnými spektroskopickými technikami, jako je například infračervená spektroskopie. Proto je velmi oblíbená v mnoha oblastech chemie i v oblasti analýzy historických objektů.⁵⁸

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze zkoumat jak látky anorganické, tak i organické, které mohou být součástí uměleckých děl⁵⁹, ale zřídka kdy se používá k identifikaci proteinového aditiva. Častým problémem při této metodě je maskování Ramanova rozptylu fluorescencí, jenž je často spojena s přítomností proteinového pojiva. K vyřešení tohoto nedostatku se používá FT – Ramanova spektroskopie (použití delší excitační vlnové délky). Dalším komplikací je nedostatek rozsáhlé spektrální databáze referenčních materiálů a čas potřebný pro proměření spekter.²³

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a materiály

Křemenný písek (Vlence – Liteň, Český Kras)

Vápno ve formě vápenné kaše (Lhoist group, Vápenka Čertovy schody a.s.)

Voda (pitná voda z vodovodního řadu)

Vejce (domácí chov)

Tvaroh tučný (Milko, Polabské mlékárny a.s.; sušina min. 22 %, tuk. min. 8,4 %, bílkoviny 9,6 %, sacharidy 3,3 %, tuk 8,4 %)

Želatina (katalogové č. 2408, Deffner)

Kostní klič (katalogové č. 2406, Deffner)

Rafinovaný lněný olej (Umton barvy)

Sádlo (domácí neupravované)

Ethanol (99,8% – Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Pyridin (99,0% – Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Ethylchloroformiát (Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Chloroform (Lach- Ner, s.r.o, Neratovice)

Kyselina chlorovodíková (35,0% - Lach-Ner, s.r.o, Neratovice)

Pentan (Fluka, Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Heptan (Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Acetylchlorid (99,0%– Fluka, Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Mehtylchloroformiát (Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Methanol (99,9% – Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Methanolát sodný (97,0% – Fluka, Sigma Aldrich chemie, Steinheim, Germany)

Benzen (99,7% – Lachema n. p. Brno, Neratovice)

4.2 Použitá aditiva

Na základě dosud získaných informací, analytických možností a cílů výzkumu byly vybrány nejčastěji citované přírodní organické látky, které jsou uvedeny v tabulce 5, kde jsou uvedeny také obsahy proteinů a tuků v použitých aditivech.¹³⁻²⁰

Tabulka 5. Značení zkušebních těles pro laboratorní hodnocení.

Označení vzorku	Aditivum	Obsah proteinů (%)	Obsah tuku (%)
A	žloutek	16	32 – 33
B	bílek	11	0
C	krev	20 – 22	0
D	tvaroh tučný	9,6	8,4
E	želatina	100	0
F	kostní klih	100	0
G	lněný olej rafinovaný	0	100
H	sádlo	0	100
REF	referenční vzorek	0	0

Dávkování aditiv bylo provedeno v surovém homogenizovaném stavu s výjimkou klihu a želatiny. U těchto aditiv byly pro dávkování 0,01 % a 0,10 % připraveny roztoky v koncentraci, která odpovídá současně množství záměsové vody přidávané do čerstvé malty a množství aditiva. Pro želatinu o koncentraci 1,00 % byl do malty vmíchán suchý prášek v odpovídajícím množství.

4.3 Složení a příprava malt s aditivy

Po zkušenostech s přípravou zkušebních těles vápenných malt, byla zvolena zkušební tělesa o rozměrech 20 × 20 × 100 mm. Z každé malty bylo vždy identickým postupem připraveno minimálně šest zkušebních těles. Poměr pojiva a plniva odpovídal tradičnímu objemovému poměru vápenné kaše : písku 1 : 3. Pro dodržení konstantního složení malt byly objemové díly převedeny na díly hmotnostní, a složky malty byly nadávkovány v hmotnostních jednotkách. Vápenné malty byly připraveny s minimálním a vždy konstantním vodním součinitelem (poměr hmotnosti účinného obsahu vody k hmotnosti cementu v čerstvé maltě), který byl 0,61, a to z důvodného předpokladu, že mnohá aditiva budou měnit (převážně zlepšovat) jejich zpracovatelnost. Složení malt před přidáním aditiv je uvedeno v tabulce 6.

Metodika přípravy modelových vzorků malt i jejich samotná příprava byla provedena v technologické laboratoři Národního památkového ústavu.

Tabulka 6. Složení studovaných malt v hmotnostních jednotkách – zastoupení pojiva a plniva.

	vápenná kaše [g]	kamenivo [g]	voda [g]	celková hmotnost [g]
všechna zkušební tělesa	500	1500	125	2125

Vybraná aditiva byla dávkována do vápenných malt v koncentraci, která odpovídá přítomnosti proteinů, případně tuků, v maltě v řádu 0,01 %, 0,10 % a 1,00 %. Toto množství aditiv bylo přidáváno do 500 g čerstvé malty (viz tab. 7). Jednotlivé vzorky s rozdílnou koncentrací byly označeny podle obsahu aditiva v hmotnostním procentu. Pro 1,00 hm. % je vzorek označen 1, pro 0,10 hm. % je označen 2 a vzorek s 0,01 hm. % je označen 3.

Malty s nejvyšší koncentrací tvarohu a klihu nebyly připraveny. V případě malty s 1,00 % tvarohu byla směs nadměrně tekutá, v případě malty s 1,00 % klihu nebylo možné tělesa připravit, z důvodů odměšování klihu.

Tabulka 7. Složení studovaných malt v hmotnostních jednotkách – zastoupení aditiv.

Označení vzorku	Aditiva	Dávkování aditiv (g)		
		0,01 %	0,10 %	1,00 %
A	žloutek	0,16	1,6	16,0
B	bílek	0,5	5,0	50,0
C	krev	0,24	2,38	23,8
D	tvaroh tučný	0,58	5,8	-
E	želatina	0,05	0,5	5,0
F	kostní kliš	0,05	0,5	-
G	lněný olej	0,05	0,5	5,0
H	sádlo	0,05	0,5	5,0
REF	Referenční vzorek	0	0	0

Vzorky malt pro analýzu byly odebírány před zahájením, v průběhu (po 5 cyklech) a po ukončení ošetřování (zrychlené karbonatace) malt (po 20 cyklech).

Jeden cyklus ošetřování malty s cílem urychlené karbonatace vápenného pojiva spočíval v ponoru těles do vody na dobu 15 minut, po té tělesa 3 dny vysychala v laboratorních podmínkách.

4.4 Úprava vzorku před měřením

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

PROTEINY – Vzorky s proteinovými aditivami byly připravovány k analýze pomocí kyselé hydrolyzy a následné derivatizaci pomocí ethylchloroformiátu jako derivatizačního činidla.

Bylo naváženo 300 µg vzorku, k němuž bylo přidáno 500 µl HCl o koncentraci 6 mol dm⁻³ a ponecháno hydrolyzovat se v topném hnízdě při 100 °C po dobu 24 hodin. Následně byl hydrolyzát odpařen proudem dusíku. K vysušenému hydrolyzátu bylo přidáno 100 µl směsi voda/ethanol/pyridin (60:32:8) a 5 µl derivatizačního činidla ethylchloroformiátu, vzorek byl protřepán a bylo k němu přidáno 100 µl chloroformu s 1% ECF (ethylchloroformiát). Poté byl k protřepání použit vortex a následně bylo přidáno pár kapek kyseliny chlorovodíkové pro okyselení vzorku. K analýze byla odebrána spodní fáze (100 µl), které byl do plynového chromatografu aplikován 1 µl.

LIPIDY – Vzorky s lipidovými aditivami byly připravovány k analýze metodou transesterifikace mastných kyselin.

Bylo naváženo 300 µg vzorku do mikrozkušavky, ke kterému bylo přidáno 150 µl pentanu. Vzorek byl ponechán 3 x 1 min v ultrazvukové lázni na promíchání a poté byl umístěn do centrifugy pro oddělení fází. Oddělený extrakt byl následně odebrán do vialky a odpařen proudem dusíku. K odpaření bylo přidáno 200 µl roztoku methanolátu sodného a roztok byl ponechán reagovat po dobu 5 minut. Následně se roztok zneutralizoval bezvodou HCl o koncentraci 2 mol dm⁻³, indikací bylo vymizení barvy. Poté bylo přidáno derivatizační činidlo jímž byl methylchloroformiát. Po dalších 5 minutách bylo do vzorku přidáno 200 µl pentanu a vše bylo zamícháno na vortexu. V případě neoddělení fází bylo přidáno pár kapek destilované vody a odebrána horní fáze do kónické vialky. Tato extrakce byla 2 krát opakována. Obsah vialky byl odpařen proudem dusíku a rozpuštěn ve 100 µl heptanu, a následně byl aplikován 1 µl do plynového chromatografu.

Ramanova spektroskopie

Vzorky byly homogenizovány v kulovém mlýnku na jemný prášek. Takto upravené vzorky byly proměřeny Ramanovou spektroskopií.

4.5 Přístroje

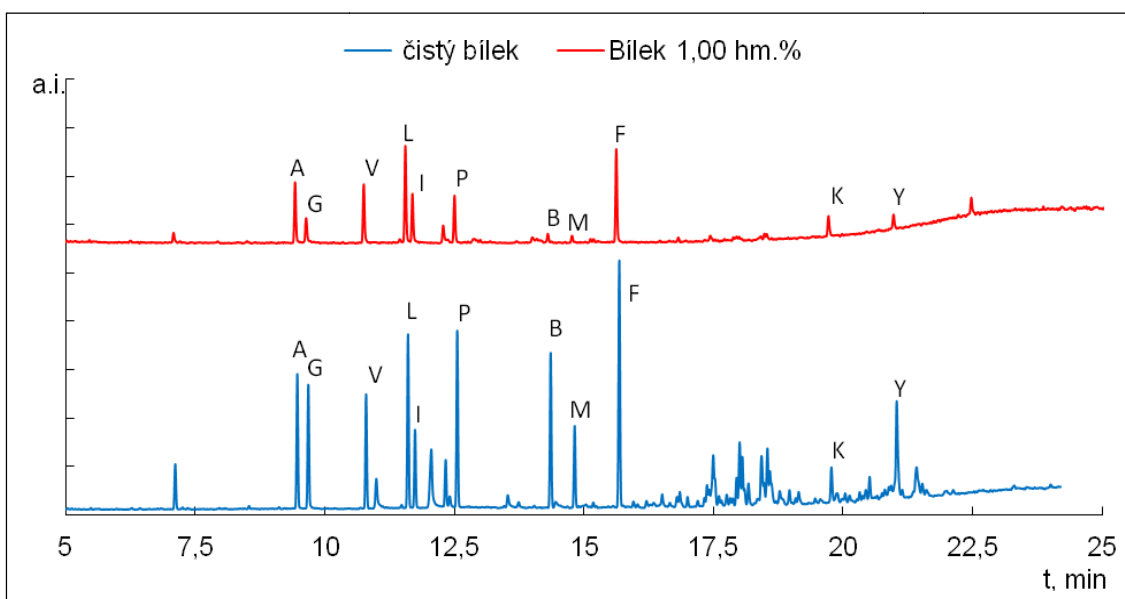
Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí – pro analýzu byl použit přístroj GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japonsko), vybavený kolonou RTX-200MS (Chrompack) s parametry: 30 m x 0,25 mm i. d., a tloušťkou filmu 0,25 μm . Nosným plynem bylo helium (99,999 %, Linde) s průtokem 0,9 ml min^{-1} . Dávkovací mód byl použit Split (objem vzorku 1 μl) při 250 °C (split ventil uzavřen za 1 min). Teplota termostatu byla po dobu 2 minut držena na 80 °C a poté zvyšována o 10 °C/min na 280 °C a opět držena po dobu 10 minut (celkový čas analýzy 32,00 min). Hmotnostní spektrometr pracoval ve skenovacím módu.

Ramanova spektroskopie – Ramanova spektra byla měřena pomocí FT Ramanova modulu Nexus Nicolet připojeného k FTIR spektrometru Nicolet 6700 (rozlišení 4 cm^{-1} , 100–3700 cm^{-1} , počet skanů 256, excitační laser o vlnové délce 1064 nm o výkonu 0,2–0,4 W). Všechna spektra byla uložena ve formátu SPA pomocí programu Omnic.⁶⁰ Jako detektor byl použit germaniový detektor chlazený tekutým dusíkem. Použitím laseru s vyšší vlnovou délkou je dodávána menší energie, a tím je sníženo riziko fluorescence.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Analýza aditiv pomocí plynové chromatografie

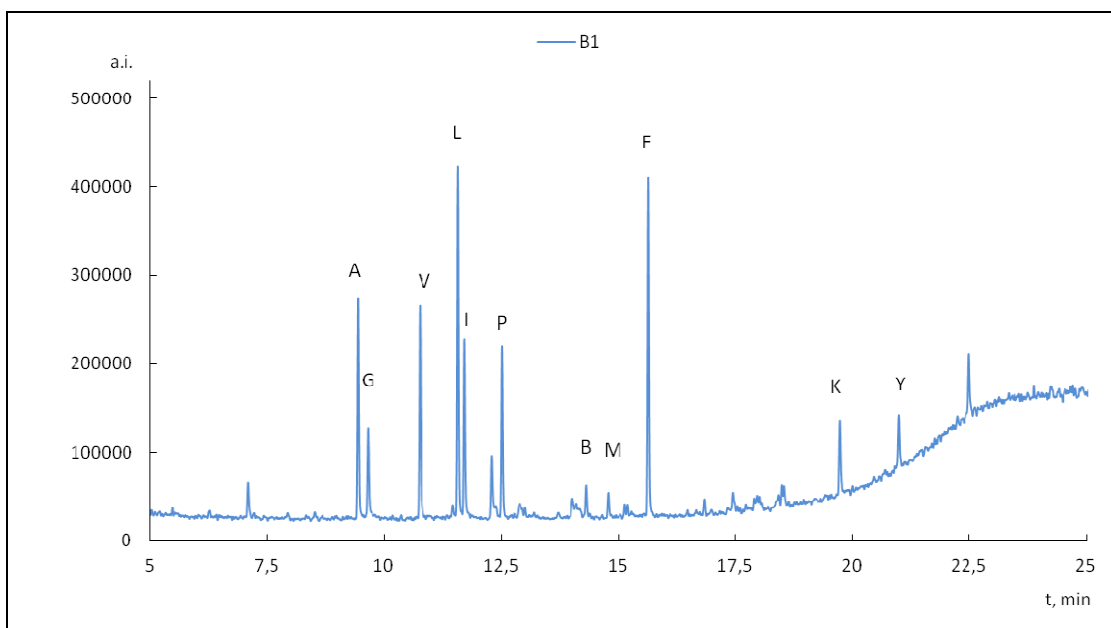
Metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí byla analyzována proteinová aditiva: bílek, krev, želatina a kliš. V případě žloutku a tvarohu se jedná o směs proteinového a lipidového aditiva, proto byly tyto vzorky připraveny jak pro metodu měření proteinových, tak i lipidových aditiv. Nejdříve byly změřeny chromatogramy samotných aditiv, z důvodu zjištění přítomností jednotlivých aminokyselin, a poté byly změřeny chromatogramy aditiv ve směsi s maltou. Na obrázku 1 můžeme vidět porovnání čistého aditiva s aditivem ve směsi s maltou, jako příklad byl vybrán chromatogram bílku a v případě modelového vzorku malty chromatogram bílku o 1,00 hm. % před procesem karbonatace. Jednotlivé aminokyseliny jsou označené jednopísmennou zkratkou podle zavedené konvence.



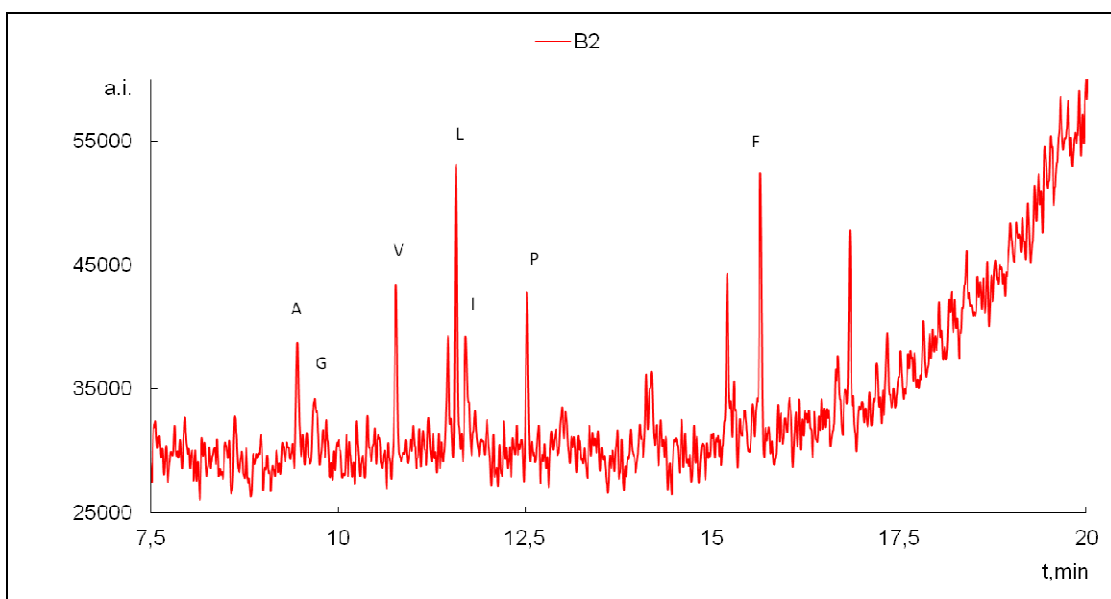
Obr. 1. Porovnání spekter čistého aditiva bílku s aditivem bílku (1,0 hm. %) ve směsi s maltou.

Rozdílnost chromatogramů v rámci hmotnostní koncentrace lze vidět na obrázcích 2–4. Je zde možnost pozorovat jak snížení intenzity jednotlivých píků, tak zastoupení jednotlivých aminokyselin. Se snižující hmotnostní koncentrací se snižuje intenzita píku a možnost identifikace některých aminokyselin. U vzorků s nejnižší

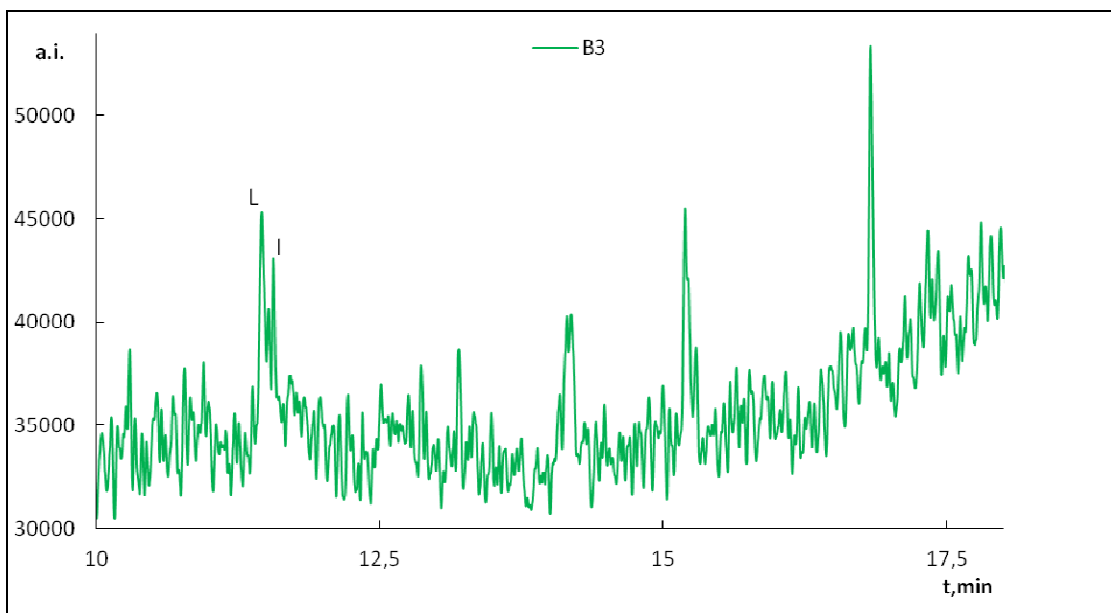
hmotnostní koncentrací, což je v našem případě 0,01 hm. %, jsou výjimečně patrné jiné aminokyseliny než jsou isoleucin, leucin a prolin.



Obr. 2. Chromatogram vzorku malty s přidavkem bílku – 1,00 hm. %

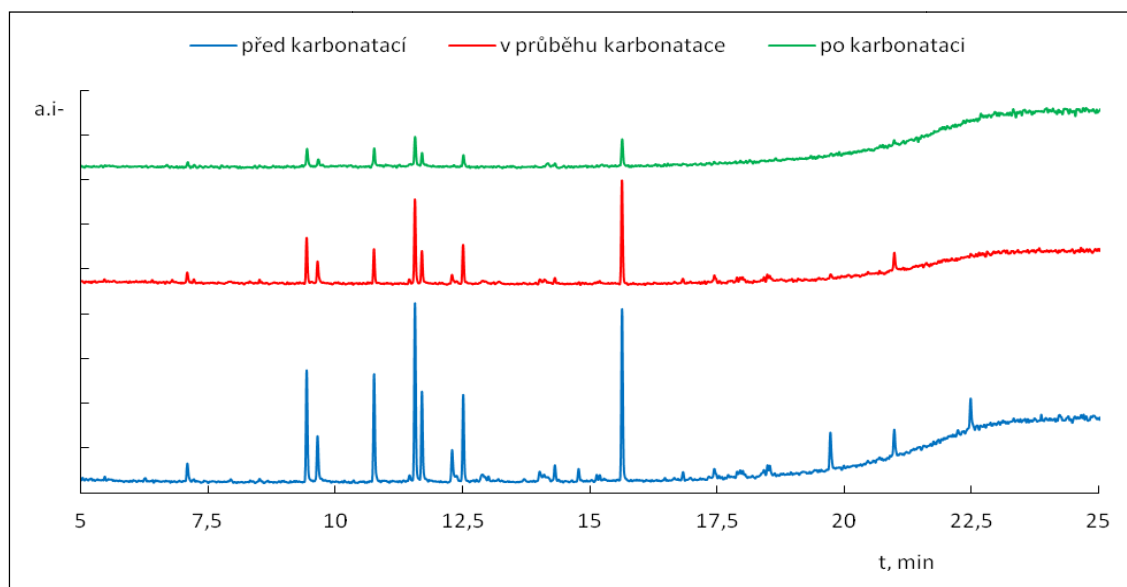


Obr. 3. Chromatogram vzorku malty s přidavkem bílku – 0,10 hm. %



Obr. 4. Chromatogram vzorku malty s přidavkem bílku – 0,01 hm. %

Proces karbonatace se na jednotlivých vzorcích projevil pouze snížením intenzity jednotlivých píku, což je patrné z obrázku 5, kde jsou pro znázornění vybrány chromatogramy malty s přidavkem bílku o 1,00 hm. % během procesu karbonatace.



Obr. 5. Porovnání vzorku bílku o 1,0 hm. % vzhledem k procesu karbonatace (před zahájením procesu karbonatace, v průběhu procesu a po skončení procesu karbonatace).

Zastoupení jednotlivých aminokyselin v každém vzorku je shrnuto v tabulce 8,

ve které je patrné, že s postupně klesající koncentrací jsou některé aminokyseliny těžko detekovatelné. Možná příčina může být, samozřejmě nízká koncentrace nebo vlivem karbonatace, kdy se může snižovat množství aditiva důsledkem zvyšování podílu anorganické složky ve vzorku. Aminokyseliny mohou také degradovat vlivem alkalického prostředí vápenné malty, světlem atd.

Tabulka 8. Zastoupení aminokyselin ve vzorcích s proteinovými aditivami.

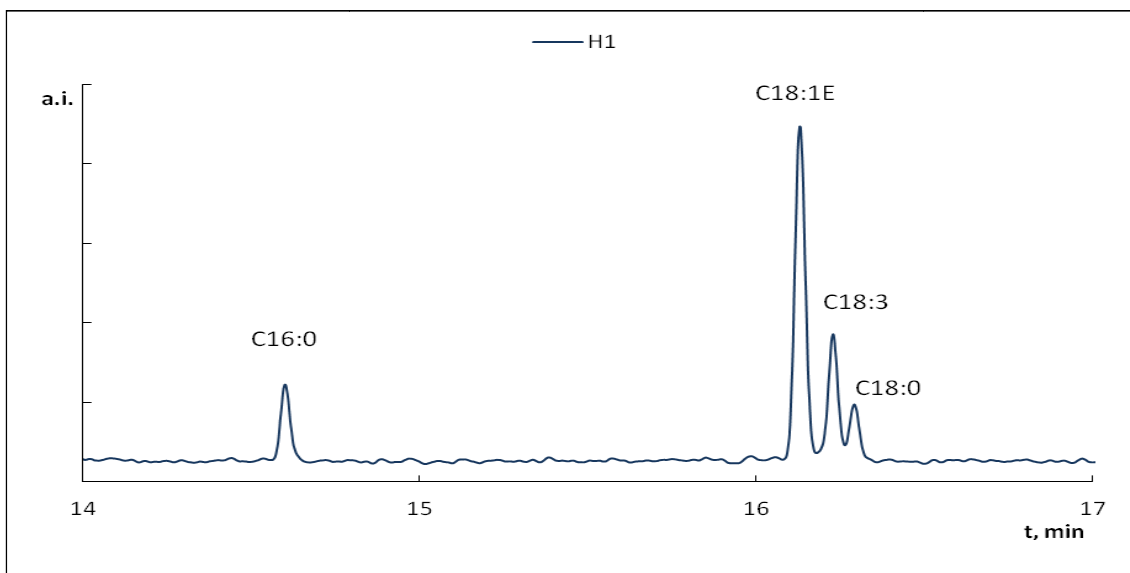
Materiál		Nalezené charakteristické aminokyseliny		
Koncentrace		1,00 %		
Obsah aditiva	před karbonatací	při karbonataci	po karbonataci	
Bílek	A,G,V,L,I,P,B,M,F,K,Y	A,G,V,L,I,P,B,F,Y	A,G,V,L,I,P,F,Y	
Kostní kliš	A,G,V,L,I,P,B,F,K,Y	A,G,V,L,I,P,F,K	A,G,V,L,I,P,F,K	
Krev	A,G,V,L,I,P,B,F,K	A,G,V,L,I,P,F,K	A,G,V,L,P,F	
Tučný tvaroh	-	-	-	
Želatina	-	-	-	
Žloutek	A,G,V,L,I,P,B,F,K,Y	A,G,V,L,I,P,B,F,Y,K	A,G,V,L,I,P,B,F,K,Y	
		0,10 %		
	před karbonatací	při karbonataci	po karbonataci	
Bílek	A,G,V,L,I,P,F,	A,G,V,L,I,P,F	A,G,V,L,P,F	
Kostní kliš	A,G,V,L,I,P,B,F,K,Y	A,G,L,I,P,F	A,G,L,I,P	
Krev	A,V,L,I,P,F,	A,V,L,P,F	A,V,L,P,F	
Tučný tvaroh	A,V,L,I,P,F	L,P,F	L,P	
Želatina	A,G,V,L,I,P,B,F,K,Y	A,G,V,L,I,P,F	A,G,L,I,P,F	
Žloutek	-	-	-	
		0,01 %		
	před karbonatací	při karbonataci	po karbonataci	
Bílek	L,I	L,I	L	
Kostní kliš	A,G,V,L,I,P,F,	L,P	L	
Krev	L,I	L	-	
Tučný tvaroh	L,P	L,P,	L	
Želatina	A,G,V,L,I,P,B,F,K,Y	A,L,I,P,F	L,I,P,F	
Žloutek	-	-	-	

U lipidových aditiv jako jsou lněný olej a sádlo bylo metodou plynové chromatografie zjištěno zastoupení mastných kyselin, které jsou shrnuty v tabulce 9. V této tabulce jsou jednotlivé mastné kyseliny značeny počtem uhlíků a počtem dvojných vazeb.

Vzhledem k tomu, že tato aditiva jsou 100% lipidy, byla lehce detekovatelná pro všechny koncentrace. Pro znázornění byl vybrán chromatogram sádla o 1,00 hm. %, které je na obrázku 6. Rozdíl mezi koncentracemi je viditelný jen z hlediska poklesu intenzity píků, a u mastných kyseliny s dvojnou nebo trojnou vazbou i poklesem pod mez detekce.

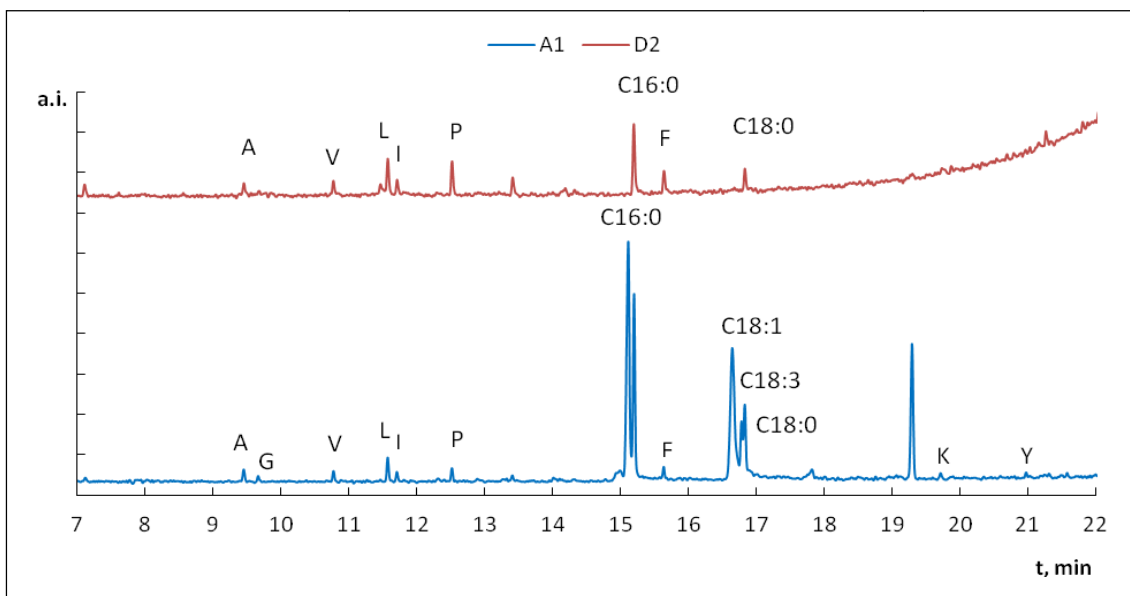
Tabulka 9. Zastoupení mastných kyselin ve vzorcích s lipidovými aditivami. Palmitová kyselina – C16:0, stearová kyselina – C18:0, olejová kyselina – C18:1(9)Z, elaidová – C18:1(9)E, linolenová kyselina – C18:3(6, 9, 12).

Materiál	Nalezené charakteristické mastné kyseliny		
	1,00 %		
Obsah			
aditiva	před karbonatací	při karbonataci	po karbonataci
Lněný olej	C16:0, C18:1Z , C18:0 C16:0, C:18:1E,	C16:0, C18:1Z , C18:0 C16:0, C:18:1E, C18:3,	C16:0, C18:1Z , C18:0 C16:0, C:18:1E, C18:3,
Sádlo	C18:3, C18:0	C18:0	C18:0
Tvaroh	-	-	-
Žloutek	C16:0, C18:1Z , C:18	C16:0, C18:1Z , C:18	C16:0, C18:1Z , C:18
	0,10 %		
	před karbonatací	při karbonataci	po karbonataci
Lněný olej	C16:0, C18:1Z , C18:0 C16:0, C:18:1E,	C16:0, C18:1Z , C18:0	C16:0, C18:1Z , C18:0
Sádlo	C18:3, C18:0	C16:0, C18:1E , C18:0	C16:0, C18:1E , C18:0
Tvaroh	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0
Žloutek	C16:0, C18:1Z , C18:0	C16:0, C18:1Z , C18:0	C16:0, C18:0
	0,01 %		
	před karbonatací	při karbonataci	po karbonataci
Lněný olej	C16:0, C18:1Z , C18:0	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0
Sádlo	C16:0, C18:1E , C18:0	C16:0, C18:1E , C18:0	C16:0, C18:0
Tvaroh	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0
Žloutek	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0	C16:0, C18:0



Obr. 6. Lipidový chromatogram vzorku malty s přidavkem sádla o 1,00 hm. %.

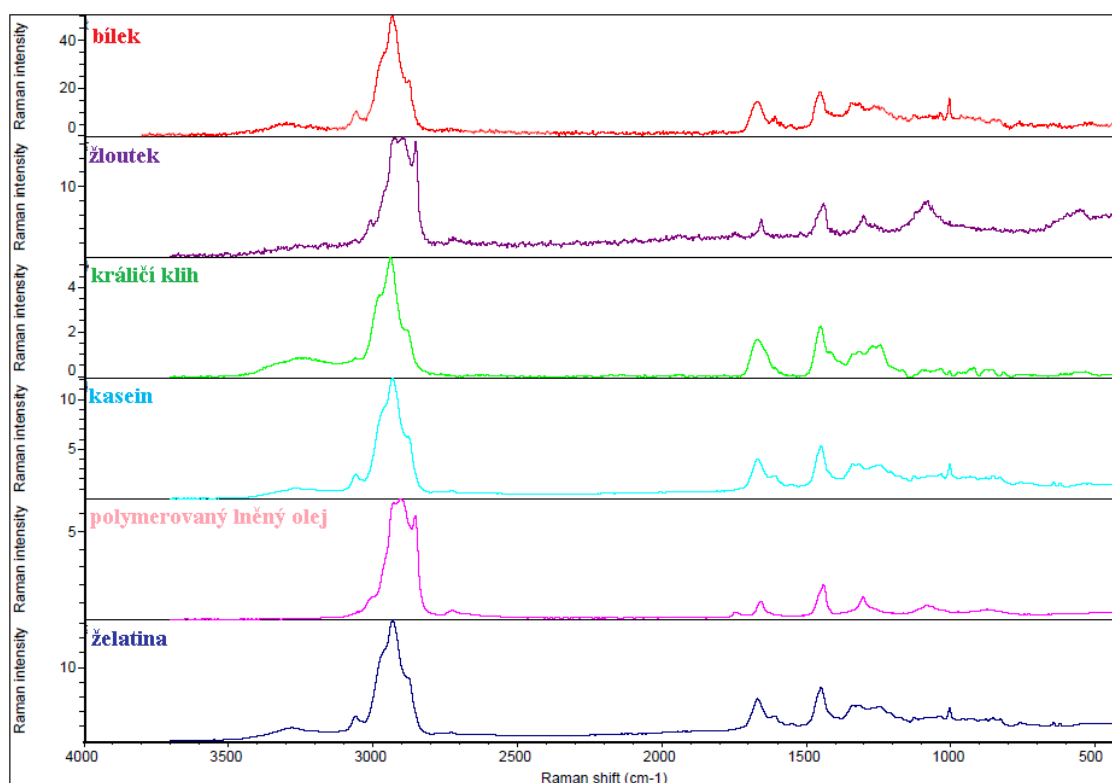
U lipidovo-proteinových aditiv jakými jsou žloutek a tvaroh, které byly podrobeny kyselé hydrolyze a následné derivatizaci, se při měření chromatogramů projeví jak aminokyseliny, tak i mastné kyseliny. Na obrázku 7 je porovnání chromatogramů vzorků malt s přidavkem žloutku 1,00 hm. % a tvarohu 0,10 hm. %.



Obr.7. Porovnání lipidovo- proteinových chromatogramů ze vzorků malt s přidavkem žloutku (A1 – 1,0 hm. %) a tvarohu (D2 – 0,1 hm. %)

5.2 Analýza aditiv metodou Ramanovy spektroskopie

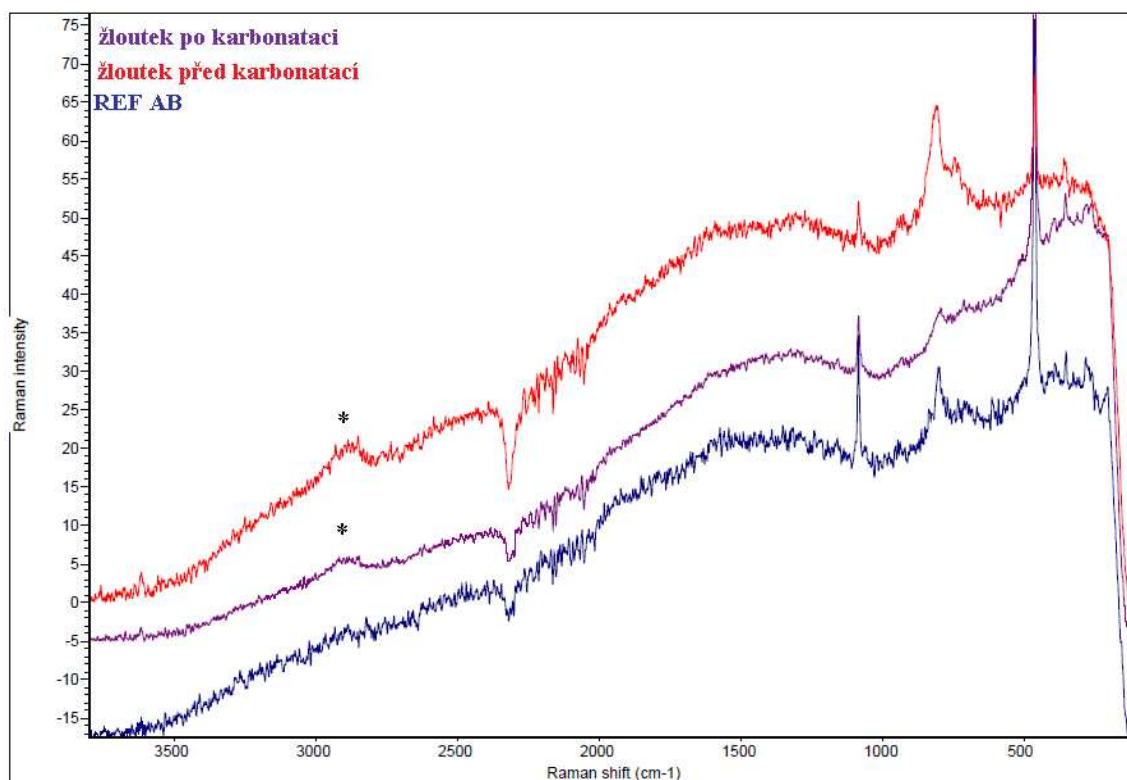
Metodou Ramanovy spektroskopie byla nejdříve změřena spektra čistých aditiv (Obrázek 8), která pak byla porovnávána se spektry modelových vzorků malt s přidávkou jednotlivých aditiv. Naměřená spektra byla získána vždy od vzorků s obsahem 1,00 hm. % organických aditiv. U vzorků malt s přidávkem tvarohu a želatiny byla získána spektra s projevy obou aditiv až od vzorků s koncentrací 0,10 hm. %. K měření byly vybrány vzorky před zahájením karbonatace a po ukončení procesu karbonatace.



Obr. 8. Spektra čistých aditiv použitých jako přísady v modelových vzorcích historických malt.

V důsledku komplexního složení vzorku, byla naměřená spektra výrazně ovlivněna fluorescencí – základní linie spektra jsou značně komplikované. Díky excitací v NIR, se také ve spektrech projeví komplikace způsobené absorpcí vodní páry (2500 – 2000 cm^{-1}). Výrazné pásy příslušející valenčním CH vibracím (2980 a 2880 cm^{-1}) byly nalezeny u lipidových aditiv – lněného oleje, sádla a žloutku. Vibrační projevy amidické vazby u proteinových aditiv nebyly zaznamenány ani u vzorků s obsahem

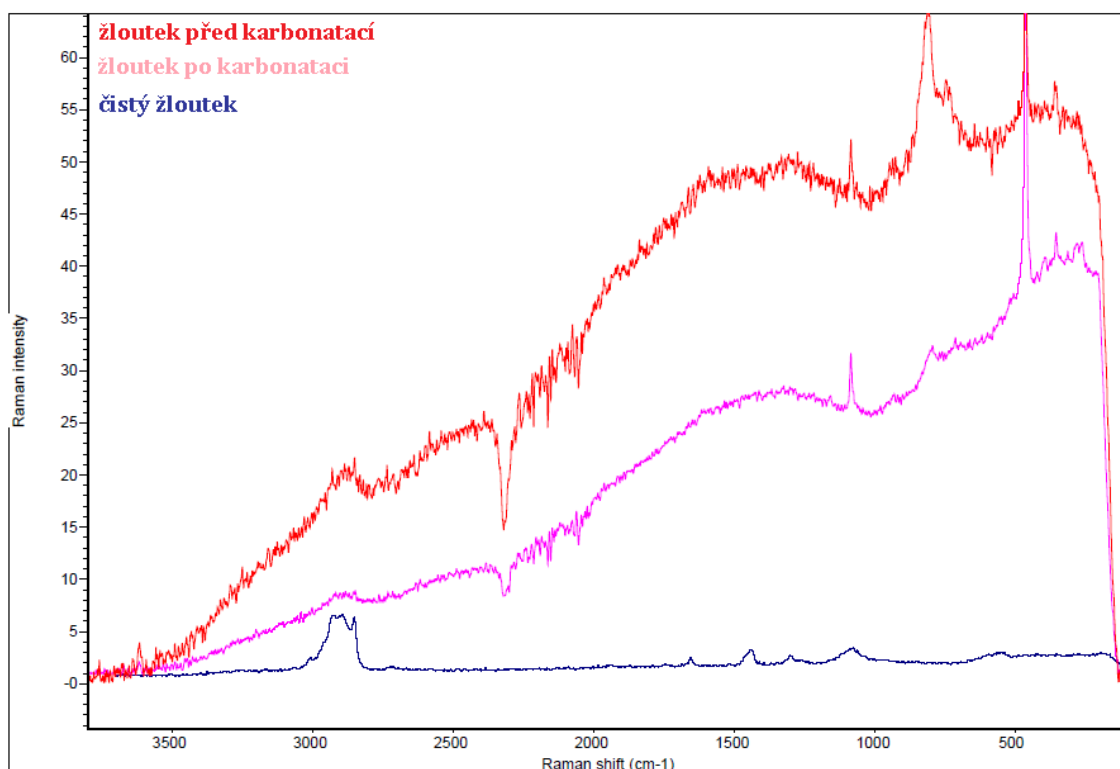
aditiva 1,00 hm. %.



Obr. 9. Porovnání Ramanových spekter žloutku před a po karbonataci. REF – referenční vzorek bez přídavku aditiva. * - spektrální projev aditiva

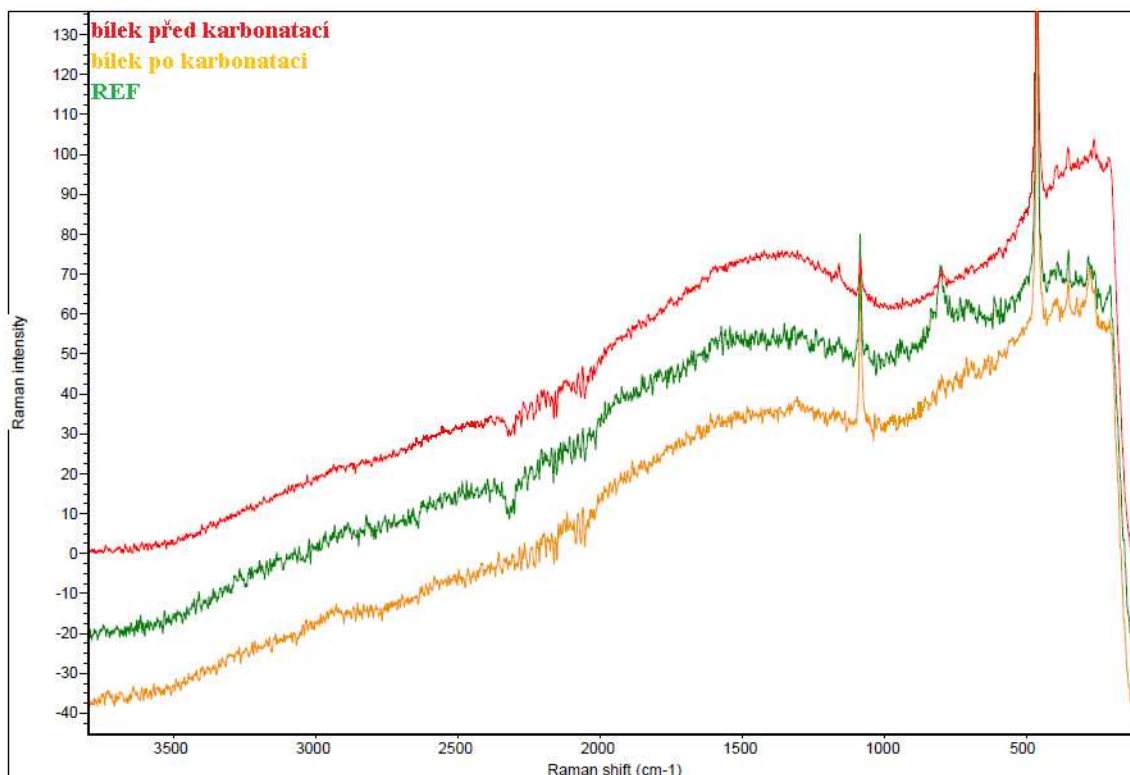
Pro posouzení změn ve spektrech při zrychlené karbonataci, byly vybrány vzorky před a po ošetření. Nejprve byly změřeny vzorky s minimální karbonatací (ihned po vyschnutí záměsové vody, vzorek nebyl zrychleně karbonatován; cca po 2,5 měsících od přípravy) a poté při 100% karbonataci (po 5 měsících od přípravy). Tato měření byla provedena pro modelové vzorky malt s přídavkem jednotlivých aditiv o 1,00 hm. %. Pouze u vzorku želatiny a tvarohu byly použity vzorky o 0,10 hm. %. U všech studovaných vzorků byl zjištěn vzrůst uhličitanového píku v důsledku karbonatace (1080 cm^{-1}). Byly také pozorovány změny intenzit u pásů odpovídajících projevům SiO_2 pocházejícího z písku ($800 - 900, 460\text{ cm}^{-1}$). Tyto projevy jsou pravděpodobně spojeny se změnou morfologie vzorku při přípravě vzorku (stárnutí, homogenizace, atd.). Jako ilustrativní příklad jsou na obrázku 9 zobrazena spektra žloutku s 1,00 hm. % před zahájením procesu karbonatace a po jeho ukončení. Na tomto obrázku je karbonatace patrná zvýšením uhličitanového píku při 1080 cm^{-1} . Projev

valenčních vibrací při 2980 a 2880 cm^{-1} přísluší CH vibracím. To, že se jedná o aditivum žloutku, je patrné z obrázku 10.

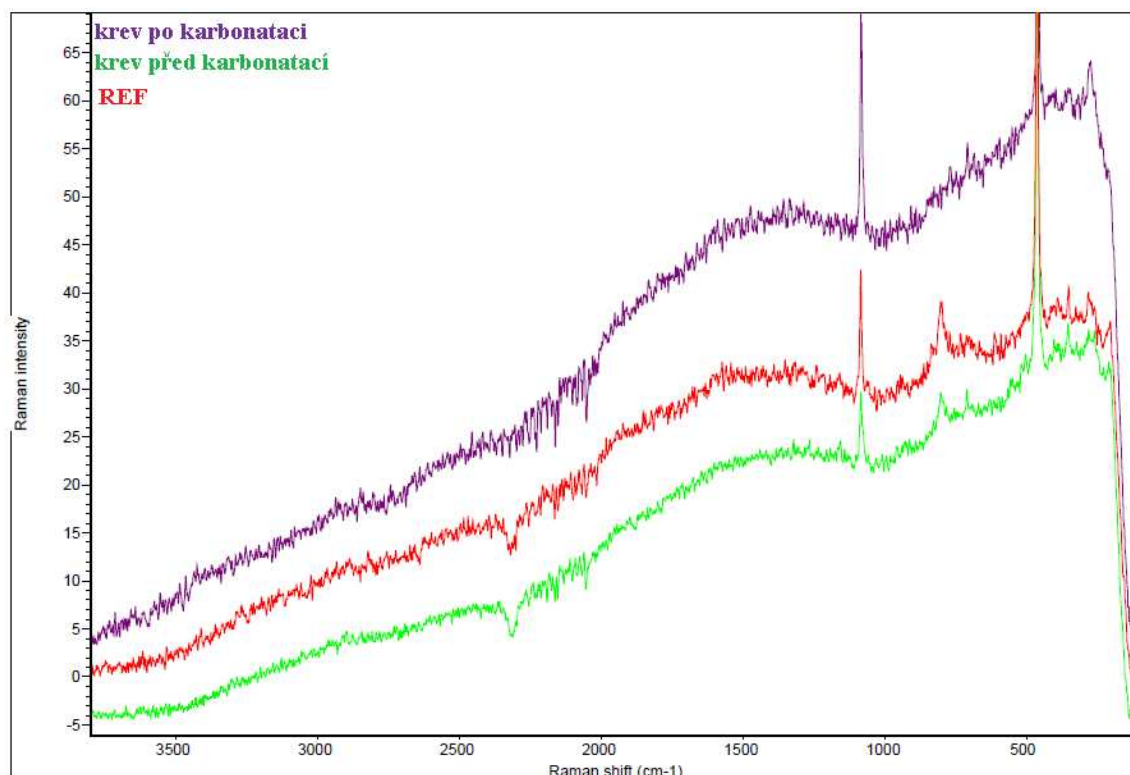


Obr. 10. Porovnání spekter malt s přidavkem žloutku (1 hm. %) se spektrem čistého žloutku.

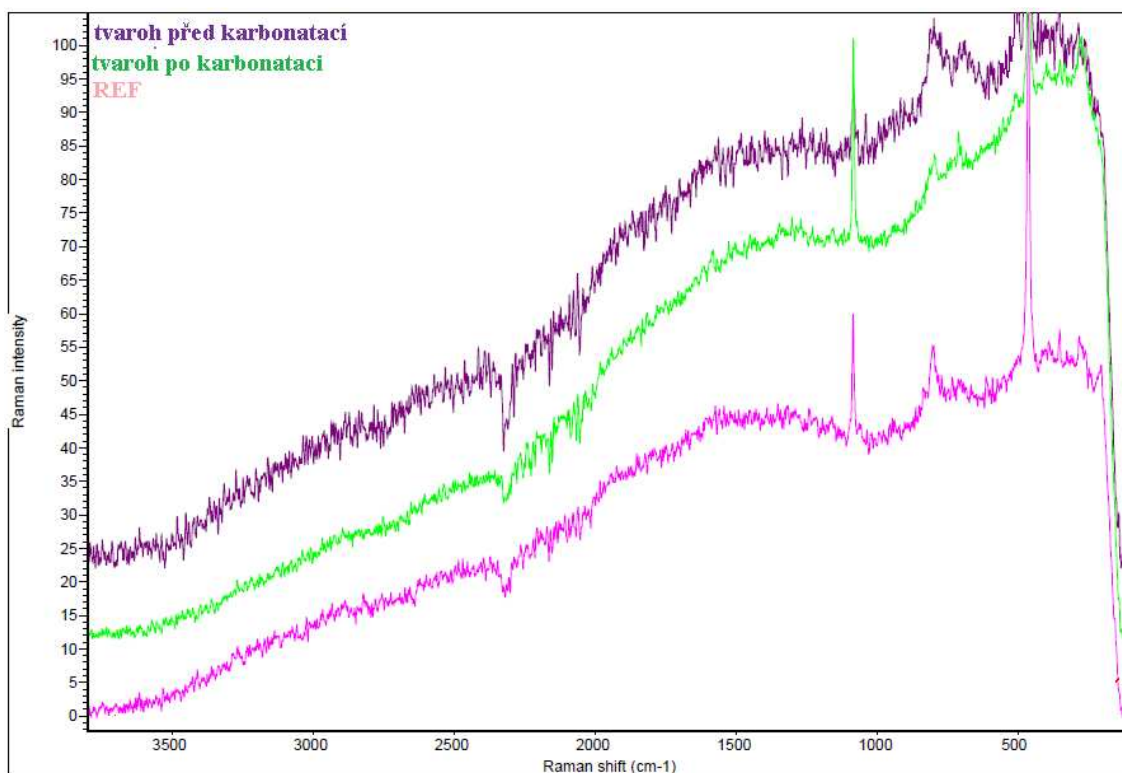
Na obrázcích 11–15 jsou zobrazeny spektra malt s přidavkem proteinového aditiva (bílek, krev, tvaroh, želatina a klij) v porovnání se spektrem referenčního vzorku malty. Z obrázků je patrné, že ve spektrech nejsou žádné projevy amidické vazby, jež by měly příslušet proteinovým aditivům. Je zde patrný pouze vliv karbonatace, a to zvýšením uhličitánového píku při 1080 cm^{-1} . Byly měřeny vzorky s 0,10 hm. % tvarohu a želatiny, ale nebyly zaznamenány žádné spektrální projevy u této koncentrace, což je také důvod, proč byly měřeny pouze vzorky o nejvyšší koncentraci (1,00 hm. %).



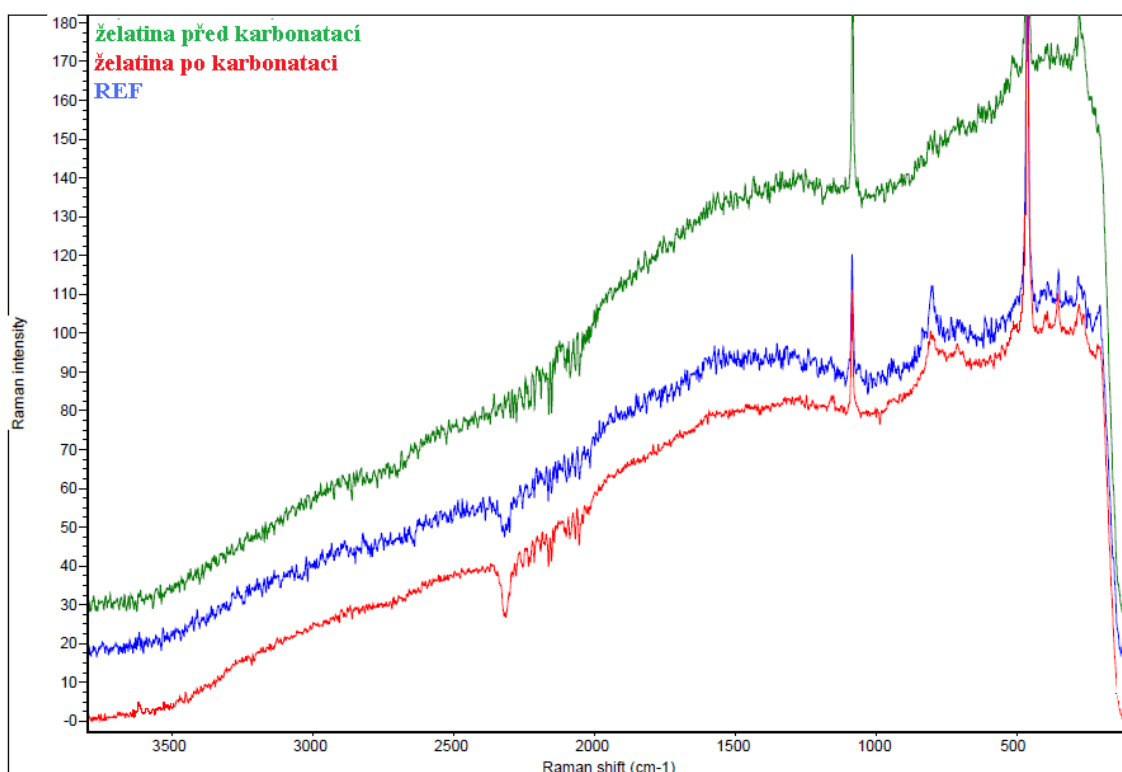
Obr. 11. Porovnání spekter malt s přidavkem bílku (1 hm. %) se spektrem referenčního vzorku malty.



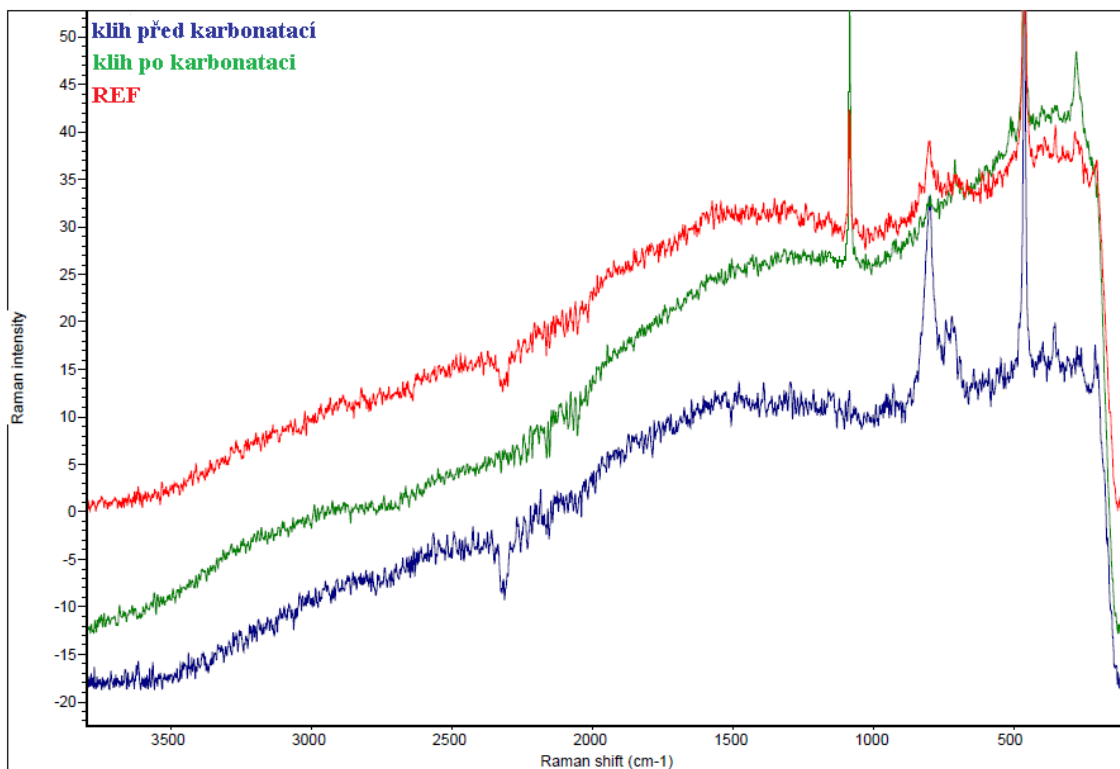
Obr. 12. Porovnání spekter malt s přidavkem krve (1 hm. %) se spektrem referenčního vzorku malty



Obr. 13. Porovnání spekter malt s přidavkem tvarohu (0,1 hm. %) se spektrem referenčního vzorku malty.



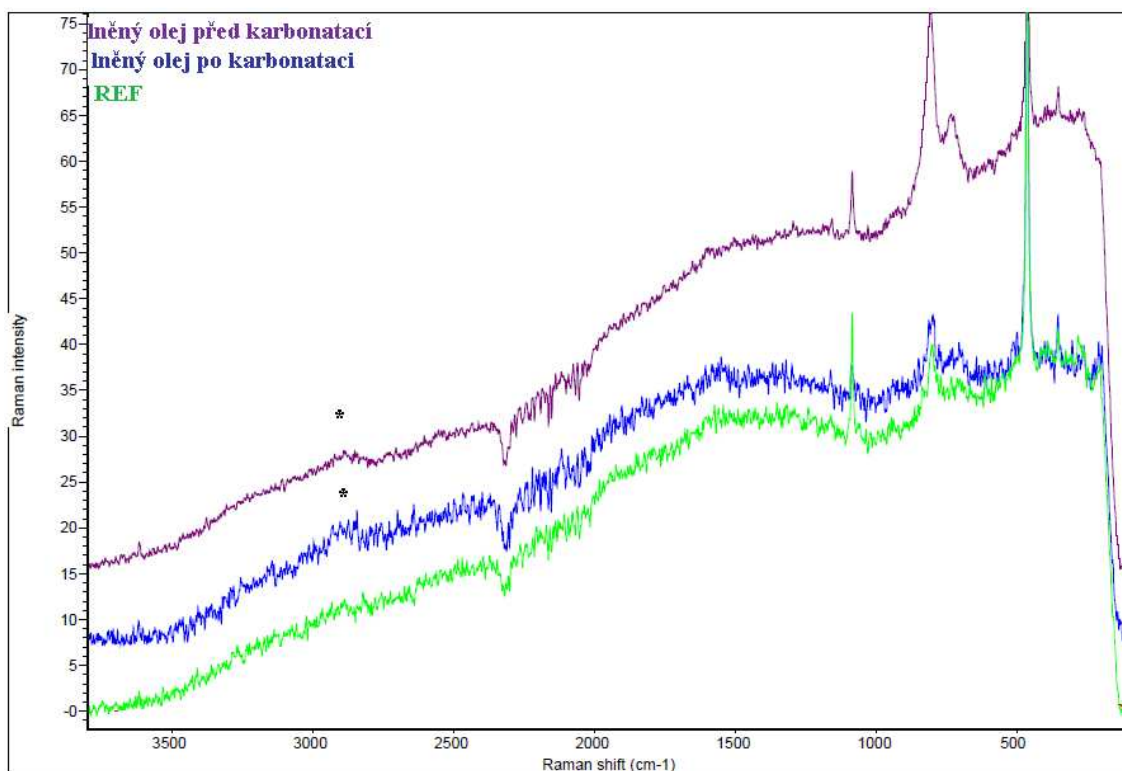
Obr. 14. Porovnání spekter malt s přidavkem želatiny (0,1 hm. %) se spektrem referenčního vzorku malty.



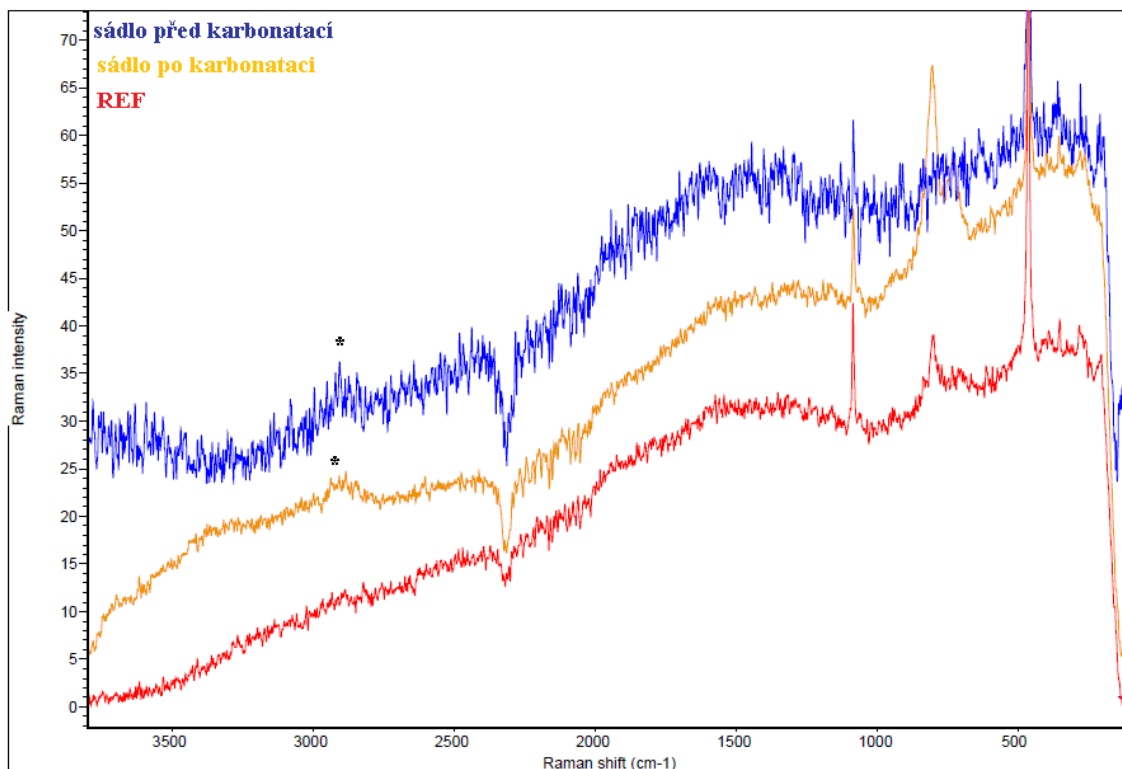
Obr. 15. Porovnání spekter malt s přísávkem klišu (1 hm. %) se spektrem referenčního vzorku malty.

Na obrázcích 16 a 17 jsou znázorněna spektra malt s přísávkou lipidových aditiv (lněný olej a sádlo) ve srovnání se spektrem referenčního vzorku malty. Na obou spektrech jsou pozorovatelné CH valenční vibrace při 2980 a 2880 cm⁻¹ a zároveň je patrný vliv karbonatace při 1080 cm⁻¹.

Metodou Ramanovy spektroskopie, je možné určit přítomnost organického aditiva pouze v případě, jedná-li se o lipidové aditivum. Valenční vibrace CH skupin při 2980–2880 cm⁻¹ jsou pozorovatelné jen u vzorků o 1,00 hm. %. Důsledek zrychlené karbonatace lze zaznamenat pouze zvýšením uhličitanového píku při 1080 cm⁻¹ a nemá výrazný vliv na určení organického aditiva.



Obr. 16. Spektrum malty s přidavkem lněného oleje (1 hm. %) se spektrem referenčního vzorku malty. * - spektrální projevy aditiva



Obr. 17. Spektrum malty s přidavkem sádla (1 hm. %) v porovnání se spektrem referenčního vzorku malty. * - spektrální projevy aditiva

5.3 Porovnání Ramanovy spektroskopie a plynové chromatografie

Porovnání obou dvou metod použitých k identifikaci organických aditiv v modelově připravených vzorcích historických malt je shrnuto v tabulce 10, ze které je patrné, že pro identifikaci organických aditiv je vhodnější plynová chromatografie s hmotnostní detekcí než Ramanova spektroskopie.

Tab. 10. Porovnání identifikace organických aditiv metodami Ramanovy spektroskopie a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. (X – identifikovaná přítomnost aditiva, p – proteinové aditivum, l – lipidové aditivum)

Aditivum	Dávkování (hm. %)	Ramanova spektroskopie	GC-MS (p / l)
bílek	1,0	-	X / -
	0,1	-	X / -
	0,01	-	- / -
kostní kliš	1,0	-	X / -
	0,1	-	X / -
	0,01	-	- / -
krev	1,0	-	X / -
	0,1	-	X / -
	0,01	-	- / -
lněný olej	1,0	X	- / X
	0,1	-	- / X
	0,01	-	- / X
sádlo	1,0	X	- / X
	0,1	-	- / X
	0,01	-	- / X
tvaroh	1,0	-	- / -
	0,1	-	X / X
	0,01	-	- / X
želatina	1,0	-	- / -
	0,1	-	X / -
	0,01	-	- / -
žloutek	1,0	X	X / X
	0,1	-	X / X
	0,01	-	- / X

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem diplomové práce bylo posouzení možností Ramanovy spektroskopie a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí při identifikaci proteinových a lipidových aditiv v modelových vápenných maltách, a zjištění procentuálního obsahu aditiv, při kterých je možné tato aditiva v připravených vzorcích malt ještě spolehlivě identifikovat.

Metodou Ramanovy spektroskopie se podařilo dokázat, že lze určit přítomnost organického aditiva, respektive jen lipidového, od řádu jednotek hmotnostního procenta. U této koncentrace bylo možné nalézt pouze pásy příslušející valenčním CH vibracím, které jsou přítomny ve všech organických látkách. V případě aditiva proteinového nebylo možné prokázat přítomnost jakéhokoliv spektrálního projevu. Důsledek zrychlené karbonatace neměl vliv na výrazné změny spekter, jediný pozorovatelný projev karbonatace bylo zvýšení uhličitanového píku při 1080 cm^{-1} .

U plynové chromatografie, lze detekovat lipidové aditivum už od řádu setin hmotnostního procenta. Rozlišení proteinových aditiv lze až od řádu desetin hmotnostního procenta, pouze od řádu jednotek hmotnostního procenta lze říci, o jaké aditivum se jedná. Vliv karbonatace se u této metody projevil pouze snížením intensity píků a neměl výrazný vliv na změny chromatogramů.

Na základě získaných výsledků se podařilo ověřit, že metoda plynové chromatografie je pro identifikaci organických aditiv v uměleckých dílech vhodnější než metoda Ramanovy spektroskopie (tabulka 10).

7 LITERATURA

1. Budak M.; Akkurt S.; Böke H.: Evaluation of heat treated clay for potential use in intervention mortars. *Applied Clay Science*, **49**: 414–419 (2010)
2. Arioglu N.; Acun S.: A research about a method for restoration of traditional lime mortars and plasters: A staging system approach. *Building and Environment*, **41**: 1223–1230 (2006)
3. <http://tpm.fsv.cvut.cz/vyuka/ychs/prednIV.pdf> (24.6.2012)
4. Gleize P.J.P.; Motta E.V.; Silva D.A.; Roman H.R.: Characterization of historical mortars from Santa Catarina (Brazil). *Cement & Concrete Composites*, **31**: 342–346 (2009)
5. Gosselin C.; Verges-Belmin V.; Royer A.; Martinet G.: Natural cement and monumental restoration. *Materials and Structures*, **42**:749–763 (2009)
6. Jasiczak J.; Zielinski K.: Effect of protein additive on properties of mortar. *Cement & Concrete Composites*, **28**: 451–457 (2006)
7. Chandra S.; Aavik J.: Influence of proteins on some properties of portland cement mortar. *The International Journal of Cement Composites and Lightweight Concrete*, **9**: 91–94 (1987)
8. Sanjurjo-Sánchez J.; Trindade M.J.; Blanco-Rotea R.; Benavides Garcia R.; Fernández Mosquera D.; Burbidge C.; Prudêncio M.I.; Dias M.I.: Chemical and mineralogical characterization of historic mortars from the Santa Eulalia de Bóveda temple, NW Spain. *Journal of Archaeological Science*, **37**: 2346–2351 (2010)
9. Kučková Š.; Crhová M.; Vaňková L.; Hnízda A.; Hynek R.; Kodíček M.: Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials. *International Journal of Mass Spectrometry*, **284**: 42–46 (2009)
10. Elsen J.: Microscopy of historic mortars — a review. *Cement and Concrete Research*, **36**: 1416–1424 (2006)
11. Mateo Castro R.; Doménech Carbó M.T.; Peris Martínez V.; Gimeno Adelantado J.V.; Bosch Reig F.: Study of binding media in works of art by gas chromatographic analysis of amino acids and fatty acids derivatized with ethyl chloroformate. *Journal of Chromatography A*, **778**: 373–381 (1997)
12. Rovnaníková P.: *Omítky, chemické a technologické vlastnost*. STOP PRAHA (2002)

13. www.agritech.tnau.ac.in/postharvest/pht_anifoods_poul_egg.html (25.6.2012)
14. KODÍČEK, M. *plasma krevní*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2012-05-08]. Available from [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=plasma_krevni>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=plasma_krevni)
15. KODÍČEK, M. *albumin sérový*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2012-05-08]. Available from [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=albumin_serovy>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=albumin_serovy)
16. <http://vladahadrava.xf.cz/mleko.html> (25.6.2012)
17. <http://www.mercatores.cz/remesla-a-materialy/lepidla-laky-a-tmely/kostni-klih.html> (25.6.2012)
18. <http://www.hages.cz/katalogy/zelatina.pdf> (25.6.2012)
19. <http://www.celostnimediceina.cz/lney-olej.htm> (25.6.2012)
20. <http://www.nutricoach.cz/sadlo--c76> (25.6.2012)
21. Zeng Y.; Zhang B.; Liang X.: A case study and mechanism investigation of typical mortars used on ancient architecture in China. *Thermochimica Acta*, **473**: 1–6 (2008)
22. Colombini M.P.; Modugno F.: Characterisation of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques. *Journal of Separation Science* **27**: 147–160 (2004)
23. Nevin A.; Osticioli i.; Anglos D.; Burnstock A.; Cather S.; Castellucci E.: Raman Spectra of Proteinaceous Materials Used in Paintings: A Multivariate Analytical Approach for Classification and Identification. *Analytical Chemistry*, **79**: 6143-6151 (2007)
24. Colombini M.P.; Modugno F.; Menicagli E.; Fuoco R.; Giacomelli A.: GC – MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artifacts. *Microchemical Journal*, **67**: 291–300 (2000)
25. Colombini M.P.; Modugno F.; Giacomelli M.; Francesconi S.: Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **846**: 113–124 (1999)

26. Peris-Vincente J.; Gimeno Adelantado J.V.; Doménech Carbó M.T.; Mateo Castro R.; Bosch Reig F.: Characterization of proteinaceous glues in old paintings by separation of the *o*-phtalaldehyde derivatives of their amino acids by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*, **68**: 1648–1654 (2006)
27. Fremout W.; Kučková Š.; Crhová M.; Sanyová J.; Saverwyns S.; Hynek R.; Kodíček M.; Vandenaabeele P.; Moens L.: Classification of protein binders in artist's paints by matrix – assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry : an evaluation of principal component analysis (PCA) and soft independent modelling of class analogy (SIMCA). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25**: 1631–1640 (2011)
28. Hill L.: Hydrolysis of Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, **20**: 37 (1965)
29. Colombini M.P.; Fuoco R.; Giacomelli A.; Muscatello B.: Characterization of proteinaceous binders in wall painting samples by microwave-assisted acid hydrolysis and GC-MS determination of amino acids. *Studies in Conservation*, **43**: 33–41 (1998)
30. White R.: The characterization of proteinaceous binders in art objects. National Gallery Technical Bulletin, **8**: 5–14 (1984)
31. Nowik W.: Acides amines et acides gras sur un même chromatogramme: un Autre Regard sur l'Analyse des liants en peinture. *Studies in Conservation*, **40**: 120–126 (1995)
32. Casoli A.; Mirti P.; Palla G.: Characterization of medieval proteinaceous painting media using gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **352**: 372–379 (1995)
33. Příkryl P.; Havlíčková L.; Pacáková V.; Hradilová J.; Štulík K.; Hořta P.: An evaluation of GC-MS and HPLC-FD methods for analysis of proteins binders in paintings. *Journal of Separation Science*, **29**: 2653 – 2663 (2006)
34. Wouters J.; Van Bos M.; Lamens K.: Baroque stucco marble decorations. I. Preparation of laboratory replicas and establishment of criteria for analytical evaluation of organic materials. *Studies in Conservation*, **45**: 106–116 (2000)

35. Schilling M.R.; Khanjian H.P.; Souza L.A.C.: Gas chromatographic analysis of amino acids as ethyl chloroformate derivatives. Part 1: Composition of proteins associated with art objects and monuments. *Journal of the American Institute for Conservation*, **35**: 45–59 (1996)
36. Ronca F.: Protein determination in polychromed stone sculptures, stuccoes and gesso grounds. *Studies in Conservation*, **39**: 107–120 (1994)
37. Jurado-Lopez A.; Luque de Castro M.D.: Optimisation of focused microwave digestion of proteinaceous binders prior to gas chromatography. *Talanta*, **65**: 1059–1062 (2005)
38. Kenndler E.; Schmidt Beiwl K.; Mairinger F.; Pöhm M.: Identification of proteinaceous binding media of easel paintings by gas chromatography of amino acid derivatives after catalytic hydrolysis by a protonated cation exchanger. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **342**: 135–141 (1992)
39. Schneider U.; Kenndler E.: Identification of plant and animal glues in museum objects by GC-MA, after catalytic hydrolysis of the proteins by the use of a cation exchanger, with simultaneous separation from the carbohydrates. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **371**: 81–87 (2001)
40. Pickering M.V.; Newton P.: Amino acid hydrolysis: old problems, new solutions. LC-GC. *International*, **3**: 11 22–26 (1990)
41. Molnar-Perl I.: Advances in the high-performance liquid chromatographic determination of phenylthiocarbamyl amino acids. *Journal of Chromatography, A*, **661**: 43–50 (1994)
42. Sánchez-Machado D.I.; Chavira-Willys B.; López-Cervantes J.: High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for quantitation of tryptophan and tyrosine in a shrimp waste protein concentrate. *Journal of Chromatography B*, **863**: 1 88–93 (2008)
43. Slatter D.A.; Avery N.C.; Bailey A.J.: Collagen in its fibrillar state is protected from glycation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **40**: 10 2253–2263 (2008)
44. Artuga R.; Mirti P.; Casoli A.; Palla G.: Classification of ancient proteinaceous painting media by the joint use of pattern recognition and factor analysis on GC/MS data. *Journal of Analytical Chemistry*, **365**: 559–566 (1999)

45. Singer B.; McGuigan R.: the simultaneous analysis of proteins, lipids, and diterpenoid resins found in cultural objects. *Annali di Chimica*, **97**: 405–417 (2007)
46. Scott D.A.; Dennis M.; Keeney J.; Khandekar N.; Carson D.: Technical examination of an Egyptian cartonnage of the Greco-Roman period. *Studies in Conservation*, **48**: 41–56 (2003)
47. Schilling M.R.: *Workshop on Binding Media Identification in Art Objects*. LabSTECH European infrastructure cooperation network, 24–26 March, Amsterdam (2003)
48. Andreotti A.; Bonaduce I.; Colombini M.P.; Gautier G.; Modugno F.; Ribecchini E.: Combined GC-MS analytical procedure for the characterization of glycerolipid, waxy, resinous, and proteinaceous materials in a unique pain microsample. *Analytical Chemistry*, **78**: 4490–4500(2006)
49. Hušek P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *Journal of Chromatography B*, **717**: 57–91 (1998)
50. Hušek P.; Matucha P.; Šimek P.: Smooth esterification of di- and tricarboxylic acids with methyl chloroformates in gas chromatographic profiling of urinary acidic metabolites. *Chromatographia*, **58**: 623–630 (2003)
51. Hušek P.; Šimek P.; Hartvich P.; Zahradníčková H.: Fluoroalkyl chloroformates in treating amino acids for gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, **1186**: 391–400 (2008)
52. Casoli A.; Musini P. C.; Palla G.: Gas chromatographic – mass spectrometric approach to the problem of characterizing binding media in paintings. *Journal of Chromatography A*, **731**: 237–246 (1996)
53. Castellani L.; Ferrantelli P.; Sinibaldi M.; Vigliano G.: Identification of proteinaceous adhesives in the wooden backing of Piero della Francesca's painting Pala of Saint Bernardino: a gas chromatographic study. *Journal of Cultural Heritage*, **2**: 209–215 (2001)
54. De la Cruz-Canizares J.; Doménech-Carbó M. T.; Gimeno-Adelantado J. V.; Mateo-Castro R.; Bosch-Reig F.: Suppression of pigment interference in the gas chromatographic analysis of proteinaceous binding media in paintings with EDTA. *Journal of Chromatography A*, **1025**: 277–285 (2004)

55. Colombini M.P.; Modugno F.; Fuoco R.; Tognazzi A.: A GC-MS study on the deterioration of lipidic paint binders. *Microchemical Journal*, **73**: 175–185 (2002)
56. Blaško J.; Kubinec R.; Husová B., Přikryl P.; Pacáková V.; Štulík K.; Hradilová J.: Gas chromatography/mass spectrometry of oils and oil binders in paintings. *Journal of Separation Science*, **31**: 1067 – 1073 (2008)
57. Spades S.; Russ J.: GC-MS analysis of lipids in prehistoric rock paints and associated oxalate coatings from the Lower Pecos region, Texas. *Archaeometry*, **47**:1 115–126 (2005)
58. De Gelder J.; De Gussem K.; Vandenabeele P.; Moens L.: Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman spectroscopy*, **38**: 1133–1147 (2007)
59. Burgio L.; Clark R. J. H.: Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation. *Spectrochimica Acta Part A*, **57**: 1491–1521 (2001)
60. Omnic version 8.3, Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI, USA, 1992 – 2011