

UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Analýsa pigmentů a pojiv v barevné vrstvě
uměleckých děl**

Vypracovala: Mgr. Štěpánka Kučková

Vedoucí disertační práce: Prof. Věra Pacáková, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně, a že jsem použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne 20. května 2006

Štěpánka Klíčková

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce Prof. Věře Pacákové, CSc. za bezproblémové vedení a odborné připomínky. Mým neoficiálním konsultantům Dr. Ivanu Němcovi z katedry anorganické chemie PřF UK a Prof. Milanu Kodíčkovi z Fakulty potravinářské a biochemické technologie VŠCHT v Praze za neobyčejnou ochotu projevenou během konzultací, cenné rady a vytvoření velmi přátelské atmosféry. Dále děkuji Prof. Marii Terese Doménech-Carbó z Universidad Politecnica de Valencia ve Španělsku za umožnění studijního pobytu a odborné vedení. Restaurátorské škole malby Akademie výtvarných umění Prof. Karla Strettiho děkuji za poskytnutí referenčních a reálných vzorků. A také Dr. Petru Bezdičkovi z Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži za určení fázového složení barevných vrstev.

V neposlední řadě srdečně děkuji všem svým blízkým za jejich podporu během studia.

Vliv anorganických pigmentů na identifikaci a stárnutí diterpenních a triterpenních pryskyřičných pojiv používaných v uměleckých dílech

1. Úvod.....	1
2. Experimentální část.....	5
2.1 Chemikálie a rozpouštědla	5
2.2 Ostatní materiál	5
2.3 Příprava a popis vzorků.....	5
2.4 Plynový chromatograf a podmínky měření	6
2.5 Příprava vzorků pro GC-MS	7
2.6 Výpočet relativního zastoupení jednotlivých látek	7
2.7 Výpočet relativního úbytku terpenových látek po umělém stárnutí	8
2.8 Výpočet chromatografických dat	8
2.9 Výpočet statistických údajů	8
3. Výsledky a diskuse.....	10
3.1 Analýza nestárnutých modelových směsí kalafuny s anorganickými pigmenty.....	11
3.2 Analýza nestárnutých modelových směsí mexického kopálu s anorganickými pigmenty.....	14
3.3 Analýza uměle stárnutých vzorků kalafuny a jejích modelových směsí s pigmenty	22
3.4 Analýza uměle stárnutých vzorků mexického kopálu a jeho modelových směsí s anorganickými pigmenty	24
3.5 Analýza vzorků kalafuny s příměsí měďenky po přidavku EDTA.....	26
3.6 Analýza vzorků mexického kopálu s příměsí měďenky po přidavku EDTA	27
4. Závěr.....	28
5. Literatura	29
6. Seznam použitých zkratk.....	32

Analýza červených a modrých barviv a pigmentů obsažených v barevných vrstvách uměleckých děl

1. Úvod	33
1.1 Modré pigmenty	36
1.1.1 Pruská modř	36
1.1.2 Ftalocyanin měďnatý	37
1.1.3 Indigo	37
1.2 Červené pigmenty a barviva	38
1.2.1 Kyselina karmínová	39
1.2.2 Kyselina lakaová	40
1.2.3 Pyronová barviva	40
1.3 Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování	41
2. Chemikálie a materiál	42
2.1 Červená organická barviva a pigmenty	42
2.2 Příprava modelových vzorků neminerálních modří	43
2.3 Příprava modelových vzorků organických červení	44
2.4 Reálné vzorky	45
3. Příprava vzorků a analytické metody	46
3.1 Příprava vzorků	46
3.2 Promývací a zahušťovací roztoky pro reversní fázi ZipTip	47
3.3 Popis použitých analytických metod	48
4. Výsledky a diskuse	49
4.1 Infračervená spektroskopie	49
4.1.1 Nestárnuté vzorky	50
4.1.2 Stárnuté vzorky	52
4.1.3 Analýza reálných vzorků pomocí infračervené spektroskopie	54
4.2 Vliv umělého stárnutí na spektrofotometrické vlastnosti modrých vrstev	57
4.2.1 Ftalocyanin měďnatý	57
4.2.2 Pruská modř	57
4.2.3 Indigo	57
4.3 Identifikace modrých barviv pomocí MALDI-TOF MS	61

4.3.1 Nestárnuté vzorky	63
4.3.2 Stárnuté vzorky	65
4.4 Identifikace přírodních červených barviv a pigmentů.....	67
4.4.1 Identifikace červených barviv a pigmentů infračervenou spektroskopií	67
4.4.2 Identifikace červených barviv a pigmentů pomocí MALDI-TOF MS	68
5. Závěr.....	72
6. Literatura	75
7. Seznam použitých zkratk.....	78
8. Obrazová příloha	79

Vliv anorganických pigmentů na identifikaci a stárnutí diterpenních a triterpenních pryskyřičných pojiv používaných v uměleckých dílech

2

1. Úvod

Přírodní pryskyřice se při tvorbě uměleckého díla často používají jako závěrečné laky, lazury nebo jako součásti pojiv. Dekorativní kolorované laky byly připravovány přidáním pigmentu do směsi pryskyřice (nejčastěji kalafuny) s polymerovaným olejem [1,2]. Hlavním účelem, ke kterému se používají pryskyřičné závěrečné laky, je ochrana uměleckého díla před nepříznivými vlivy prostředí. Nepříznivé okolní podmínky zapříčiňují stárnutí pryskyřic, které se projevuje hlavně změnou jejich chemického složení a barvy. Převážně oxidačními procesy bezbarvý lak zežloutne a může i zkřehnout. Změna barevného tónu laku pak negativně ovlivňuje celkový charakter malby. Pryskyřice se používají i jako pojiva pro určité pigmenty, např. pro měďnaté pigmenty. Nově vytvořená barvicí látka se pak nazývá měďnatý resinát. Nejstarší recept na přípravu měďnatého resinátu pochází ze 17. století od De Mayerna [3]. Van den Berg [4] zaznamenal dva rozdílné postupy přípravy zelené měďnaté lazury. Prvním receptem je přidání měďnatého pigmentu (měděnka, chlorid měďnatý atd.) k předem připravenému olejovopryskyřičnému laku. Druhou metodou je přidání měďnatého resinátu přímo do viskózního vysychavého oleje. Resinátové pigmenty jsou komerčně vyráběny od minulého století dvěma způsoby. Prvním způsobem je přidání kovové soli do rozpuštěné pryskyřice a druhým je přidání kovové soli do vařící zalkalizované pryskyřice, kterou bývá převážně kalafuna [5].

Kalafuna je diterpenní pryskyřice, která obsahuje převážně bicyklické látky zvané lambdany a tricyklické kyseliny zvané pimarany a abietany [6]. Mezi triterpenní pryskyřice řadíme mexický kopál, který, jak název napovídá, pochází z Mexika, kde se mu říká “copal”, z rostliny třídy Burseraceae [7]. Tento pryskyřičný materiál je znám již od dob starých Aztéků pod obecným názvem “copalli” [7]. Mexičtí umělci [8] používají dosud kopál, který je tam lehce dostupný, jako pojivo ve směsi se lněným olejem, voskem, nebo jinými triterpenními pryskyřicemi, jako je manilská elemi, damara a mastix. Mexickému kopálu se v Čechách říká “kočárový lak”, protože díky své tvrdosti a vysoké odolnosti byl často používán právě na lakování kočárů.

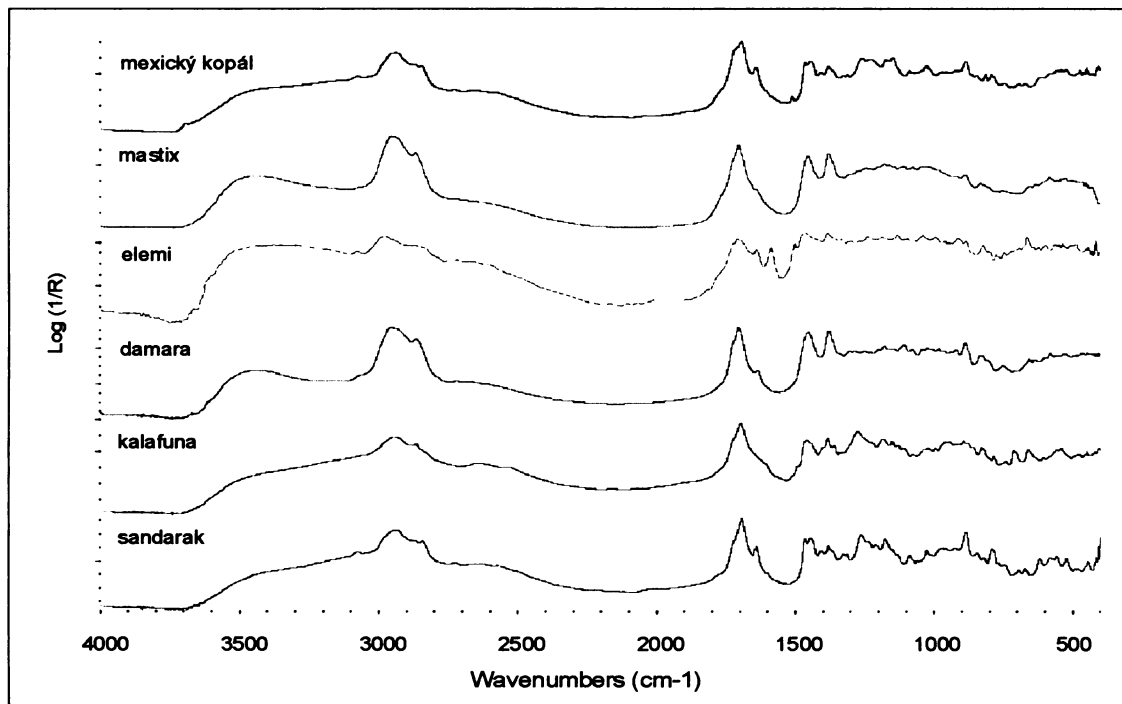
Strukturní a stereochemické vlastnosti triterpenů obsažených například v mexickém kopálu, damaře nebo mastixu jsou podrobně popsány v člancích [9,10,11]. Jiné diterpenní kopálové pryskyřice byly studovány převážně FT-Ramanovou spektroskopií a bylo zjištěno, že rozdíly mezi nimi jsou způsobeny spíše stupněm jejich zrání než jejich původem z různých geografických míst [12]. FT-Ramanova spektroskopie ale přesto není vhodná pro identifikaci mexického kopálu v reálných vzorcích z uměleckých děl kvůli velkému množství nehomogenit na mikroskopické úrovni v měřeném vzorku a různému stupni oxidačních procesů [13]. Na obrázku 1 jsou infračervená spektra triterpenních a diterpenních pryskyřic, ze kterých je patrné, že ani FTIR není vhodnou metodou k identifikaci pryskyřic, protože jejich spektra jsou si natolik podobná, že nelze dokonce rozlišit ani zástupce triterpenů (mexický kopál, mastix, damara, elemi) a diterpenů (kalafuna, sandarak). Oxidační procesy způsobené stárnutím rovněž nelze touto metodou podchytit, zvláště pokud se jedná o směsi pryskyřic s dalšími látkami ať organické nebo anorganické povahy. V laboratorních podmínkách bylo přirozené stárnutí pryskyřic simulováno ultrafialovým světlem a zvýšenou teplotou [6,14] nebo venkovními podmínkami vytvořenými fluorescenčními světly a víceméně přirozenou teplotou [6,15]. Závěrem těchto sofistikovaných testů bylo zjištění, že výsledky chemických analýs uměle stárnutých a přirozeně stárnutých pryskyřic jsou stejné [6]. Analýsy nestárnutých a stárnutých pryskyřic byly provedeny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s chemickou ionizací za atmosférického tlaku kombinovanou s hmotnostním spektrometrem. Tato metoda se ale přesto neosvědčila kvůli kondenzaci některých frakcí u stárnutých vzorků [16].

Nejpoužívanější analytickou metodou ke studiu pryskyřic v běžné laboratorní praxi je dnes plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC-MS) [17,18] nebo pyrolysní plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (Py-GC-MS) [19-33], kde se dnes testují hlavně nová derivatisační činidla pro získání nejlepší možné separace látek obsažených ve vzorku. Analýza plynovou chromatografií je založena na tvorbě methylových esterů vzniklých reakcí karboxylových skupin přítomných na terpenových látkách s derivatisačními činidly, jako jsou např. trimethylsilyldiazomethan [34,35], diazomethan [7,36-39], jodmethan [40] nebo chlormravenčan [41]. Alternativou k methylačním činidlům jsou činidla silanisační, jako je například hexamethylidisilazan (HMDS) [42], trimethylchlorsilan [42] nebo N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) [43,44,45,46]. Dokonce byla zveřejněna

i dvoustupňová derivatisační metoda používající ethylchlormravenčan a trimethylsilylimidazol [18].

Přestože byl mnohokrát studován vliv pigmentů na proces stárnutí v proteinových a olejových pojivech [47-52], vliv pigmentů na kalafunu a mexický kopál nebyl dosud popsán. Pigmenty přidávané k pryskyřicím, například v lazurách, mohou ovlivnit jejich chemické vlastnosti a zhoršit tak jejich identifikaci. Proto bude v dalším textu předvedena analýsa směsí pryskyřic s anorganickými pigmenty pomocí plynové chromatografie za použití N-trimethylsilylimidazolu (TMSI) jako derivatisačního činidla [53,54]. Stárnutí pryskyřic rovněž nepříznivě ovlivňuje jejich identifikaci, a proto byla polovina všech vzorků podrobena umělému stárnutí, které bylo zajištěno vystavením vzorků ultrafialovému záření. Teplota, při které byly vzorky uchovávány odpovídala normálním podmínkám, protože změny způsobené zvýšenou teplotou již byly testovány zejména u kyselin abietové a pimarikové [55]. Pro potlačení vlivu anorganických pigmentů bylo v druhé části této práce přidáno komplexační činidlo – sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA). Stejná úprava vzorků s přídavkem Na_2EDTA byla úspěšně aplikována již při analýze podobně připravených proteinových pojiv s anorganickými pigmenty [56].

Identifikace pryskyřičných laků a pojiv je v restaurování velmi důležitá např. pro správnou volbu rozpouštědel pro smývání závěrečných laků nebo barevných vrstev, aby tak nedošlo k poškození uměleckého díla výběrem nevhodného nebo příliš agresivního čisticího prostředku. V této práci je navržen jednotný postup pro identifikaci jak diterpenních, tak triterpenních pryskyřic pomocí plynové chromatografie a uvedena možnost zlepšení jejich identifikace i ve směsích s běžně používanými anorganickými pigmenty. Protože se během let vlivem stárnutí mění chemické složení a množství jednotlivých terpenů v pryskyřicích, což rovněž zásadně komplikuje identifikaci, je zde provedeno srovnání čerstvých a uměle stárnutých vzorků.



Obrázek 1. Infračervená spektra triterpenních (mexický kopál, mastix, elemi, damara) a diterpenních pryskyřic (kalafuna, sandarak). Spektra byla naměřena na přístroji Nicolet Magna-IR 760 odrazovou technikou. Parametry měření 4000-600 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} .

2. Experimentální část

2.1 Chemikálie a rozpouštědla

N-trimethylsilylimidazol (TMSI) (98%) (Sigma, Steinheim, Německo), chloroform (čistota > 98%) pro GC (Acros, NJ, USA), absolutní ethanol a n-hexan p.a. (Fisher, Loughborough, Velká Británie) byly zakoupeny u firmy Panreac (Barcelona, Španělsko). Sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, amoniak a chlorid amonný byly zakoupeny u firmy Probus (Badalona, Španělsko). Terpentýn byl od firmy Guinama (Valencie, Španělsko).

2.2 Ostatní materiál

Mexický kopál z rostliny *Bursera cuneata* byl dodán z Casa Sierra (Mexico, Mexiko). Kalafuna (Talens) pochází z RCM (Productos de Conservación, Barcelona, Španělsko). Anorganické pigmenty: olovnatá běloba ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), neutrální měděnka neboli verdigris ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), žlutý okr a umbra (Viguer, Valencie, Španělsko).

2.3 Příprava a popis vzorků

Nejprve byly připraveny roztoky mexického kopálu v terpentýnu (100 g mexického kopálu ve 250 ml terpentýnu) a kalafuny (2 g kalafuny ve 4 ml terpentýnu a pro lepší rozpouštění bylo přidáno několik kapek ethanolu). Každý z roztoků byl v tenké vrstvě, průměrně 50-80 μm silné, nanesen na dvě skleněná podložní sklíčka. Jednotlivé roztoky mexického kopálu a kalafuny byly postupně smíchány s anorganickými pigmenty a natřeny vždy na dvě sklíčka. Směsi byly připraveny v následujících hmotnostních procentech: 14 % olovnaté běloby, 34 % měděnky, 34 % umbry a 32 % žlutého okru. Polovina vzorků byla

vystavena umělému stárnutí po dobu čtyř týdnů při teplotě kolem 20-25°C a relativní vlhkosti 60%. Umělé stárnutí probíhalo vystavením vzorků UV záření pod fluorescenční lampou (36 w Osram L36/73) s maximální intenzitou záření na vlnových délkách 350 a 400 nm. Lampa byla od vzorků vzdálena přibližně 12 cm. Druhá polovina vzorků byla analysována již dva týdny po přípravě.

Vybrané anorganické pigmenty obsahují různé kovové ionty. Bílá olovnatá běloba obsahuje hlavně kationty Pb^{2+} , modrozelená měděnka Cu^{2+} a žlutý okr Fe^{3+} . Analýsou na skenovacím elektronovém mikroskopu s energeticky dispersním detektorem bylo zjištěno, že hnědá umbra obsahuje 81,12 % Fe_2O_3 a 5,40 % MnO .

2.4 Plynový chromatograf a podmínky měření

Experimenty byly provedeny na plynovém chromatografu Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornie, USA) s kapilární kolonou HP-5MS (5% fenyl-95% methylpolysiloxan, 30 m x 0,25 mm, film o tloušťce 0,25 μm , Agilent Technologies), kombinovaném s hmotnostním spektrometrem Agilent 5973N (Agilent Technologies). Pro vyhodnocování výsledků byl použit Agilent ChemStation software G1701CA MSD. Chromatografické podmínky: počáteční teplota byla nastavena na 130°C s gradientem 30°C/min do 270°C, pak s gradientem 2°C/min až do teploty 295°C, která byla udržována po dobu 8 minut. Teplota injektoru byla 250°C. Nosným plynem bylo helium o tlaku 72,5 kPa a poměrem děliče 1:20. Konstantní průtok plynu byl udržován vakuovou kompenzací.

Ionty byly generovány ionizací elektrony o energii 70 eV v ionizační komoře hmotnostního spektrometru, který skenoval spektra v rozmezí m/z 20 do m/z 800 s frekvencí 1 s^{-1} . Spektrometr se ladil pomocí perfluorotributylaminu. Zdroj měl teplotu 150°C a interface 280°C. Pro identifikaci hmotnostních spekter byla použita knihovna Wiley Library of Mass Spectra.

2.5 Příprava vzorků pro GC-MS

Off-line derivatisace

Ke vzorku o hmotnosti přibližně 1 mg bylo pod dusíkovou atmosférou přidáno 10 μl N-trimethylsilylimidazolu (TMSI) a pak byl ponechán stát 15 minut při teplotě 60°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl nadbytek derivatisačního činidla eliminován přidavkem 100 μl vody a derivatisované sledované látky byly extrahovány do 50 μl hexanu. Organická vrstva byla separována do mikrozkušavky a 1 μl alikvot byl injektován na kolonu.

Off-line derivatisace s předchozí úpravou vzorku pomocí EDTA

Přibližně 1 mg pryskyřice s pigmentem byl rozpuštěn ve 25 μl ethanolu a k roztoku bylo přidáno 25 μl EDTA v 0,2 M amoniaku o pH 9. K důkladně promíchané směsi bylo přidáno 50 μl chloroformu. Po opětovném protřepání byla separována organická fáze a odpařena do sucha. Další příprava vzorku pokračovala podle výše uvedené off-line derivatisace. Stejným postupem byly připraveny i slepé vzorky, tj. samotné kalafuny a mexického kopálu bez přidavku pigmentu, ke kterým pouze nebyl přidán roztok EDTA.

2.6 Výpočet relativního zastoupení jednotlivých látek

Hodnoty normalizovaných ploch píků N_i , tj. relativního zastoupení jednotlivých terpenových látek i , jsou definovány jako plochy píků vyjádřené v procentech podle vzorce (1), kde A_i je plocha píku sledované látky, která je dělena součtem ploch píků všech sledovaných látek.

$$N_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \times 100 \quad (1)$$

2.7 Výpočet relativního úbytku terpenových látek po umělém stárnutí

Pro lepší vyhodnocení změn ve složení analyzovaných vzorků je úbytek terpenových látek po umělém stárnutí definován podle vzorce (2) jako rozdíl relativních ploch píků N_i před a po vystavení vzorků ultrafialovému záření.

$$\Delta N_i (\%) = N_{i, \text{ nestárnutá pryskyřice}} - N_{i, \text{ stárnutá pryskyřice}} \quad (2)$$

Výsledné hodnoty relativního úbytku ΔN_i umožňují vyhodnotit degradační procesy v testovaných vzorcích během umělého stárnutí.

2.8 Výpočet chromatografických dat

$$\text{Rovnice definující rozlišení } R_{i,j}: \quad R_{i,j} = 2 \cdot (t_{R,j} - t_{R,i}) / (Y_{t,j} - Y_{t,i}) \quad (3)$$

$t_{R,j}$retenční čas látky j

$Y_{t,j}$šířka píku látky j při základně

$t_{R,i}$retenční čas látky i

$Y_{t,i}$šířka píku látky i při základně

Při hodnotě rozlišení $R_{i,j} = 1,0$ se dva symetrické píky překrývají asi 2 %.

2.9 Výpočet statistických údajů

Rozpětí R , definované jako rozdíl mezi nejvyšší (x_n) a nejnižší (x_l) hodnotou jednotlivých výsledků v sérii měření:

$$R = x_n - x_l \quad (4)$$

Z rozpětí můžeme vypočítat odhad směrodatné odchylky s :

$$s = k_n \cdot R \quad (5)$$

Hodnoty koeficientu k_n jsou tabelovány v běžných statistických tabulkách. Pro počet měření $n=3$ je k_n rovno 0,5908.

Výpočet mediánu.

Naměřené hodnoty se seřadí vzestupně podle velikosti. Pro lichý počet měření se medián ztotožní s prostřední hodnotou seřazeného souboru. Pro sudý počet měření je mediánem aritmetický průměr dvou středních členů uspořádané posloupnosti. V našem případě tří měření je mediánem prostřední hodnota.

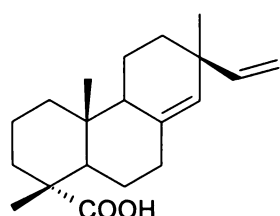
$$g(x) = \tilde{x} \quad \text{medián neboli hodnota středu uspořádaného výběru}$$

3. Výsledky a diskuse

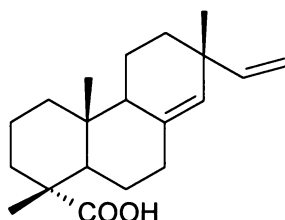
Derivatisační činidlo trimethylsilylimidazol (TMSI) byl vybrán k derivatisaci terpenových látek ve studovaných vzorcích ze tří důvodů: a) kvůli úplné derivatisaci studovaných di- a triterpenních pryskyřic, b) dobré separaci vzniklých derivátů při plynové chromatografii a c) vysoké citlivosti k di- a triterpenům.

TMSI byl pro derivatisaci terpenových látek vybrán i na základě jeho vysoké rozpustnosti ve vodě. Tato jeho vlastnost byla využita v posledním kroku přípravy, kdy je nutné zbavit se přebytku derivatisačního činidla převedením do vodné fáze kvůli detekci v plynovém chromatografu.

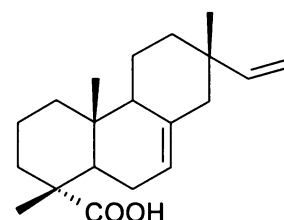
Na obrázku 2 jsou vybráni zástupci diterpenních látek obsažených v kalafuně. Na obrázku 3 je chromatogram nestárnuté kalafuny a na obrázku 4 je nestárnutý mexický kopál. Látky obsažené v těchto pryskyřicích jsou spolu s molekulovou hmotností a charakteristickými ionty uvedeny pro kalafunu v tabulce I (příslušné rozlišení píků v tab. II) a pro mexický kopál v tabulce III (příslušné rozlišení píků v tab. IV). V obou případech bylo dosaženo dobrého rozlišení píků všech sledovaných di- a triterpenů.



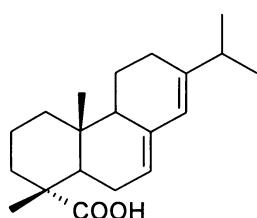
kys. pimariková



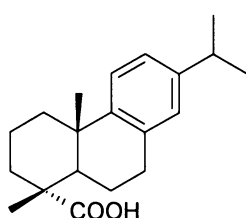
kys. sandarakopimariková



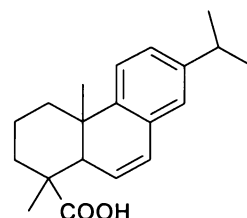
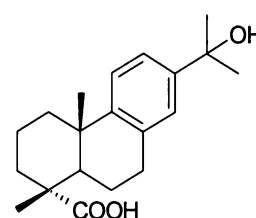
kys. isopimariková



kys. abietová



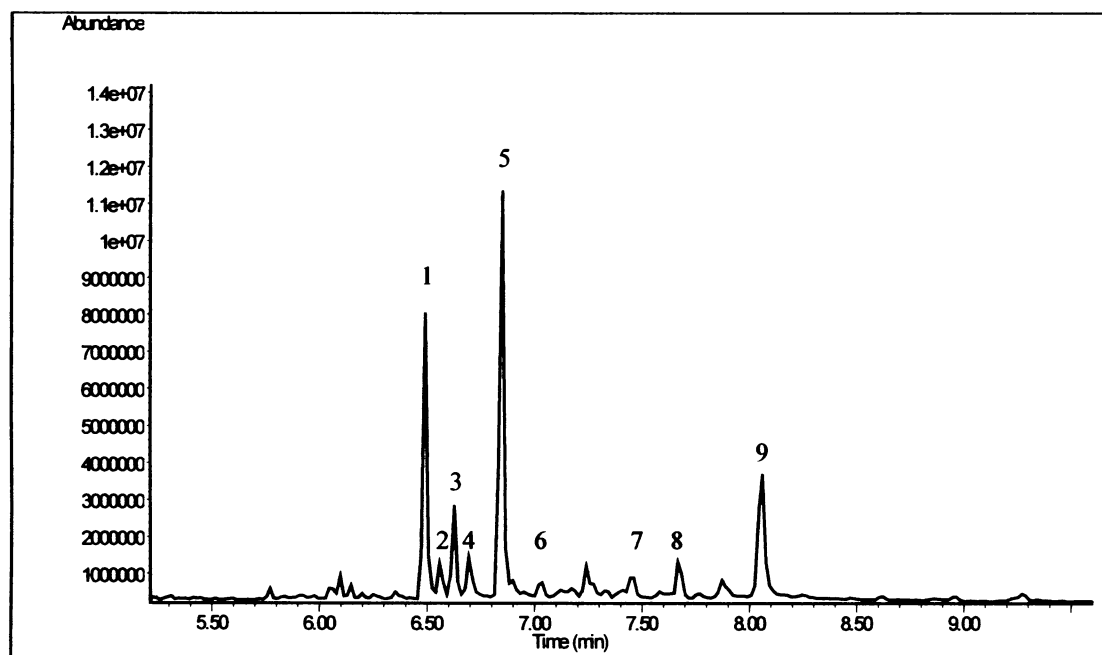
kys. dehydroabietová

6-dehydro-
dehydroabietovákys. 15-hydroxy-
dehydroabietová

Obrázek 2. Strukturální vzorce některých diterpenních látek obsažených v kalafuně.

3.1 Analýza nestárnutých modelových směsí kalafuny s anorganickými pigmenty

Použitou metodou, jak je vidět v tabulce I, lze spolehlivě rozlišit (viz tabulka II) a identifikovat řadu diterpenních látek obsažených v nestárnuté kalafuně (obr. 2 a 3): kyselinu pimarikovou (1), sandarakopimarikovou (2), isopimarikovou (3) a abietovou (6) a dále dehydrogenované a oxidované látky jako jsou kyseliny 6-dehydro-dehydroabietová (4), dehydroabietová (5), 7 β -hydroxydehydroabietová (7), 7 α -hydroxydehydroabietová (8) a kyselina 15-hydroxydehydroabietová (9). Chromatogramy získané ze směsí kalafuny a anorganických pigmentů jsou kvalitativně stejné, ale vykazují kvantitativní rozdíly v množství jednotlivých diterpenních látek oproti chromatogramu čisté kalafuny.



Obrázek 3. Chromatogram nestárnuté kalafuny, který byl získán za podmínek popsanych v Experimentální části.

Tabulka I. V tabulce jsou identifikované sloučeniny obsažené v kalafuně, jejich retenční časy, molekulová hmotnost a jejich charakteristické ionty.

Látka *		M_w	Charakteristické ionty: m/z
Kalafuna			
1	Kys. pimariková, TMS ester	374	374, <u>359</u> , 257, 238, <u>121</u> , <u>73</u>
2	Kys. sandarakopimariková, TMS ester	374	374, <u>359</u> , 257, 241, <u>121</u> , <u>73</u>
3	Kys. isopimariková, TMS ester	374	374, 359, 257, <u>241</u> , <u>73</u>
4	Kys. 6-dehydro-dehydroabietová, TMS ester	370	370, 255, 237, 195, 73
5	Kys. dehydroabietová, TMS ester	372	372, 357, 239, 73
6	Kys. abietová, TMS ester	374	374, 359, 256, 241, 213, 185, 73
7	Kys. 7 β -hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	460	460, 445, 417, 237, 191, 73
8	Kys. 7 α -hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	460	460, 445, 417, 252, 237, 191, 155, 73
9	Kys. 15-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	460	<u>445</u> , 327, 73
10	Kys. 7 β ,15-dihydroxydehydroabietová, di-TMS ether, TMS ester	548	548, <u>533</u> , 458, 325, 73
11	Kys. 7 α ,15-dihydroxydehydroabietová, di-TMS ether, TMS ester	548	548, <u>533</u> , 458, 325, 73

* K identifikaci látek byla použita Willey Spectra Library.

V tabulce IV jsou uvedeny výsledné hodnoty N_i , které byly získány analýsou čisté kalafuny a jejích směsí se čtyřmi vybranými anorganickými pigmenty (olovnatou bělobou, žlutým okrem, umbrou a měděnkou). Analýsa každého vzorku byla provedena celkem třikrát.

Porovnáme-li hodnoty N_i čisté kalafuny a jejích směsí s pigmenty, zjistíme výrazné rozdíly v relativním množství jednotlivých diterpenů, například pokles obsahu kyseliny pimarikové, zvláště ve směsi kalafuny s měděnkou. Obdobně zjistíme mírný pokles obsahu kyselin sandarakopimarikové, isopimarikové a dehydroabietové. Významně se zvýšil obsah kyseliny abietové ve vzorku se žlutým okrem. Rovněž se zvýšil obsah oxidovaných látek, nejvíce ve směsích kalafuny s měděnkou a ambry, jako jsou kyseliny 6-dehydro-dehydroabietová, 7 α -, 7 β -hydroxydehydroabietová a 15-hydroxydehydroabietová.

Výsledky chromatografických analys ukazují, že oxidační procesy za daných experimentálních podmínek ovlivňují jak abietany, tak pimarany. Procesy zahrnující oxidace abietových kyselin na více oxidované látky a degradační procesy pimaránů byly popsány mnoha autory, např. [28,32]. Degradace pimaránů jsou pak popsány jako polymerační reakce těchto látek. Popsané úbytky původních diterpenů v kalafuně a zvýšené množství více oxidovaných molekul během experimentu jsou tak ve shodě s literaturou.

Ze získaných výsledků vyplývá, že kovové ionty z anorganických pigmentů zde hrají úlohu katalysátorů oxidačních a polymeračních procesů během schnutí vzorků. Tato úvaha je podpořena sníženým obsahem pimaránů a dehydrobietových kyselin ve směsích kalafuny s pigmenty a zvýšeným množstvím oxidovaných látek (dehydrobietových látek). Katalytická úloha kovových iontů, která se projevuje převážně oxidačními procesy, byla již popsána u vysýchavých olejů [57].

Tabulka II. V tabulce jsou uvedené hodnoty rozlišení mezi sousedními píky diterpenních látek identifikovaných v nestárnuté kalafuně.

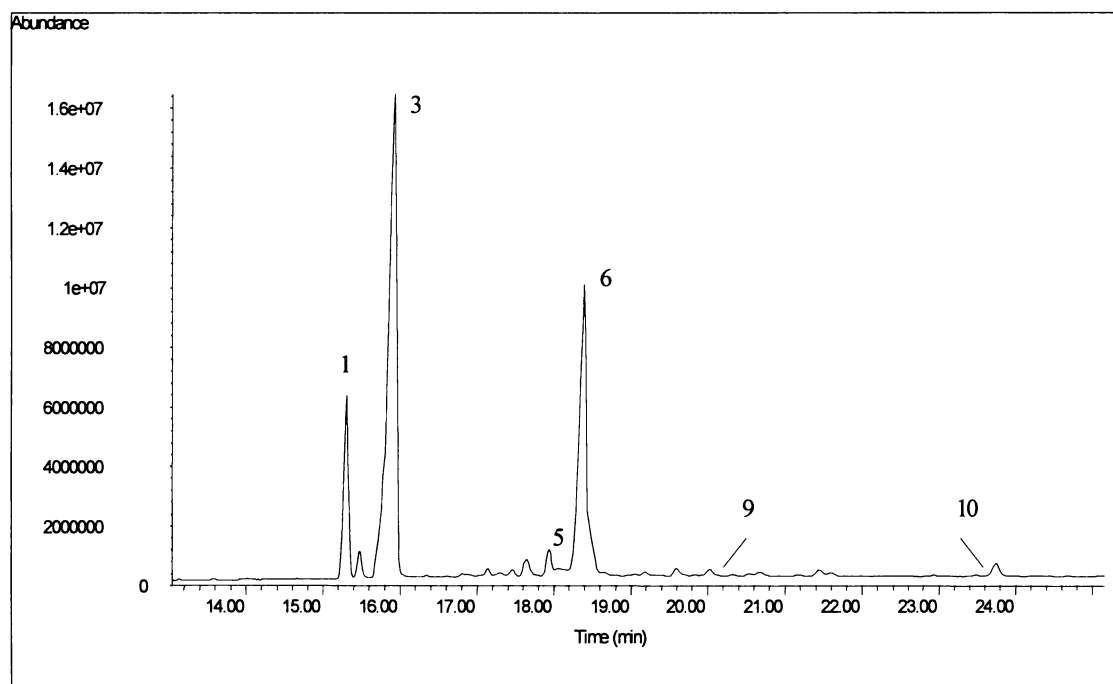
	Látka	t_R (min)	Y (min)	$R_{i,j}$
1	Kys. pimariková, TMS ester	6,49	0,06	1,41
2	Kys. sandarakopimariková, TMS ester	6,57	0,06	1,27
3	Kys. isopimariková, TMS ester	6,63	0,04	1,48
4	Kys. 6-dehydro-dehydroabietová, TMS ester	6,70	0,06	2,65
5	Kys. dehydroabietová, TMS ester	6,85	0,06	3,36
6	Kys. abietová, TMS ester	7,04	0,06	7,42
7	Kys. 7 β -hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	7,46	0,06	3,89
8	Kys. 7 α -hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	7,68	0,06	5,75
9	Kys. 15-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	8,06	0,08	

Měďnaté kationty z měděnky vytváří vazby s molekulami diterpenních nebo triterpenních kyselin [58]. Ionty jsou koordinovány ligandy do oktaedrických systémů. Tyto komplexy jsou převážně tvořené CuR^+ , Cu_2R^+ , Cu_2R_2^+ a Cu_3R_2^+ , jak bylo dokázáno pomocí hmotnostní spektrometrie FAB (fast atom bombardment) ve studii van den Berga [43]. Tvorba těchto oktaedrických systémů má dopad i na účinek některých anorganických pigmentů, které se přidávaly ke směsím pryskyřic s vysýchavými oleji jako sikativa – např. olovnatá běloba. Pro tuhnutí olejů je nutné vytvoření kovových komplexů s karboxylovými skupinami mastných kyselin [59], ale mnoho iontů tvoří ve směsi koordinační systémy s pryskyřičnými kyselinami, proto je účinnost pigmentu jako sikativa snížena. Komplexy kovových iontů s pryskyřičnými kyselinami jsou obzvláště stabilní ve směsích pryskyřic s měděnkou.

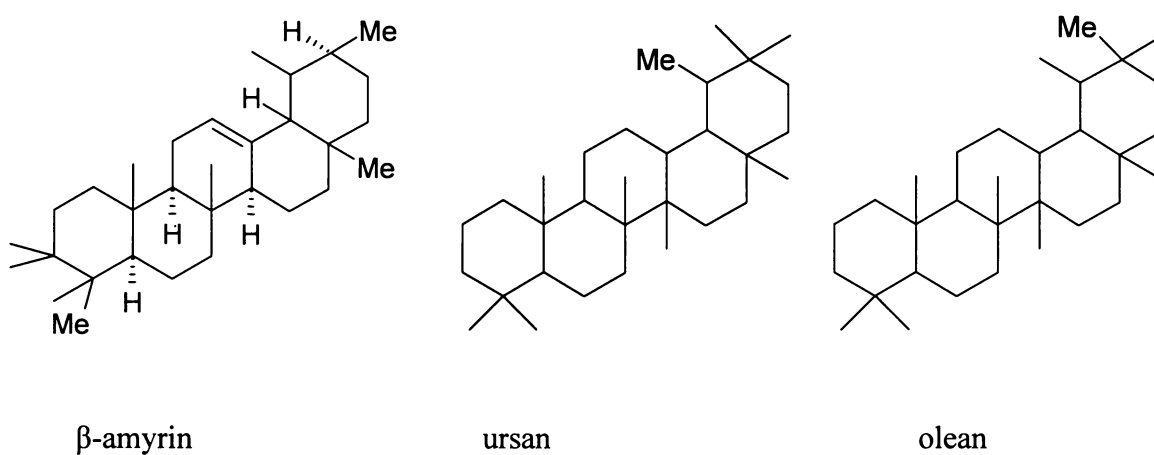
3.2 Analýza nestárnutých modelových směsí mexického kopálu s anorganickými pigmenty

V triterpenové frakci obsažené v mexickém kopálu (tabulka III) jsou zastoupeny amyriny v podobě β -amyrinu (1) a α -amyrinu (6), dále pak hop-22(29)-en-3 β -ol (3) a v malé míře je zastoupen i 3-keto-urs-12-en (5), viz obrázek 4. TMSI účinně derivatisoval hydroxylové skupiny přítomné v triterpenních látkách v čistém mexickém kopálu i v jeho směsích s vybranými anorganickými pigmenty. V chromatogramech směsí byl zjištěn pouze celkový výrazný úbytek obsahu sledovaných triterpenů oproti čisté pryskyřici, což je způsobeno poměrně značným obsahem pigmentů ve vzorcích.

Ze získaných chromatografických dat vzorků mexického kopálu a jeho směsí s pigmenty lze vyčíst, že N_i hodnoty α -amyrinu a β -amyrinu v pigmentovaných směsích lehce poklesly, zatímco N_i hop-22(29)-en-3 β -olu naopak vzrostla. Nicméně tento poznatek platí pouze pro směs s měděnkou, N_i hodnoty v ostatních směsích zůstaly víceméně zachovány (tab. V). Měďnaté ionty tak působí jako neúčinnější katalysátory oxidačních procesů, kterým nejvíce podléhají právě α -amyrin a β -amyrin.



Obrázek 4. Chromatogram nestárnutého mexického kopálu, který byl získán za podmínek popsaných v Experimentální části.



Obrázek 5. Strukturální vzorce některých triterpenních látek z mexického kopálu.

Tabulka III. Identifikované sloučeniny obsažené v mexickém kopálu, jejich retenční časy, molekulová hmotnost a jejich charakteristické ionty.

	Látka *	M _w	Charakteristické ionty: <i>m/z</i> (%)
Mexický kopál			
1	β-amyrin, TMS ether	498	73, 190, <u>218</u> , 279, 393, 498
2	Oxidovaný oleanan	586?	<u>73</u> , 190, 306, 496, 571, 586
3	Hop-22(29)-en-3β-ol, TMS ether	498	73, <u>189</u> , 369, 393, 398
4	Oxidovaný ursan- typová molekula	586?	<u>73</u> , 190, 306, 496, 571, 586
5	3-keto-urs-12-an?	424	55, <u>218</u> , 424
6	α-amyrin, TMS ether	498	73, 190, <u>218</u> , 279, 393, 498
7	Oxidovaný oleanan/ursan	586?	<u>73</u> , 306, 381, 496, 571, 586
8	Oxidovaný oleanan/ursan	512?	43, <u>73</u> , 135, 273, 383, 496, 512, 571, 586
9	Oxidovaný oleanan/ursan	512?	43, <u>73</u> , 135, 273, 383, 422, 469, 496, 512
10	Oxidovaný oleanan/ursan	512?	43, <u>73</u> , 135, 273, 383, 469, 496, 512

* K identifikaci látek byla použita Willey Spectra Library.

V tabulce IV jsou uvedeny hodnoty rozlišení mezi sousedními píky triterpenních látek identifikovaných v nestárnutém mexickém kopálu (obr. 4) bez přídavku anorganických pigmentů. Z vypočtených hodnot rozlišení je patrné, že separace triterpenních látek obsažených v mexickém kopálu byla úspěšná ($R_{ij} > 1,5$).

Tabulka IV. V tabulce jsou uvedené hodnoty rozlišení mezi sousedními píky triterpenních látek identifikovaných v nestárnutém mexickém kopálu.

	Látka	t_R (min)	Y (min)	R_{i,j}
1	β-amyrin, TMS ether	15,25	0,21	1,99
2	Hop-22(29)-en-3β-ol, TMS ether	15,83	0,38	8,44
3	3-keto-urs-12-an?	17,94	0,13	1,53
4	α-amyrin, TMS ether	18,29	0,33	6,96
5	Oxidovaný oleanan/ursan	20,03	0,17	19,84
6	Oxidovaný oleanan/ursan	23,75	0,21	

Tabulka V. Mediány a standardní odchylky hodnot normalizovaných ploch píků N_i sledovaných látek v nestárnutých pryskyřicích a jejich směsích se čtyřmi anorganickými pigmenty.

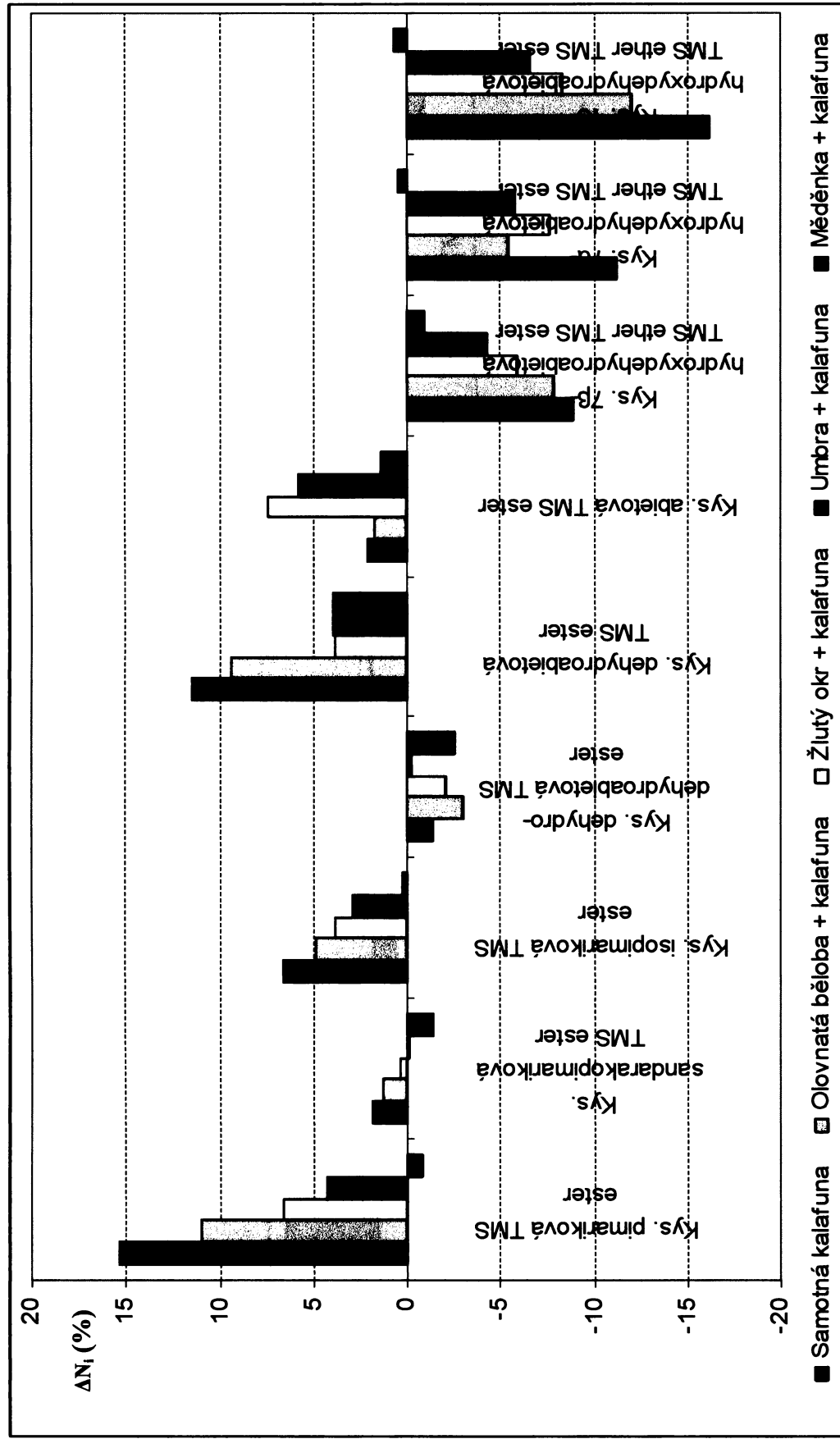
Vzorek	Samotná pryskyřice zastoupení (%)	Olovnatá běloba + pryskyřice zastoupení (%)	Žlutý okr + pryskyřice zastoupení (%)	Umбра + pryskyřice zastoupení (%)	Měděnka + pryskyřice zastoupení (%)
Látka					
Kalafuna					
Kys. pimariková TMS ester	23,38 ± 4,25	17,68 ± 0,77	17,14 ± 0,39	16,58 ± 0,74	14,49 ± 1,77
Kys. sandarakopimariková, TMS ester	4,18 ± 0,65	3,39 ± 0,22	3,02 ± 0,19	3,01 ± 0,25	3,04 ± 0,32
Kys. isopimariková, TMS ester	8,55 ± 1,11	7,60 ± 0,33	6,96 ± 0,17	6,95 ± 0,17	6,00 ± 0,54
Kys. 6-dehydro-dehydroabietová, TMS ester	3,95 ± 0,42	4,07 ± 0,37	3,81 ± 0,47	4,29 ± 0,03	4,41 ± 0,81
Kys. dehydroabietová, TMS ester	37,10 ± 1,35	35,77 ± 0,26	35,16 ± 1,89	32,47 ± 1,65	32,52 ± 2,28
Kys. abietová, TMS ester	5,40 ± 0,06	6,49 ± 1,07	7,37 ± 1,44	7,04 ± 0,34	5,10 ± 0,49
Kys. 7β-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	3,14 ± 0,79	4,33 ± 0,19	4,12 ± 0,06	4,61 ± 0,10	5,63 ± 1,03
Kys. 7α-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	7,37 ± 2,05	10,43 ± 0,61	9,91 ± 0,50	10,52 ± 0,82	12,83 ± 1,39
Kys. 15-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	6,79 ± 4,81	10,48 ± 1,46	12,66 ± 1,45	14,39 ± 2,18	16,34 ± 2,85
Mexický kopal					
β-amyrin, TMS ether	12,50 ± 1,30	12,80 ± 1,26	12,29 ± 0,62	11,75 ± 0,55	9,28 ± 0,17
Hop-22(29)-en-3β-ol, TMS ether	57,12 ± 0,60	56,16 ± 3,80	59,81 ± 3,56	59,37 ± 0,47	65,68 ± 0,94
α-amyrin, TMS ether	30,34 ± 1,22	31,04 ± 2,54	28,50 ± 3,83	28,51 ± 0,38	25,07 ± 0,79

Tabulka VI. Mediány a standardní odchylky hodnot normalizovaných ploch píků N_i sledovaných látek v uměle stárnutých pryskyřicích a jejich směsích se čtyřmi anorganickými pigmenty.

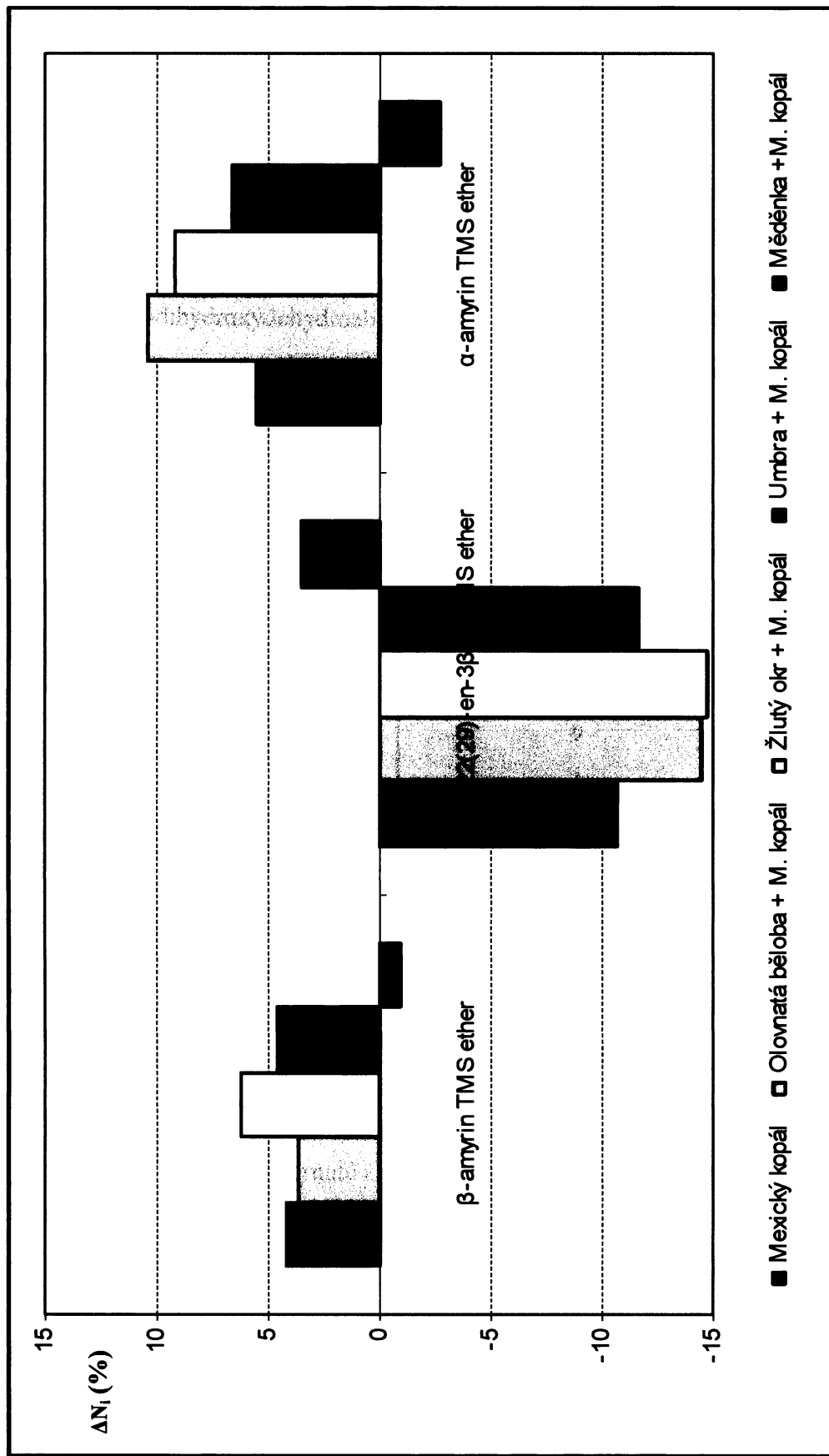
Vzorek	Samotná pryskyřice zastoupení (%)	Olovnatá běloba + pryskyřice zastoupení (%)	Žlutý okr + pryskyřice zastoupení (%)	Umбра + pryskyřice zastoupení (%)	Měděnka + pryskyřice zastoupení (%)
Látka					
Kalafuna					
Kys. pimariková TMS ester	8,02 ± 0,87	6,72 ± 0,12	10,52 ± 0,09	12,25 ± 1,18	15,30 ± 1,50
Kys. sandarakopimariková, TMS ester	2,37 ± 0,51	2,15 ± 0,15	2,67 ± 0,18	3,09 ± 0,58	4,43 ± 1,94
Kys. isopimariková, TMS ester	1,99 ± 0,56	2,77 ± 0,31	3,13 ± 0,60	4,11 ± 0,86	5,82 ± 2,29
Kys. 6-dehydro-dehydroabietová, TMS ester	5,36 ± 1,09	7,09 ± 0,79	5,84 ± 1,15	4,47 ± 0,35	6,91 ± 1,39
Kys. dehydroabietová, TMS ester	25,62 ± 3,19	26,42 ± 1,59	31,34 ± 2,54	28,52 ± 1,59	28,54 ± 5,73
Kys. abietová, TMS ester	3,36 ± 1,03	4,73 ± 0,54	^a	1,22 ± 0,78	3,76 ± 2,46
Kys. 7β-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	12,03 ± 0,59	12,15 ± 0,46	10,01 ± 0,84	8,93 ± 1,00	6,54 ± 0,33
Kys. 7α-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	18,64 ± 2,34	15,81 ± 2,64	17,52 ± 0,33	16,25 ± 0,79	12,32 ± 3,58
Kys. 15-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	22,93 ± 2,73	22,56 ± 1,21	21,04 ± 0,70	20,99 ± 1,18	15,61 ± 2,39
Mexický kopal					
β-amyrin, TMS ether	8,33 ± 0,67	9,12 ± 0,52	6,05 ± 1,03	7,20 ± 0,26	10,23 ± 0,43
Hop-22(29)-en-3β-ol, TMS ether	67,83 ± 2,85	70,58 ± 5,07	74,60 ± 1,29	70,97 ± 0,07	62,12 ± 2,27
α-amyrin, TMS ether	24,84 ± 2,77	20,68 ± 4,93	19,35 ± 0,26	21,93 ± 0,25	27,76 ± 1,91

^a pík nebyl detekován

Graf 1. Srovnání úbytků ΔN_i diterpenních látek v kalafuně a jejich směsích s pigmenty před a po vystavení umělému stárnutí.

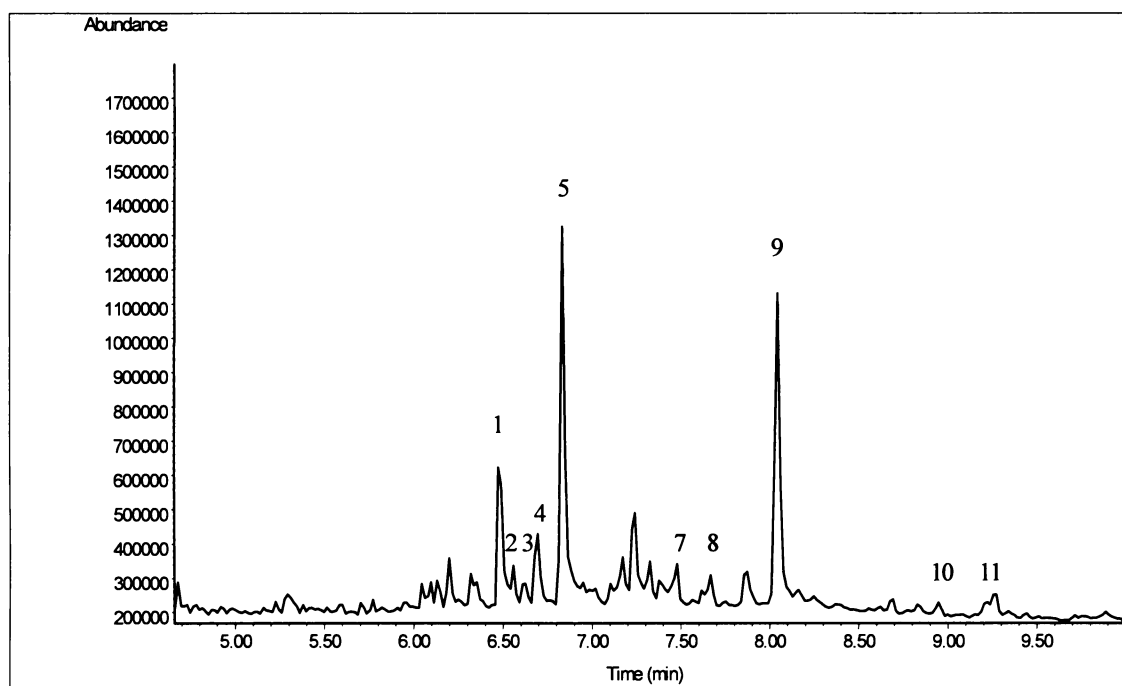


Graf 2. Srovnání úbytků ΔN_i triterpenních látek v mexickém kopálu a jeho směsích s pigmenty před a po vystavení umělému stárnutí.



3.3 Analýza uměle stárnutých vzorků kalafuny a jejich modelových směsí s pigmenty

Na obrázku 6 je znázorněn chromatogram uměle stárnuté kalafuny vystavené účinkům ultrafialového záření. Srovnáním s chromatogramem nestárnuté samotné kalafuny (obr. 3) vyplývá, že během umělého stárnutí ubývá ve vzorku obsah diterpenních látek a naopak přibývá oxidovaných a dehydrogenovaných sloučenin. V nestárnuté kalafuně jsou píky TMS derivátů kyseliny 7β -dihydroxydehydroabietové a 7α -dihydroxydehydroabietové (10, 11) téměř nezatelné, zatímco ve stárnuté kalafuně jsou jejich píky velmi intenzivní, což naznačuje rozsáhlé oxidační procesy během stárnutí.



Obrázek 6. Chromatogram uměle stárnuté kalafuny, který byl získán za podmínek popsanych v Experimentální části.

Tabulka VI shrnuje výsledky získané chromatografickou analýsou stárnutých vzorků kalafuny a jejich čtyř směsí s anorganickými pigmenty. Každá analýza byla provedena celkem třikrát.

Ve stárnutých vzorcích kalafuny oproti nestárnutým (tab. V a VI) byl zjištěn nižší relativní obsah kyseliny pimarikové, sandarakopimarikové, isopimarikové a abietové, s výjimkou kalafuny s olovnatou bělobou v případě pimarikové a sandarakopimarikové kyseliny. Také proto je ve stárnutých vzorcích kalafuny i s pigmenty relativně větší obsah 7 α -hydroxydehydroabietové, 7 β -hydroxydehydroabietové a 15-hydroxydehydroabietové kyseliny než ve všech jejích nestárnutých vzorcích. To je přesný opak toho, co bylo zjištěno u nestárnutých vzorků. U nestárnutých vzorků je vyšší relativní zastoupení pimaránů a dehydroabietanů než hydroxydehydroabietanů. Odpovědí na tento problém může být např. snížená stabilita komplexů pimaránů (kys. pimarikové, sandarakopimarikové a isopimarikové) a dehydroabietanů (kyselin dehydroabietové a 6-dehydro-dehydroabietové) s kovovými ionty pocházejícími z anorganických pigmentů vůči podmínkám umělého stárnutí. Obsah více oxidovaných látek (15 a 7, α - a 7, β -hydroxydehydroabietových kyselin) je tak ve stárnutých směsích relativně zvýšen.

Všechny sledované diterpenní látky kromě kyseliny 15-hydroxydehydroabietové, 7, α -hydroxydehydroabietové a 7, β -hydroxydehydroabietové vykazují úbytky během umělého stárnutí vyvolaného ultrafialovým zářením. V tabulce VII jsou uvedené ionty, které s diterpeny nejvíce interagují. V nestárnutých i stárnutých vzorcích se jedná hlavně o kationty Cu²⁺ a Fe³⁺, které pochází z měděnky a žlutého okru.

Tabulka VII. V tabulce jsou uvedené ionty, které nejvíce interferují se sledovanými diterpenními látkami, tj. nejvíce mění obsahy jednotlivých kyselin.

Látka	Nestárnutý vzorek	Stárnutý vzorek
Kys. pimariková TMS ester	Pb ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺	Pb ²⁺
Kys. sandarakopimariková, TMS ester	Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺	-
Kys. isopimariková, TMS ester	Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺	-
Kys. 6-dehydro-dehydroabietová, TMS ester	-	Fe ³⁺
Kys. dehydroabietová, TMS ester	Fe ³⁺ , Cu ²⁺	-
Kys. abietová, TMS ester	Mn ²⁺ , Fe ³⁺	Mn ²⁺ , Fe ³⁺
Kys. 7 β -hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	Cu ²⁺	Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺
Kys. 7 α -hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	Cu ²⁺	Pb ²⁺ , Cu ²⁺
Kys. 15-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	Cu ²⁺	Cu ²⁺

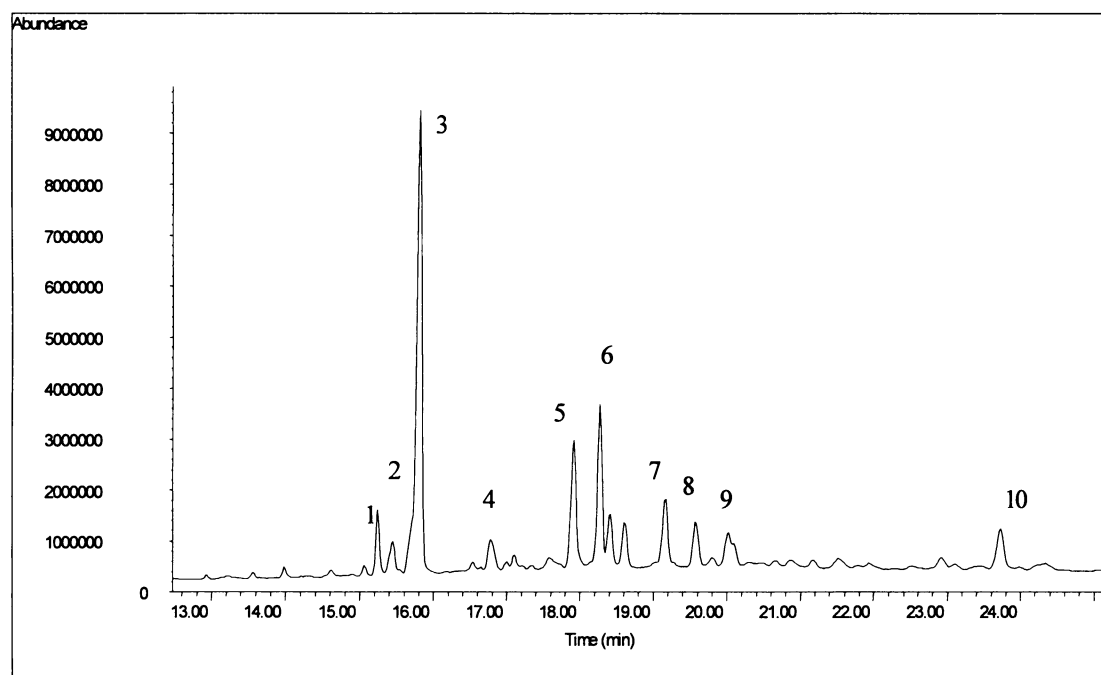
V grafu 1 je ukázáno srovnání hodnot ΔN_i získaných ze vzorků kalafuny a jejich směsí s pigmenty před a po vystavení umělému stárnutí. Negativní hodnoty ΔN_i u kyseliny pimarikové, sandarakopimarikové, isopimarikové a abietové ve směsích s měděnkou značí relativní přírůstek nebo vysokou stabilitu těchto kyselin s měďnatými kationty po vystavení umělému stárnutí. Oxidované látky jako 7, α -, 7, β -hydroxydehydroabietitové kyseliny a 15-hydroxydehydroabietová kyselina a 6-dehydro-dehydroabietová kyselina vykazují téměř ve všech případech záporné hodnoty ΔN_i . Z grafu je patrné, že směs kalafuny s měděnkou a žlutým okrem vykazují během stárnutí nejmenší změny ve složení vzorku, zatímco nejdramatičtější změny se odehrávají ve vzorcích samotné kalafuny. Přítomnost pigmentů snižuje obsah oxidovaných látek ve směsích, každý pigment ovlivňuje složení vzorků jiným způsobem.

3.4 Analýza uměle stárnutých vzorků mexického kopálu a jeho modelových směsí s anorganickými pigmenty

Chromatogram uměle stárnutého mexického kopálu je na obrázku 7. V triterpenní frakci byl identifikován β -amyrin (1), hop-22(29)-en-3 β -ol (3), α -amyrin (6) a malé množství 3-keto-urs-12-enu (5). Některé píky, které se vyskytují v nestárnutém mexickém kopálu téměř nezatelně, jsou ve stárnutém kopálu mnohem intenzivnější, a proto je opatrně přisuzujeme oxidovaným molekulám typu oleananů/ursanů. Oxidované látky byly zjištěny u stárnutých vzorků s olovnatou bělobou, žlutým okrem a umbrou, ale ve směsi s měděnkou nebyly spolehlivě identifikovány.

V tabulce VI jsou uvedeny výsledky chromatografické analýzy stárnutých vzorků mexického kopálu spolu s anorganickými pigmenty. Hodnoty normalizovaných ploch pík N_i u vzorků kopálu s olovnatou bělobou a umbrou zůstávají přibližně na stejné úrovni jako u samotného stárnutého mexického kopálu. Ke slabému poklesu obsahu α -amyrinu a β -amyrinu došlo zejména u směsi se žlutým okrem. U vzorku s měděnkou došlo k přesně opačnému jevu.

Graf 2 ukazuje hodnoty ΔN_i , které vypovídají o změnách ve vzorcích mexického kopálu a jeho směsích před a po umělém stárnutí. Z grafu vyplývá, že k samotnému stárnutému mexickému kopálu se nejpodobněji chová jeho směs s umbrou. Naprosto odlišně se chová směs s měděnkou, což znamená, že měďnaté ionty mají největší stabilizující vliv na triterpenní látky, viz srovnání hodnot N_i v tabulkách V a VI. Stárnutý vzorek s měděnkou má přibližně stejné hodnoty N_i jako tentýž nestárnutý vzorek.



Obrázek 7. Chromatogram uměle stárnutého mexického kopálu, který byl získán za podmínek popsanych v Experimentální části.

Během umělého stárnutí vyvolaného ultrafialovým zářením vykazují ve vzorcích mexického kopálu velké obsahové ztráty β -amyrin a α -amyrin. V téže tabulce jsou rovněž uvedené ionty pocházející z přidaných anorganických pigmentů, které s triterpeny nejvíce interagují. V nestárnutých i stárnutých vzorcích nejvíce interferují kationty Cu^{2+} a Fe^{3+} , které pochází z měděnky a žlutého okru (tabulka VIII).

Tabulka VIII. V tabulce jsou uvedené ionty, které nejvíce snižují obsah sledovaných triterpenních látek ve vzorcích mexického kopálu.

Látka	Nestárnutý vzorek	Stárnutý vzorek
β -amyrin trimethylsilyl ester	Cu^{2+}	Cu^{2+}
hop-22(29)en-3-ol trimethylsilyl ester	-	Fe^{3+}
α -amyrin trimethylsilyl ester	Cu^{2+}	Fe^{3+}

3.5 Analýza vzorků kalafuny s příměsí měďenky po přidavku EDTA

Z tabulky VII a grafu 1 je patrné, že nejvíce interferujícími kationty ve vzorcích s nestárnutou a stárnutou kalafunou jsou měďnaté ionty. Vliv Cu^{2+} iontů zhoršuje identifikaci kalafuny v modelových vzorcích, a proto bylo nutné potlačit jejich vliv. Přídavek komplexačního činidla EDTA měl jejich interakce omezit. Příprava vzorků je popsána v kapitole 2.4.

Přídavek roztoku EDTA téměř smazal rozdíly v hodnotách N_i u nestárnutých vzorků samotné kalafuny a kalafuny s měďenkou. Stárnuté vzorky se výrazně odlišují od nestárnutých, protože obsahují více oxidovaných látek vzniklých degradačními procesy během vystavení ultrafialovému záření, ale přídavek EDTA v nich významně omezil vliv měďnatých iontů a hodnoty jednotlivých diterpenů přiblížil k jejich hodnotám v nestárnutých vzorcích, viz tabulka IX.

Příprava vzorků ošetřených přídavkem EDTA snížila obsah pimaránů a abietanů přibližně o 25 % oproti vzorkům bez ošetření EDTA. Přesto ale převažuje kladný vliv komplexačního činidla na identifikaci stárnuté kalafuny, zvláště v její směsi s měďenkou, kdy se hodnoty jejich normalizovaných ploch píků N_i mírně vyrovnaly s oběma nestárnutými vzorky.

Tabulka IX. Srovnání hodnot normalizovaných ploch píků N_i sledovaných látek v čerstvé a stárnuté směsi kalafuny s měděnkou s přídavkem roztoku EDTA.

Látka	Samotná kalafuna-blank		Kalafuna + měděnka	
	nestárnutá	stárnutá	nestárnutá	stárnutá
Kys. pimariková TMS ester	16,73 ± 5,85	7,28 ± 0,99	16,31 ± 4,08	12,20 ± 2,11
Kys. sandarakopimariková, TMS ester	3,04 ± 0,83	2,11 ± 0,22	3,11 ± 0,77	3,36 ± 0,34
Kys. isopimariková, TMS ester	6,78 ± 0,79	2,07 ± 0,22	6,14 ± 0,89	4,09 ± 0,50
Kys. 6-dehydro-dehydroabietová, TMS ester	4,15 ± 0,96	6,07 ± 1,78	3,88 ± 0,83	5,52 ± 2,30
Kys. dehydroabietová, TMS ester	37,27 ± 1,77	21,00 ± 2,47	34,65 ± 3,41	28,20 ± 2,85
Kys. abietová, TMS ester	3,48 ± 0,34	2,14 ± 0,35	3,72 ± 0,33	3,12 ± 1,19
Kys. 7β-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	4,19 ± 0,50	11,78 ± 1,75	4,85 ± 0,53	8,43 ± 0,72
Kys. 7α-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	11,54 ± 4,20	17,54 ± 2,51	11,69 ± 3,32	13,76 ± 1,32
Kys. 15-hydroxydehydroabietová, TMS ether, TMS ester	12,88 ± 4,62	27,64 ± 1,83	13,95 ± 4,01	20,73 ± 2,24

3.6 Analýza vzorků mexického kopálu s příměsí měděnky po přídavku EDTA

S mexickým kopálem nejvíce interferuje měděnka, tj. kationt Cu^{2+} , jak je uvedeno v tabulce VIII. Proto byly vzorky s měděnkou podrobeny testu s přídavkem roztoku EDTA. Přídavkem EDTA se hodnoty N_i významně změní u všech vzorků kromě samotného nestárnutého mexického kopálu, který má oproti stejnému vzorku bez ošetření roztokem EDTA veškeré hodnoty N_i prakticky nezměněny. Přídavkem EDTA jsou hodnoty N_i u všech ostatních zkoumaných vzorků ustáleny na přibližně stejných hodnotách, proto se identifikace mexického kopálu po ošetření přídavkem EDTA zjednodušuje (viz tabulka X).

Tabulka X. Srovnání hodnot normalizovaných ploch píků N_i sledovaných látek v čerstvé a stárnuté směsi mexickým kopálu s měděnkou s a bez přídavku EDTA.

Látka	Mexický kopál-blank		Mexický kopál + měděnka	
	nestárnutá	stárnutá	nestárnutá	stárnutá
β-amyrin trimethylsilyl ether	12,01 ± 0,74	6,54 ± 0,12	6,94 ± 1,02	6,91 ± 0,50
Trimethylsilyl ester hop-22(29)en-3-ol	62,35 ± 2,89	70,58 ± 0,32	73,00 ± 0,90	73,56 ± 0,56
α-amyrin trimethylsilyl	25,78 ± 2,24	22,86 ± 0,43	19,67 ± 0,36	19,66 ± 0,14

4. Závěr

Výše popsaná metoda určená k identifikaci di- a triterpenů pomocí plynové chromatografie je velmi vhodná a citlivá díky kompletní derivatisaci všech karboxylových a hydroxylových skupin terpenových látek obsažených ve studovaných pryskyřicích.

Ze získaných výsledků vyplývá, že existují významné rozdíly mezi čerstvě připravenými a uměle stárnutými vzorky obou druhů pryskyřic. Rozdíly jsou způsobeny probíhajícími oxidačními a polymeračními reakcemi, které mění složení původních čerstvých pryskyřic. Kovové ionty pocházející z přidaných anorganických pigmentů tvoří komplexy s terpenovými látkami, podle chromatogramů tak snižují jejich obsah a naopak zvyšují podíl oxidačních produktů, protože kovové ionty katalysují oxidační reakce. Jiné vysvětlení změny obsahu jednotlivých terpenových látek může spočívat v různém afinitě terpenových komplexů s kovovými ionty k nepolárnímu rozpouštědлу během extrakčního kroku.

Pigmenty, které nejvíce negativně ovlivňovaly identifikaci, jsou v případě čerstvé i stárnuté kalafuny měděnka (Cu^{2+}) a žlutý okr (Fe^{3+}). Uvedené kationty jsou pravděpodobně nejúčinnějšími katalysátory nebo tvoří pevnější komplexy než zbývající studované ionty. Degradaci vyvolanou umělým stárnutím, které bylo simulované ultrafialovým světlem, nejvíce podlehly pimarany, tj. kyseliny isopimariková, pimariková a sandarakopimariková.

Měděnka je také pigmentem, který nejvýznamněji ovlivňuje identifikaci látek obsažených v triterpením mexickém kopálu. Měďnaté ionty katalysují degradační procesy nebo tvoří pevnější komplexy hlavně s α - a β -amyriny. Fotodegradační účinek ultrafialového záření postihuje opět nejvíce látky ze skupiny amyriinů.

Přídavek roztoku EDTA ke směsím pryskyřic s měděnkou měl v obou případech kladný vliv na identifikaci pryskyřic. Nestárnuté vzorky pryskyřic s i bez přídavku měděnky po přidání EDTA dosáhly přibližně stejných hodnot N_i jako nestárnuté vzorky pryskyřic smíchané s měděnkou. Je možné, že roztok EDTA nejenže vytvořil komplex s Cu^{2+} ionty, ale rovněž ovlivnil distribuci všech terpenových látek mezi polární a nepolární (hexanovou) fází během extrakce. U stárnutých vzorků není tento jev tak markantní, přesto se přídavek EDTA i v tomto případě osvědčil.

5. Literatura

1. Turco A.: Coloritura, verniciatura e laccatura del legno. 3. vydání, Hoepli, Milano, 433, (1996).
2. Hiscox G.D., Hopkins A.A.: El Recetario Industrial, GG, México, 961, (1997).
3. Roy A. (editor): Artists' Pigments. A Handbook of their History and Characteristics, Vol. 2, National Gallery of Art, Washington, (1993).
4. van den Berg K.J.: Diterpenoid resins in paintings, in Proceedings of Molart 98. The evaluation workshop, FOM-AMOLF, Amsterdam, 11-21, (1998).
5. Mayer R.: The Artist's Handbook of Materials and Techniques, 2. vydání, Hermann Blume, Madrid, 248, (1993).
6. Scalarone D., Lazzari M., Chiantore O.: *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 115: 68-69 (2003).
7. Mills J.S., White R.: *Stud. Conserv.* 22: 12-18 (1977).
8. López C., Aplicaciones del copal mejicano como aglutinante pictórico, disertační práce, University of México (2002).
9. Budzikiewicz H., Wilson J.M., Djerassi C.: *J. Am. Soc.* 85: 3688-3699 (1963).
10. Ogunkoya L.: *Phytochemistry* 20: 121- 126 (1981).
11. Djerassi C., Budzikiewicz H., Wilson J.M.: *Tetrahedron letters* 7: 263-270 (1962).
12. Brody R.H., Edwards H.G.M, Pollard A.M.: *Spectrochim. Acta A* 57: 1325-1338 (2001).
13. Vandenabeele P., Grimaldi D.M., Edwards H.G.M., Moens L.: *Spectrochim. Acta A* 59: 2221-2229 (2003).
14. Scalarone D., Lazzari M., Chiantore O.: *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 64: 345- (2002).
15. van der Doelen G.A., Boon J.J.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 134: 45-57 (2000).
16. van der Doelen G.A, van den Berg K.J., Boon J.J., Shibayama N., de la Rie R., Genuit W.J.L.: *J. Chromatogr. A* 809: 21-37 (1998).
17. Otto A., Simoneit B.R.T., Wilde W., Kunzmann L., Püttmann W.: *Rev. Palaeobot. Palynol.* 120: 203-215 (2002).
18. Osete-Cortina L., Doménech-Carbó M.T., Mateo-Castro R., Gimeno-Adelantado J.V., Bosch-Reig F.: *J. Chromatogr. A* 1024: 187-194 (2004).
19. Osete-Cortina L., Doménech-Carbó M.T.: *J. Chromatogr. A* 1065: 265-278 (2005).
20. Shedrinsky A.M., Wampler T.P., Baer N.S.: *Wiene Berichte veber Naturwissenschaft in der Kunst*, 4: 12 (1988).

21. Shedrinsky A.M., Wampler T.P., Indictor N., Baer N.S.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 15: 393-412 (1989).
22. Stevanato R., Rovea M., Carbini M., Favretto D., Traldi P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11: 286-294 (1997).
23. Wright M.M., Wheals B.B.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 11: 195-211 (1987).
24. Chiavari G., Fabbri D., Mazzeo R., Bocchini P., Galletti G.C.: *Chromatographia* 41: 273-281 (1995).
25. Learner T.: *Stud. Conserv.* 46: 225-241 (2002).
26. Chiavari G., Fabbri D., Prati S.: *Chromatographia* 55: 611-616 (2002).
27. van der Doelen G.A., Boon J.J.: The Identification of Dammar, Mastic, Sandarac and Copal by Pyrolysis Gas Chromatography, Resins, Ancient and Modern, in Preprints of the SSCR's 2nd Resins Conference, SSCR, Aberdeen, 70 (1995).
28. van den Berg K.J., Pastorova I., Spetter L., Boon J.J.: State of Oxidation of Diterpenoid *Pinaceae* Resins in Varnish, Wax Lining Material, 18th Century Resin Oil Paint, and a Recent Copper Resinate Glaze in Preprints of 11th Triennial Meeting of the ICOM Committee for Conservation, vol. 2, ICOM Committee for Conservation, Edinburgh, 930 (1996).
29. Pastorova I., van der Berg K.J., Boon J.J., Verhoeven J.W.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 43: 41-57 (1997).
30. van den Berg K.J., van der Horst J., Boon J.J.: Recognition of Copals in Aged Resin/Oil Paints and Varnishes, Preprints of 12th Triennial Meeting of the ICOM Committee for Conservation, 2. svazek, ICOM Committee for Conservation, Lyon, 855 (1999).
31. van den Berg K.J., Ossebaar J., van Keulen H.: Analysis of Copal Resins in 19th Century Oil Paints and Resin/Oil Varnishes, Preprints Art 2002, Antwerp (2002).
32. Scalarone D., Lazzari M., Chiantore O.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 64: 345-361 (2002).
33. Scalarone D., Lazzari M., Chiantore O.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 68: 115-136 (2003).
34. Van der Doelen G.A., van den Berg K.J., Boon J.J.: *Stud. Conserv.* 43: 249-264 (1998).
35. van der Werf I. D., van der Berg K. J., Schmitt S., Boon J.J.: *Stud. Conserv.* 45: 1-18 (2000).
36. Marner F.J., Freyer A., Lex J.: *Phytochemistry* 30: 3709-3712 (1991).
37. Stern B., Heron C., Corr L., Serpico M., Bourriau J.: *Archaeometry* 45: 457-469 (2003).
38. van der Berg K.J., Boon J.J., *J. Photoch. Photobio. A* 134: 45-57 (2000).

39. Cartón G., Russo M.V., Spinelli F., Talarico F.: *Annali di Chimica* 94: 767-782 (2004).
40. Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou M.N., Apazidou K.K., Psarros E.E.: *J. Chromatogr. A* 769: 263-273 (1997).
41. de la Cruz-Cañizares J., Doménech-Carbó M.T., Mateo-Castro R., Gimeno-Adelantado J.V., Bosch-Reig F.: *J. Chromatogr. A* 1093: 177-194 (2005).
42. Mathe C., Culioli G., Archier P., Vieillescazes C.: *J. Chromatogr. A* 1023: 277-285 (2004).
43. van den Berg K.J.: Diterpenoid resins in paintings, in Proceedings of Molart 98. The evaluation workshop, FOM-AMOLF, Amsterdam, 11 (1998).
44. Van den Berg K.J., Boon J.J., Pastorova I., Spetter L.F.M.: *J. Mass Spectrom.* 35: 512-533 (2000).
45. D'Alessandro F., Marucchini C., Minuti L., Zadra C., Taticchi A.: *Ital. J. Food Sci.* 17: 83-88 (2005).
46. Colombini M.P., Modungo F., Ribechini E.: *J. Mass Spectrom.* 40: 675-687 (2005).
47. Aruga R., Mirti P., Fazoli A., Palla G.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 365: 559-566 (1999).
48. Gimeno-Adelantado J.V., Mateo-Castro R., Doménech-Carbó M.T., Bosch-Reig F., Doménech-Carbó A., Casas-Catalán M.J., Osete-Cortina L.: *J. Chromatogr. A* 922: 385-390 (2001)
49. Rasti F., Scott G.: *Stud. Conserv.* 25: 145-156 (1980).
50. Meilunas R.J., Bentsen J.G., Steinberg A.: *Stud. Conserv.* 35: 33-51 (1990).
51. van der Weerd J., van Loon A., Boon J.J.: *Stud. Conserv.* 50: 3-8 (2005).
52. Erhardt D., Tumosa Ch.S., Mecklenburg M.F.: *Stud. Conserv.* 50: 143-52 (2005).
53. Van der Doelen G.A., van den Berg K.J., Boon J.J.: *Stud. Conserv.* 43: 249-257 (1998).
54. van der Werf I.D., van der Berg K J., Schmitt S., Boon J.J.: *Stud. Conserv.* 45: 1-18 (2000)
55. Oros D.R., Simoneit B.R.T.: *Appl. Geochem.* 16: 1513-1544 (2001).
56. de la Cruz-Canizares J., Doménech-Carbó M.T., Gimeno-Adelantado J.V., Mateo-Castro R., Bosch-Reig F.: *J. Chromatogr. A* 1025: 277-285 (2004).
57. Osawa Z.: *Polym. Degrad. Stab.* 20: 203-236 (1988).
58. Rasti F., Scott G.: *J. Eur. Polym.* 16: 1153-1158 (1980).
59. Mallégol J., Lemaire J., Gardette J.L.: *Prog. Org. Coat.* 39: 107-113 (2000).

6. Seznam použitých zkratek

BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FAB	fast atom bombardment
$g(x), \tilde{x}$	medián neboli hodnota středu uspořádaného výběru
GC-MS	gas chromatography mass spectrometry (plynová chromatografie s hmotnostním detektorem)
HMDS	hexamethyldisilazan
k_n	tabelovaný statistický koeficient
N_i	normalizované plochy píků
ΔN_i	relativní úbytek
Na ₂ EDTA	sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
Py-GC-MS	pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry (plynová pyrolysní chromatografie s hmotnostním detektorem)
R	rozpětí
$R_{i,j}$	rozlišení
s	směrodatná odchylka
$t_{R,i}$	retenční čas látky i
$t_{R,j}$	retenční čas látky j
TMS ester	trimethylsilyl ester
TMSI	N-trimethylsilylimidazol
x_l	nejnižší hodnota
x_n	nejvyšší hodnota
$Y_{t,i}$	šířka píku látky i při základně
$Y_{t,j}$	šířka píku látky j při základně

Analýza červených a modrých barviv a pigmentů obsažených v barevných vrstvách uměleckých děl

1. Úvod

V barevných vrstvách uměleckých děl nalzáme několik tříd organických látek, jako jsou např. organické pigmenty a barviva, proteinová, olejová nebo polysacharidová pojiva a přírodní či syntetické pryskyřice. Mezi současné analytické metody používané k identifikaci těchto látek se řadí hlavně klasická plynová chromatografie a plynová pyrolysní chromatografie (GC-FID, GC-MS a Py-GC-MS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Většina z těchto metod se poměrně běžně používá v laboratořích sloužících restaurátorským školám. Ostatní méně běžné metody jsou spíše předmětem vědeckého zájmu a nejsou využívány při rutinních analýsách uměleckých děl.

V odborné literatuře se při identifikaci modrých pigmentů můžeme setkat například s PIXE (proton induced x-ray emission) nebo neutronovou aktivační analýzou (NAA) [1]. Skenovací elektronový mikroskop s energeticky-disperzním detektorem (SEM-EDX) se sice rutinně používá ke zjištění prvkového složení, ale v případě identifikace organických látek včetně neminerálních modrých pigmentů je naprosto neúčinný kvůli jejich prakticky stejnému prvkovému složení (C, H, O); například pruská modř nemůže být pomocí SEM-EDX jednoznačně identifikována podle obsahu železa, protože železo se vyskytuje téměř ve všech pigmentech. Ftalocyanin měďnatý nemůže být rovněž určen podle obsahu mědi, protože její koncentrace ve světlejších odstínech tohoto jinak velmi tmavého a vydatného modrého barviva je velmi nízká. Měďnatý kation se navíc opět hojně vyskytuje i v jiných pigmentech. Identifikace modrých pigmentů jako je indigo, pruská modř a měďnatý ftalocyanin je restaurátory velmi žádaná, protože díky nim je možné alespoň přibližně datovat neznámá umělecká díla (tab. I).

V této práci se zabýváme identifikací neminerálních modrých pigmentů pomocí infračervené spektroskopie a hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF a identifikací přírodních červených barviv pomocí MALDI-TOF MS. Identifikace tří neminerálních modrých pigmentů nebyla vybrána náhodně. Pruská modř, indigo a ftalocyanin

měďnatý jsou jinými metodami obtížně detekovány, ale přesto slouží při určování pravosti uměleckých děl jako jedny z nejpřesněji datovatelných barviv (tab. I).

Tabulka I. Modré pigmenty používané v Evropě, jejich datování a analytické metody, kterými se dnes pigmenty nejčastěji identifikují.

Evropa	Datování	Analytické metody sloužící k identifikaci
indigo, mayská modř	starověk	FTIR, Raman
měďnaté pigmenty	starověk	EDX, prášková rtg. difrakce
smalt	středověk	EDX
ultramarin	středověk	EDX, prášková rtg. difrakce
pruská modř	1704 objevena 1750 běžně používána	EDX, Raman, FTIR
ftalocyanin měďnatý	1935-1938	FTIR, Raman

Cílem této části disertační práce bylo:

- 1) Zkvalitnění infračervených spekter získaných z povrchů barevných vrstev a odstranění deformačních efektů výběrem nejlepší techniky měření tak, aby se mohla aplikovat na běžné vzorky malířských děl. Slabým článkem infračervené spektroskopie je totiž deformace spekter zejména Christiansenovými efekty, které často vznikají při měření vzorků v leštěných nábrusech.
- 2) Zjistit nejnižší koncentrace vybraných modrých barviv jak v čerstvých, tak i v uměle stárnutých vzorcích, při kterých by byla jejich detekce v odlišně připravených vzorcích ještě spolehlivá. Vybrané neminerální modré pigmenty byly studovány infračervenou spektroskopií, která je jednou z nejperspektivnějších metod pro určení modrých

pigmentů a základních typů organických pojiv, a hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.

- 3) Identifikovat červená organická barviva a pigmenty pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF. Identifikace červených organických barviv a pigmentů touto metodou je založena na identifikaci molekulového iontu barvicí látky a také na její vysoké citlivosti vůči proteinům (tab. II), respektive jejich peptidovým štěpům. Barviva přírodního původu obsahují často kromě molekul samotných barviv také doprovodné proteiny, které se liší podle původu barviv. Porovnáním doprovodných peptidů je tak možné zjistit, jaké barvivo bylo v uměleckém díle použito a jakého je původu. Jednou z nejčastěji používaných proteas ke specifickému štěpení proteinů je trypsin, který je velmi oblíben pro své unikátní vlastnosti (kap. 1.3).

Tabulka II. Analytické metody používané k identifikaci organických barviv v malířských materiálech.

Metoda	Sledovaná látka	Množství vzorku	Detekční limit
TLC-IR detekce	purpurin	-	$20 \cdot 10^6$ ng/ml [12]
HPLC-UV detekce	antrachinony	-	100 ng/g [13]
RPHPLC-UV detekce	antrachinony	-	$1-1,5 \cdot 10^6$ ng/ml [14]
voltametrie mikročastic	antrachinony, flavony, indigo, pruská modř	< 1 mg	0,1 (hm. %) [15]
ESI-MS kombinovaná s kapilární elektroforesou-UV/Vis detekce	antrachinony	0,5 mg	100-500 ng/ml [16]
ESI-MSD	antrachinony	0,6 mg	30-90 ng/ml [17]
MALDI-TOF MS	peptidy	0,5 μ g [18]	$20 \cdot 10^6$ ng/ml [19]
	barviva	-	-

Pozn. ESI-MSD – elektrosprejová ionizační hmotnostní detekce.

1.1 Modré pigmenty

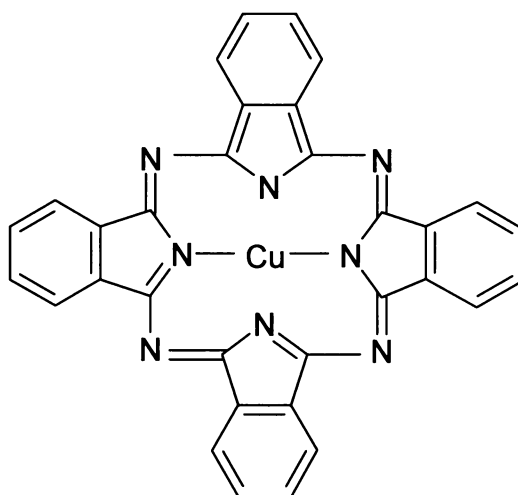
V následujícím odstavci je uvedeno několik příkladů identifikace neminerálních modří v uměleckých dílech. Přítomnost pruské modří na iluminovaném rukopisu byla zjištěna použitím kombinace metody LIBS (laser induced breakdown spectroscopy), hyperspektrálního zobrazení a difusně reflexních spekter [2]. V jiném průzkumu byla vyzkoušena energeticky-dispersní rentgenová fluorescence (EDXRF), optická mikroskopie a Ramanova mikrospektroskopie k identifikaci modří na pěti řeckých ikonách [3]; pouze Ramanova mikrospektroskopie úspěšně detekovala pruskou modř a indigo. V dalším případě opět pouze Ramanova spektroskopie identifikovala pruskou modř a ftalocyanin měďnatý na šesti padělcích egyptských papyrů [4]. Indigo v mayské modři bylo rovněž potvrzeno Ramanovou spektroskopií [5,6]. Ramanova spektroskopie je tak jedinou metodou, která dokáže identifikovat modré pigmenty v tenkých, často jednovrstvých vzorcích, jako tomu bylo například v případě identifikace pruské modře a dalších pigmentů na tapetách ze 30. let 19. století [7]. Identifikací indiga se zabývá řada analytických metod a mezi jinými i hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption-ionisation time of flight) [8] a tenkovrstvá chromatografie [9,10]. Studium fotodegradace přírodního a syntetického indiga pomocí HPLC spojeného s DAD – detektorem s diodovým polem – se zabývá publikace [11].

1.1.1 Pruská modř

Pruská modř byla poprvé vyrobena Diesbachem v roce 1704 a byla běžně používána do roku 1970, kdy byla nahrazena ftalocyaninem. Pigment není světlostálý a nesmí být používán v alkalickém prostředí, protože hnědne. Vzorec pruské modře není dosud jednoznačně definován, uvádí se $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot 14\text{-}16\text{H}_2\text{O}$ nebo $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

1.1.2 Ftalocyanin měďnatý

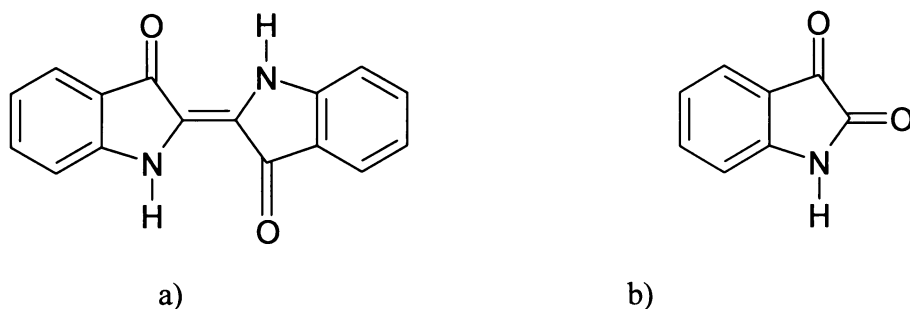
Ftalocyaninová modř (obr. 1) je organické syntetické barvivo – ftalocyanin měďnatý – které bylo veřejnosti poprvé představeno na výstavě v Londýně v roce 1935 pod názvem monastrálová modř [9]. V malířství se začalo používat až od roku 1938. Barvivo má vysokou barevnou vydatnost, je stále na světle a odolné vůči chemikáliím a rozpouštědlům.



Obrázek 1. Strukturní vzorec ftalocyaninu měďnatého.

1.1.3 Indigo

Indigo je barvivo přírodního původu získávané především z listů rostlin rodu *Indigofera* [10]. Teprve po fermentaci a následné oxidaci vzduchem původně bezbarvé barvivo zmodrá. Objevem výroby umělého indiga z isatinu (obr. 2) v roce 1870 se postupně ukončilo používání přírodního indiga.



Obrázek 2. Strukturální vzorec a) indiga a b) isatinu.

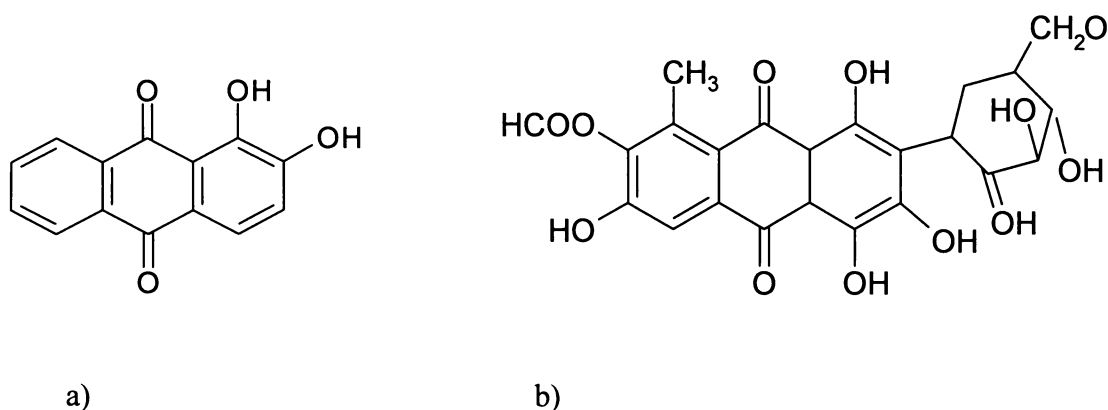
1.2 Červené pigmenty a barviva

Identifikace červených organických barviv a pigmentů (organický pigment vznikne vysrážením organického barviva na anorganický substrát) v komplikovaných heterogenních směsích v reálných vzorcích uměleckých děl není dosud uspokojivě vyřešena. Většina používaných analytických metod vyžaduje vzorek v kapalném stavu. Extrakty z antrachinonových barviv jsou často analysovány tenkovrstvou chromatografií [20], kapalinovou chromatografií [21,22] nebo reversní kapalinovou chromatografií [13,14,23-31] či hmotnostní spektrometrií s elektrosprejem (ESI-MSD), která má vyšší selektivitu a citlivost než RP-HPLC s UV-detekcí. Detekční limity jsou shrnuty v tabulce II. Standardy kyseliny karmínové, emodinu, purpurinu, alizarinu a lakaové kyseliny, typických přírodních červených barviv lišících se pouze v různě substituovaném 9,10-antrachinonovém skeletu (obr. 3a), byly studovány kapilární elektroforesou v kombinaci s elektrosprejem [16]. Nově testovaná metoda hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF a hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionisací byly – obě v negativním modu – použity k přímému potvrzení kyseliny karmínové v kapalných směsích se lněným olejem [32]. Kapalné vzorky barviv, které jsou pro tyto analytické metody nezbytné, jsou získány rozpuštěním reálných vzorků v kyselinách s následnou extrakcí. Nevýhodou rozpouštění vzorku je rozklad některých červených barviv, která nejsou stabilní v kyselém prostředí [15,33].

Metody zabývající se analýsou pevných vzorků mohou poskytovat doplňující informace jako v případě infračervené spektroskopie kombinované s viditelnou spektroskopií. Obě spektrální metody díky přítomnosti proteinu v červené malbě na Byzantském rukopisu [34] nepřímo potvrdily přítomnost antrachinonu hmyzího původu. Přímá identifikace červených organických barviv podle obsahu charakteristických proteinů závislých na původu barviva a podle molekulových iontů barvicích látek může být uskutečněna pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF.

1.2.1 Kyselina karmínová

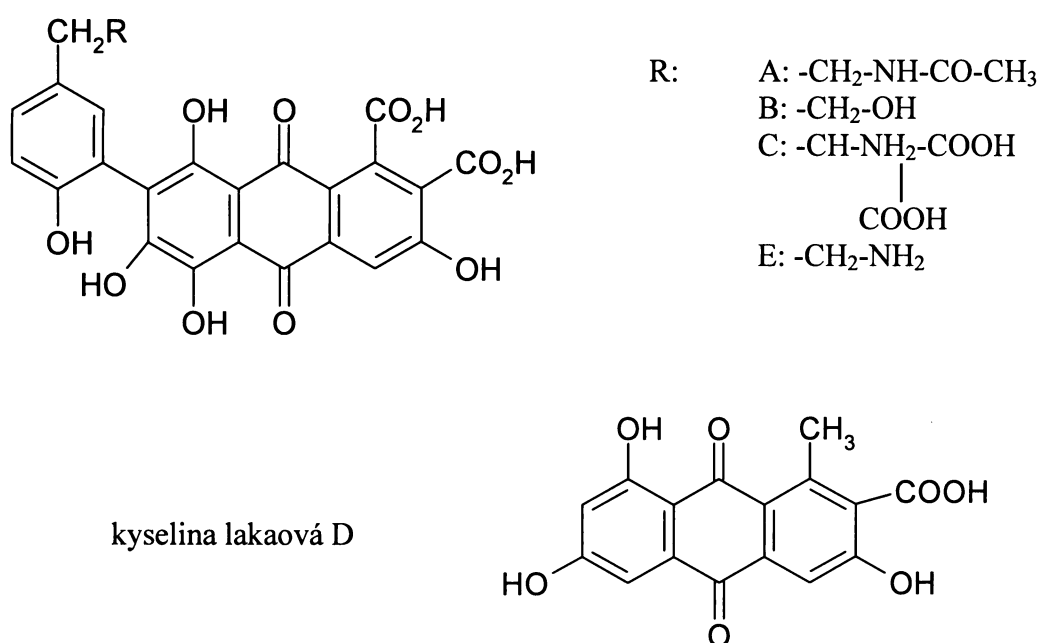
Kyselina karmínová (obr. 3b) je základní složkou červeného barviva nazývaného košenila nebo karmín. Získává se z usušeného hmyzu červce nopálového (*Coccus cacti*), který ve svém těle obsahuje 10-14 % barviva [35]. Do Evropy se barvivo začalo dovážet ze Střední a Jižní Ameriky v 16. století. Kyselina karmínová se používá i dnes, např. jako potravinářské barvivo s označením E120.



Obrázek 3. a) Strukturní vzorec základního 9,10–antrachinonového skeletu antrachinonových barviv.
b) Strukturní vzorec kyseliny karmínové.

1.2.2 Kyselina lakaová

Kyselina lakaová je vlastní barevnou složkou organického barviva živočišného původu zvaného lac dye nebo lakaová červeň. Pod názvem kyselina lakaová se skrývá pět podobných derivátů antrachinonu (obr. 4). Červené barvivo se získává jako směs těchto derivátů z pryskyřičnatých skořápek obsahujících sekret a tělo uhynulé matky hmyzu *Coccus lacca*. Tento hmyz žije na stromech *Gemus ficus* rostoucích především v jihovýchodní Asii (Indii, Bengálsku) [10].

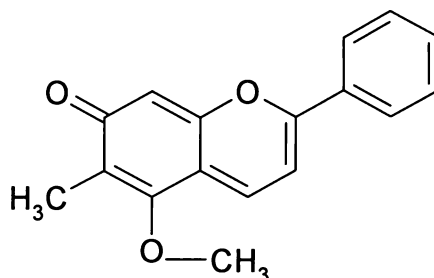


Obrázek 4. Chemická struktura různých forem (A, B, C, D a E) kyseliny lakaové.

1.2.3 Pyronová barviva

Dracorubin a dracorhodin (obr. 5) jsou součástí červeného barviva zvaného dračí krev. Barvivo se získává z pryskyřičnaté šťávy palmy rotanu dračího (*Calamus draco*) původem z východní Asie. Od starověku se toto barvivo velmi často používalo jako lakový pigment

v malbě [9]. Dříve bylo používáno i přímo jako barvivo. Od 18.-19. století se užívalo jen omezeně, zejména na laky, politury na nábytek, jako pigment pro iluminaci knih, pro lazury na stříbrné folie a jiné kovy [36].



Obrázek 5. Chemická struktura pyronového barviva dracorhodinu.

1.3 Identifikace bílkovin metodou peptidového mapování

Metodou MALDI-TOF MS lze studovat nejen celé proteiny, ale častěji peptidové štěpy, které nám mohou pomoci s identifikací bílkoviny (vyhledáním v internetových databasích) a také mohou poskytnout cenné informace o struktuře bílkoviny. Peptidové štěpy získáváme buď specifickým enzymovým anebo chemickým štěpením. Jednou z nejčastěji používaných proteas je trypsin (EC 3.4.21.4), který štěpí za aminokyselinovými zbytky lysinu a argininu. Za těmito bazickými aminokyselinami neštěpí pouze v případě, když po nich následuje prolin. Protože trypsin podléhá autokalytickému štěpení, objevují se ve spektrech jeho autokatalytické štěpy, píky s hmotnostním poměrem 842, 1045 a 2211 *m/z*. Optimální pH trypsinu je 7-9, inaktivován je až při pH vyšším než 11. Trypsin není inaktivován přítomností vápníku ani jiných běžných kovových iontů.

2. Chemikálie a materiál

2.1 Červená organická barviva a pigmenty

V tabulce III jsou popsána vybraná červená barviva a pigmenty nebo přírodní materiály, ze kterých jsou tradičně vyráběny. Produkty uvedené v tabulce III byly analysovány infračervenou spektroskopií a hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Jsou označeny tradičním názvem barviva a charakterizovány katalogovým číslem. V tabulce IV je pak uvedeno jejich složení zjištěné rentgenovou difraktometrií. Pigmenty a barviva byly zakoupeny u firmy Georg Kremer, Farbmühle, Aichstetten/Allgäu, Německo. Kyselina karmínová byly dodána firmou Aldrich.

Tabulka III. Charakteristiky komerčních produktů.

Název	Katalogové číslo	Forma	Původ	Barvicí látka/y
lakaová červeň (lac dye)	36020	hotové barvivo	<i>Coccus lacca</i>	směs lakaových kyselin
košenila	36040	sušený hmyz	červec nopálový (<i>Coccus cacti</i>)	kys. karmínová
košenilový karmín	42100	hotové barvivo	červec nopálový (<i>Coccus cacti</i>)	kys. karmínová
dračí krev	37000	hotové barvivo	rotan dračí (<i>Calamus draco</i>)	dracorhodin a dracorubin
kraplak	37200B	sušené části rostlin	mořena barvířská (<i>Rubia tinctoria</i>)	alizarin a purpurin
rotholzextrakt	36160	extrakt	rod <i>Caesalpinia</i>	brasilein

Tabulka IV. Prášková rentgenová difraktometrie (XRD) komerčně dostupných červených barviv a pigmentů.

Látka	Popis	Prokázané krystalické fáze
dračí krev	vysoké pozadí – amorfní fáze	10-0423 berlinit (AlPO ₄) 46-1045 křemen
karmín	krystalické organické fáze, bez identifikace	-
košenila (<i>Coccus cacti</i>)	krystalické a amorfní fáze, bez identifikace	-
lakaová červeň	krystalické fáze, bez identifikace	-
kraplak	-	-
rotholzextrakt	amorfní fáze, bez identifikace	-

Čísla před názvem prokázaných krystalických fází jsou katalogová čísla z databáze rentgenových difraktogramů JCPDS PDF2, Sets 1-50, International Centre for Diffraction Data, Newtown, Pennsylvania, USA, 2000.

2.2 Příprava modelových vzorků neminerálních modří

Modelové barevné vrstvy byly připraveny z pruské modře, přírodního indiga (natural indigo, produkt číslo 36000, Georg Kremer, Farbmühle, Aichstetten/Allgäu, Německo) a měďnatého ftalocyaninu (Sigma-Aldrich). Pruská modř byla vyrobena podle tradičního receptu pana Diesbacha z roku 1731 [37]: smícháním 300 ml vodného roztoku připraveného z 23,70 g KAl(SO₄)₂·12 H₂O a 2,78 g FeSO₄·7 H₂O a 150 ml roztoku připraveného z 2,60 g KCN a 5,52 g K₂CO₃. Roztok bylo nutné míchat šest hodin na vzduchu. Fázové složení pruské modře Fe₄[Fe(CN)₆]₃ bylo zkontrolováno práškovou rentgenovou difrakcí.

Indigo a ftalocyanin měďnatý byly smíchány v koncentrační řadě (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 a 30 hm. %) a pruská modř byla smíchána v koncentrační řadě (0,1; 0,3; 1; 3; 10 a 30 hm. %) s olovnatou bělobou (cerusitem, 2PbCO₃·Pb(OH)₂), které bylo ve vzorku vždy

8 hm. %, a zbytek do 100 % byl doplněn plavenou křídou (kalcitem, CaCO_3). Směsi byly spojeny pár kapkami lněného oleje (Umton, Děčín, ČR), pak byly natřeny na dřevěné destičky, které byly ošetřeny bílým křídovým podkladem (CaCO_3) s želatinovým pojivem, a následně byly ponechány schnout za laboratorních podmínek (Obrazová příloha, obr. I). Po zaschnutí byly destičky rozřezány na dvě poloviny. Jedna polovina byla vystavena simulovanému stárnutí a druhá sada sloužila jako kontrolní standard. Umělé stárnutí probíhalo v sušárně po dobu 20 týdnů při teplotě cca 60°C za současného působení UV lampy vyzařující záření o vlnových délkách 365 nm a 405 nm. Výkon UV lampy byl $370 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Po této době byla proměřena infračervená spektra stárnutých a nestárnutých vzorků metodou FTIR a difusně reflexní spektrofotometrie ve viditelném světle. Při následném porovnání spekter obou sad modelových vzorků byly sledovány změny, které byly způsobeny simulovaným stárnutím.

2.3 Příprava modelových vzorků organických červení

Modelové vzorky byly připraveny pro analýsu infračervenou spektroskopií. Vyjmenované složky jednotlivých pojiv byly smíchány dohromady a tím bylo pojivo připraveno ke smíchání s karmínem (42100, Kremer), se kterým se pojiva tradičně používala. Množství pojiva přidávaného k pigmentu či barvivu bylo odhadnuto na základě zkušenosti.

1) Akvarelové pojidlo (akvarel) [38]

13,5 g arabské gumy (2430, Kremer)

2 g volské žluči (neznámý původ)

9 g medu (neznámý původ)

26 g vody

2) Kaseinová olejová tempera (kasein) [39]

100 obj. dílů kaseinu kasein (2410, Kremer)

100 obj. dílů lněného oleje (Umton, Děčín, ČR)

8 obj. dílů čpavku (24% vodný roztok) (p.a., min. 25%, Lachema Brno)

250 obj. dílů vody

3) Kvašové pojídlo (kvaš) [38]

10 g arabské gumy (2430, Kremer) desinfikované zrnkem kafru (neznámý původ)

20 g vody

4 g medu (neznámý původ)

2.4 Reálné vzorky

Reálné vzorky uměleckých děl byly poskytnuty Akademií výtvarných umění v Praze. První vzorek pocházel z přemalby obrazu Panny Marie Ochránitelky (olej na dřevě, původní datace do roku 1500), viz Obrazová příloha, obr. II. Druhý vzorek pro infračervenou spektroskopii a hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF pocházel z obrazu českého kubistického malíře (označen názvem Kubismus), který byl datován do roku 1930 a u kterého nebyla jistá jeho pravost.

3. Příprava vzorků a analytické metody

3.1 Příprava vzorků

Mikrotomové řezy

Vzorky byly zality do polyesterové prykyřice a nařezány skleněnými noži v tloušťce 2 μm na ultramikrotomu Pyramitom umístěném na 1. lékařské fakultě UK v Praze. Řezy byly přeneseny na křemíkovou destičku a narovnány povrchovým napětím na kapkách teplé vody. Ačkoliv křemíkové destičky nejsou oproti jiným materiálům (např. KBr, NaCl, CaF_2 , AgCl atd.) používaným v infračervené spektroskopii nejvhodnější, protože pohlcují (případně odrážejí) značnou část energie použitého záření, byly vybrány kvůli jejich nerozpustnosti v teplé vodě, tepelné stabilitě a snadné dostupnosti.

Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF

Vzorky modrých barviv a pigmentů byly nejprve míchány s 5 μl roztoku 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB, Sigma) (6,7 mg DHB ve směsi 30% acetonitrilu (Lachema Brno) a 0,1% trifluoroctové kyseliny (Sigma) (1/2; v/v)), ale přídavek matrice se během měření neosvědčil (kap. 4.3.1), proto byl přidávaný roztok zjednodušen na roztoku 30% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyseliny (1/2; v/v). Směsi pevných částic s kapalinou byly ponechány uschnout na ocelové vzorkovací destičce a pak byly změřeny.

Pro identifikaci komerčně dostupných červených barviv a pigmentů přírodního původu podle jejich doprovodných proteinů byly jejich vzorky specificky štěpeny trypsinem zakoupeným od firmy Promega Corporation. Každý vzorek o hmotnosti několika mikrogramů byl štěpen v 6 μl trypsinového roztoku (100 μl 50 mM roztoku NH_4HCO_3 s 1 μl trypsinu o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$), který byl aplikován přímo na vzorek. Štěpení probíhalo v mikrozkuvkách při laboratorní teplotě po dobu dvou hodin [19,40]. Získaná peptidová směs v roztoku nad vzorkem byla nejprve přečištěna a zahuštěna na reversní fázi C18 ZipTip od firmy Millipore Corporation (Bedford, MA 01730, USA), viz kap. 3.2. 1,5 μl přečištěného

roztoku bylo smícháno s 5 μ l roztoku 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB, Sigma) (6,7 mg DHB ve směsi 30% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyseliny (1/2; v/v)). Výsledná směs o objemu 1,5 μ l byla nanášena na ocelovou vzorkovací destičku a ponechána uschnout.

V případě identifikace červených barviv a pigmentů podle molekulových iontů jejich barvicích látek bylo několik mikrogramů barviva či pigmentu smícháno s roztokem 30% acetonitrilu a 0,1% trifluoroctové kyseliny (1/2; v/v). Směsi pevných částic s kapalinou pak byly opět ponechány uschnout na ocelové vzorkovací destičce a následně byly změřeny.

Každé spektrum bylo výsledkem nejméně 200 laserových pulsů. Přístroj byl pro každé měření externě kalibrován komerční peptidovou směsí MPep.

3.2 Promývací a zahušťovací roztoky pro reversní fázi ZipTip

Promývací roztoky:

- | | |
|------------------------|--|
| 1. aktivační roztok | 50% acetonitril v H ₂ O |
| 2. ekvilibrační roztok | 0,2% trifluoroctová kyselina v H ₂ O |
| 3. eluční roztok | 50% acetonitril s 0,1 % kyseliny trifluoroctové v H ₂ O |

Postup:

1. Reversní fáze je nejprve aktivována pětinásobným promytím po 10 μ l aktivačního roztoku.
1. Reversní fáze je ekvilibrována pětinásobným promytím 10 μ l ekvilibračního roztoku.
2. Navázání peptidů: 10 \times promýt 10 μ l analysovaného roztoku.
3. Ekvilibrace: 5 \times promýt 10 μ l ekvilibračního roztoku.
4. Eluce: 10 \times promýt jednorázově odebranými 6 μ l elučního roztoku. (Celkový objem analysovaného vzorku po eluci je 6 μ l.)
5. Eluce: zbývající navázané peptidy jsou odstraněny desetinásobným promytím 10 μ l elučního roztoku.
6. Celý postup je možné několikrát opakovat od bodu 2.

3.3 Popis použitých analytických metod

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Spektra byla naměřena na infračerveném mikroskopu Continuum™ se spektrometrem Nexus od firmy ThermoNicolet, USA umístěném na Polymer Institutu v Brně, v oblasti 4000-650 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} . Měření bylo rovněž provedeno na přístroji Magna 760 ThermoNicolet, USA s mikroskopem Inspect IR plus od firmy Spectra Tech, Wisconsin, USA na Katedře anorganické chemie Přírodovědecké fakultě UK. Spektra byla zpracována softwarem Omnic verze 6. Metoda ODRAZ byla definována 256 skeny, rozlišením 8 cm^{-1} a měřicím rozsahem 4000-600 cm^{-1} . Metoda DRIFTS byla definována 128 skeny, rozlišením 4 cm^{-1} a měřicím rozsahem 4000-400 cm^{-1} . Vzorky pro měření metodou DRIFTS byly míchány s KBr v poměru 1:50 až 1:100.

Difusně reflexní spektrofotometrie ve viditelném světle

Spektra byla naměřena z povrchu pevných vzorků (Obrazová příloha, obr. I) na spektrofotometru LAMBDA 35, UV-VIS od firmy Perkin Elmer instruments (USA) se systémem UV WINLAB na Ústavu anorganické chemie AV ČR v Řeži. Spektra byla měřena v rozsahu 200-900 nm s rozlišením 1 nm.

Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF

Hmotnostní spektra byla získána v reflektorovém modu na hmotnostním spektrometru Bruker-Daltonics Biflex IV MALDI-TOF na VŠCHT Praha vybaveném standardním dusíkovým laserem (337 nm). Spektra byla zpracována softwarem Bruker Flex III a Bruker XToF. Postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 3.1.

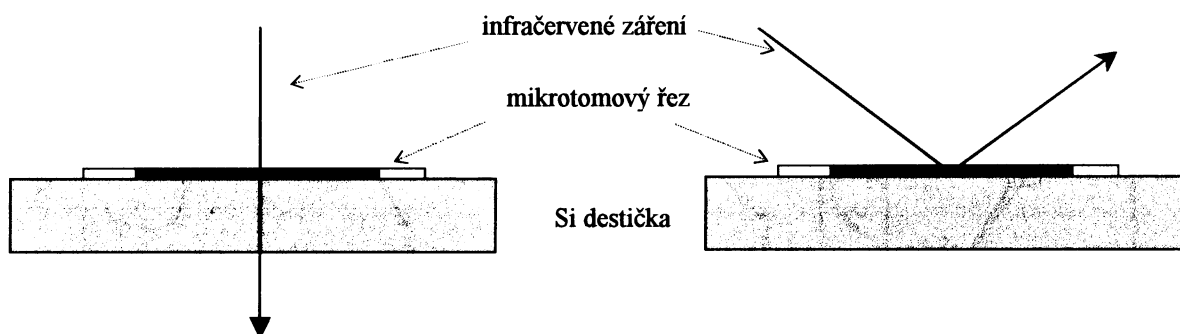
4. Výsledky a diskuse

4.1 Infračervená spektroskopie

Mezi nejspolehlivější analytické metody používané k identifikaci organických a neminerálních složek barevných vrstev uměleckých děl patří infračervená spektroskopie a Ramanova spektroskopie. Obě metody byly testovány na obdobně připravených modelových vzorcích [41,42]. Nevýhodou FTIR bývá komplikovanost spekter zapříčiněná smíšením spekulární a difusní reflexe, při kterém vzniká reflexní zkreslení, tzv. derivační pásy, případně inverse píků. Kritickým bodem této metody je tedy získání kvalitních spekter. Jiným často přehlíženým problémem je nedostatečné množství studií modelových vzorků připravených s technologicky smysluplnými kombinacemi pigmentů a matric, tj. plniv a pojiv.

V této práci byly zkoumány modelové vzorky tří modrých pigmentů (ftalocyaninu měďnatého, pruské modře a indiga) a matrice blízké se tradiční olejové technice. Vzorky byly měřeny dvojím způsobem. Nejdříve byl měřen hladký povrch barevných vrstev (Obrazová příloha, obr. I), který má podobné vlastnosti jako vyleštěný povrch nábrusů (Obrazová příloha, obr. IIIA). Dále byly změřeny mikrotomové řezy odrazovou technikou, protože transmisní měření (obr. 6a) poskytlo velmi nekvalitní spektra, což bylo způsobeno nízkým výkonem infračerveného spektrometru a silnou absorpcí (reflexí) křemíkové destičky. Kvalitní spektra z mikrotomových řezů vznikla díky absorpční reflexi, ke které došlo díky odrazu infračerveného záření po průchodu mikrotomovým řezem na povrchu křemíkové destičky (obr. 6b). Problémem však stále přetrvává získání kvalitních mikrotomových řezů z reálných vzorků, viz Obrazová příloha obr. IIIB.

Zjištěné nejnižší koncentrace modrých barviv v různých typech nestárnutých vzorků, při kterých lze pigmenty identifikovat, jsou shrnuty v tabulce V. U pruské modře byla nejnižší identifikovatelná koncentrace extrémně nízká, protože pod infračerveným mikroskopem bylo v mikrotomovém řezu velmi lehké najít dostatečně velké zrno čistého pigmentu.



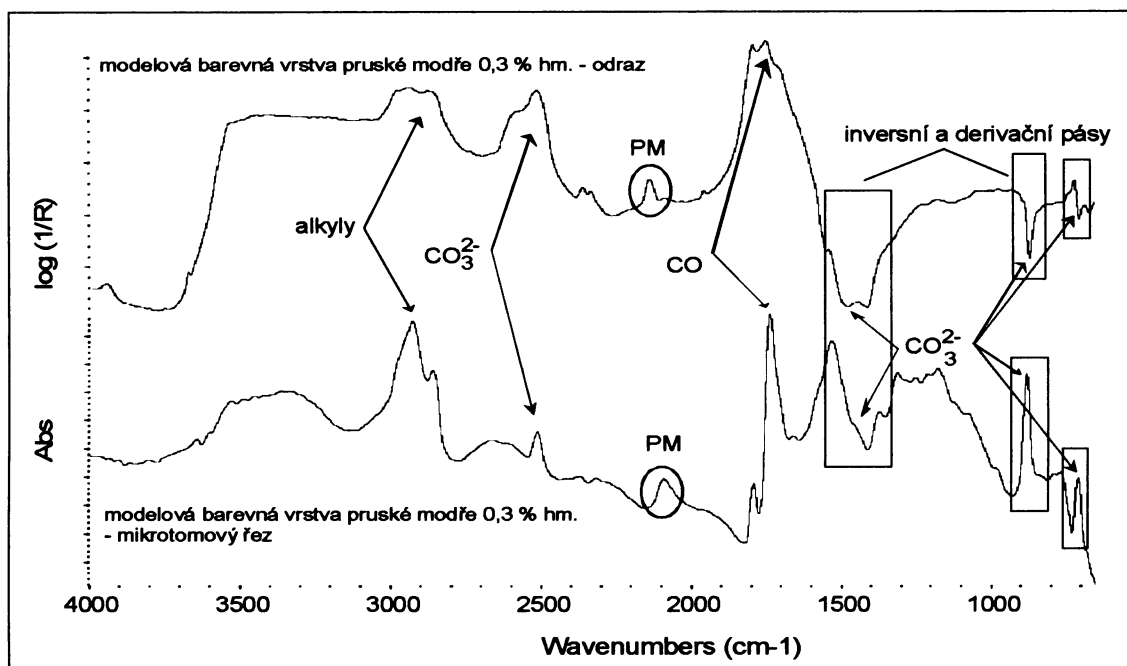
Obrázek 6. a) Transmisní měření infračervených spekter mikrotomových řezů.

b) Absorpční reflexe mikrotomových řezů.

4.1.1 Nestárnuté vzorky

Na obr. 7 je ukázka deformovaného infračerveného spektra získaného z hladkého vnějšího povrchu barevné vrstvy. Jedná se o derivační a inverzní pásy anorganických pigmentů. Podobné jevy systematicky zhoršují možnost spolehlivé detekce u dvou třetin všech takto získaných spekter (tab. V). U mikrotomových řezů nedošlo k výrazným deformacím spekter. Možným vysvětlením zlepšení kvality spekter je menší vliv spekulární reflexe, která především způsobuje výše uvedené deformační jevy. Záznamy získané reflexní absorpcí poskytují výsledky, které by byly téměř totožné se záznamy transmisních spekter měřených skrz dvojnásobně silný vzorek (viz obr. 6), přesto se i zde projevuje spekulární reflexe, viz inverzní pásy uhličitanů u 1450 cm^{-1} (obr. 7).

Na obr. 8 je patrné, jak dramaticky se mění infračervená spektra nestárnutých modelových vzorků o obsahu 10 a 3 % hm. ftalocyaninu měďnatého. Přestože je 3% barevná vrstva ftalocyaninu měďnatého velmi intenzivně zbarvená, viz Obrazová příloha obr. I, začíná zde být detekce barviva infračervenou spektroskopií velmi obtížná.



Obrázek 7. Srovnání infračervených spekter modelových vzorků pruské modře o koncentraci 0,3 % hm. Spektrum povrchu barevné vrstvy bylo naměřeno odrazovou technikou a spektrum mikrotomového řezu bylo získáno reflexní absorpcí. Derivační pásy jsou patrné zejména ve spektru modelové barevné vrstvy. Pík pruské modře u 2090 cm^{-1} je zakroužkovaný.

Tabulka V. Nejnižší koncentrace modrých barviv (v hmotnostních %), při kterých lze pigmenty ještě spolehlivě identifikovat pomocí infračervené spektroskopie technikou ODRAZ na nestárnutých hladkých vnějších površích a mikrotomových řezech.

Látka	Vlnočet (cm^{-1})	Hladký povrch (%)	Mikrotomový řez (%)
pruská modř	2094	1	0,3
	745	1	1
indigo	755	1	0,3
	1128	1	0,3
	1191	3	1
	1626	0,1	0,3
ftalocyanin měďnatý	756	0,1	1
	1090	3	1
	1122	0,1	1
	1165	0,3	1

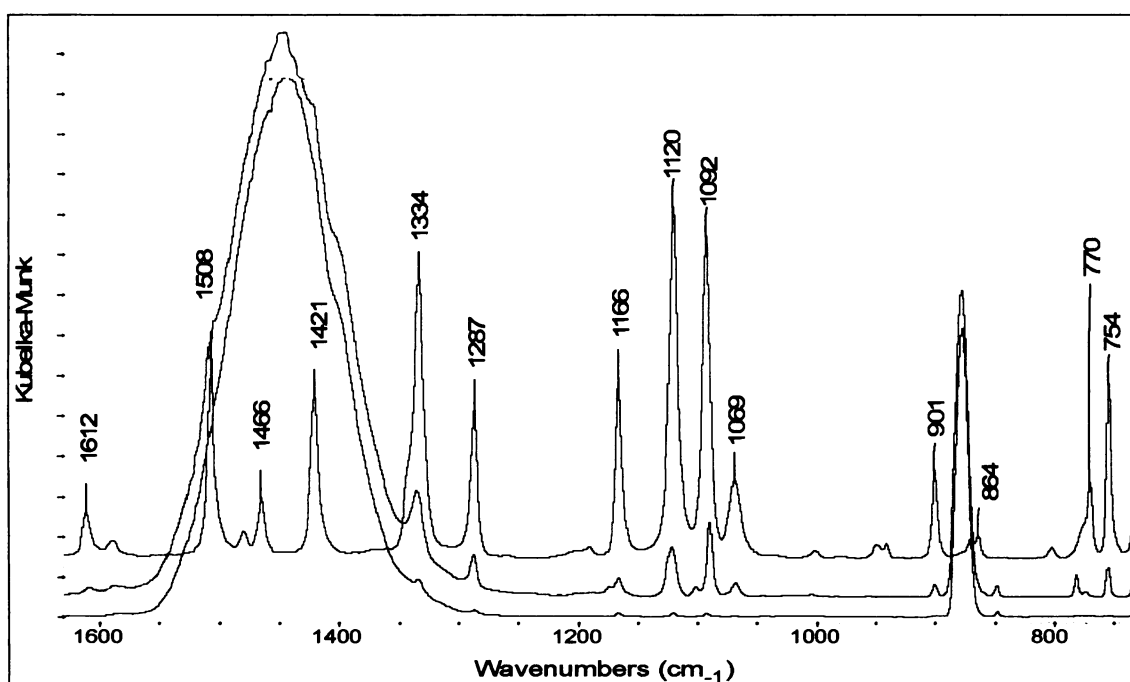
4.1.2 Stárnuté vzorky

Po vystavení modelových vzorků umělému stárnutí (20 týdnů při teplotě cca 60°C a za současného působení UV záření) byly modelové barevné vrstvy opět studovány infračervenou spektroskopií – metodami DRIFTS a ODRAZ. Jen u vzorků pruské modře se nejnižší koncentrace nutná pro spolehlivou detekci pigmentů oběma typy metod ve vzorcích nezvýšila, ale naopak snížila (tabulka VI). Možnost identifikace indiga metodou ODRAZ se u stárnutých vzorků výrazně zhoršila, a to nejméně o jeden řád. Metodou DRIFTS se možnost identifikace také zhošila, ale nejnižší koncentrace nutná pro identifikaci se většinou stále pohybuje v jednotkách procent. Ftalocyanin měďnatý je vysoce stabilní barvivo, přesto se jeho identifikace ve stárnutých vzorcích metodou ODRAZ zhoršila o jeden řád. Metodou DRIFTS zůstala nejnižší koncentrace barviva nutná pro jeho identifikaci zachována.

Tabulka VI. Nejnižší zjištěné koncentrace neminerálních modří (v hmotnostních %), při kterých lze pigmenty v olejovém pojivu ještě spolehlivě identifikovat odrazovými metodami infračervené spektroskopie.

Látka	Vlnočet (cm ⁻¹)	Nestárnuté vzorky		Stárnuté vzorky	
		DRIFTS (%)	ODRAZ (%)	DRIFTS (%)	ODRAZ (%)
pruská modř	2094	3	1	1	0,3
	610	10	-	3	-
indigo	755	3	0,1	1	10
	1071	1	0,3	3	30
	1128	1	0,1	3	30
	1174	1	1	3	30
	1191	1	3	10	10
	1585	1	1	3	3
	1613	1	0,3	1	3
	1626	1	0,1	3	3
ftalocyanin měďnatý	756	10	0,1	10	3
	1090	10	3	3	3
	1122	3	0,1	3	3
	1165	3	0,3	3	10
	1287	3	1	10	3
	1333	3	10	3	10

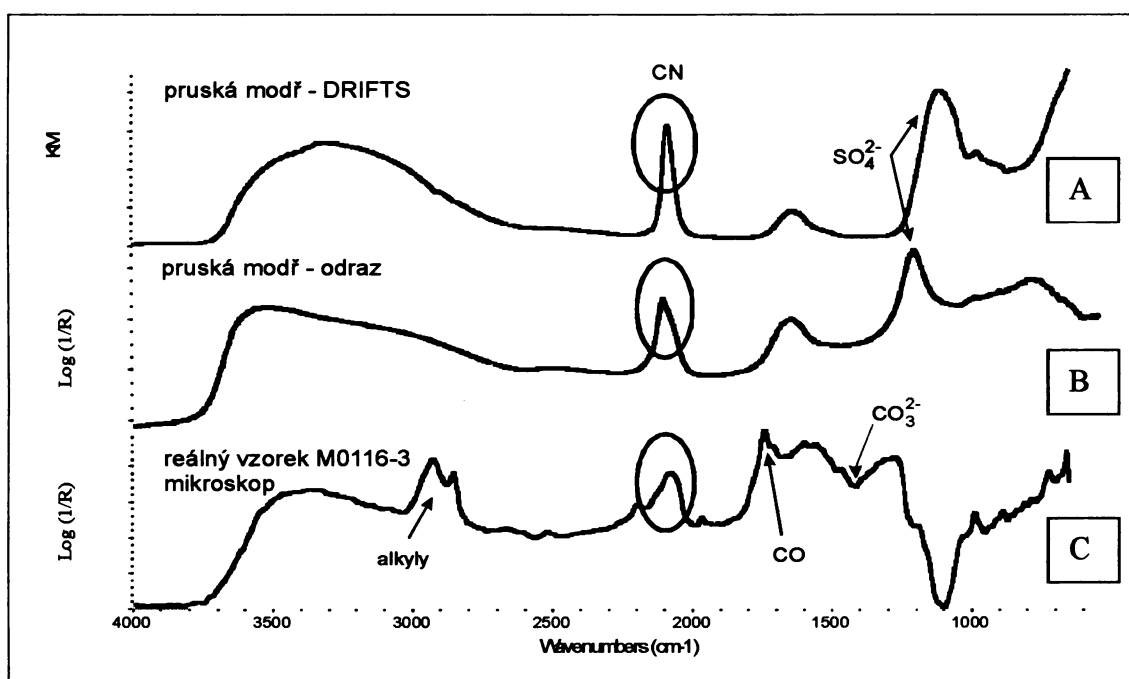
Jedním z možných vysvětlení zvýšení hodnoty nejnižší koncentrace u stárnutých modelových vzorků nutné pro spolehlivou identifikaci barviv v případě metody ODRAZ, je sedimentace barviv v dosud nezatuhlých, byť velmi viskózních, barevných vrstvách do vzdálenějších míst od povrchu. Tato příčina by vysvětlovala i zachování nejnižší koncentrace pruské modře potřebné k identifikaci po umělém stárnutí, protože její barevná vrstva byla nanášena v jediné, a to velmi tenké vrstvě. Dalším vysvětlením může být rozklad molekul barviv v povrchové vrstvě během stárnutí, např. indigo se může rozpadnout na isatin [43,44]. Fotodegradaci indiga se zabývá publikace [45].



Obrázek 8. Srovnání infračervených spekter získaných metodou DRIFTS čistého ftalocyaninu (modré spektrum) a nestárnutých modelových vzorků o koncentracích ftalocyaninu 10 hm. % (zelené spektrum) a 3 hm. % (červené spektrum).

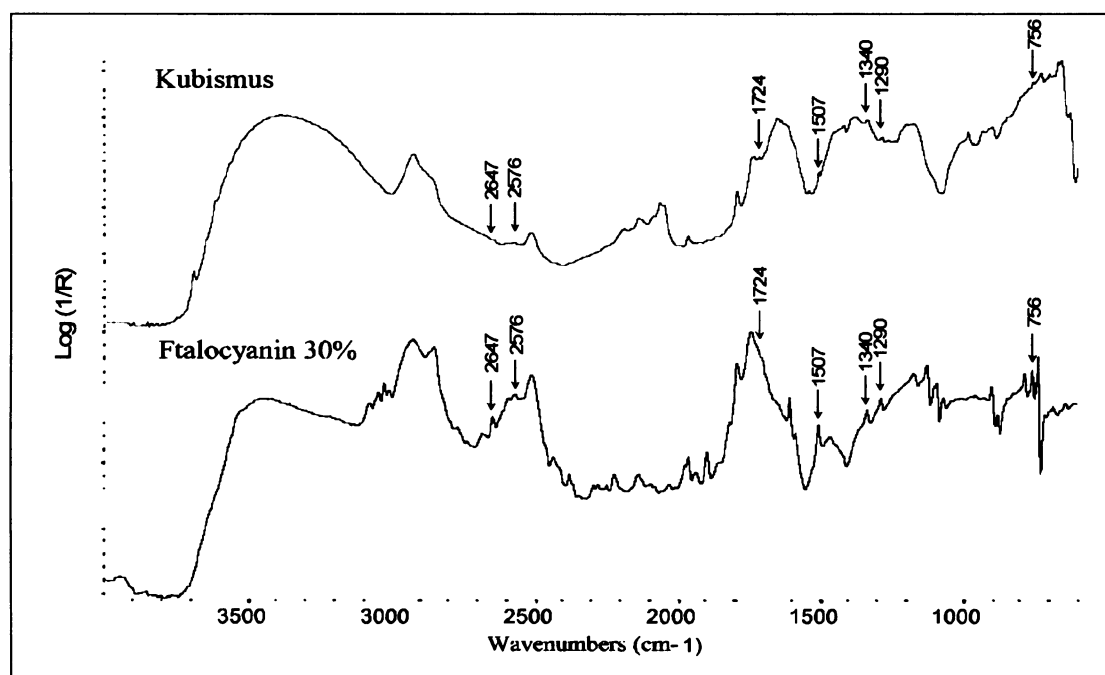
4.1.3 Analýza reálných vzorků pomocí infračervené spektroskopie

Citlivost infračervené spektroskopie ke studovaným modrým pigmentům v olejomalbách byla nejprve ověřena na modelových vzorcích. V reálném vzorku přemalby odebraném z oleje na dřevě obrazu Panny Marie Ochránitelky se podařilo jednoznačně identifikovat pruskou modř (vzorek M0116-3). Ačkoliv je ve spektru pruské modře pouze jeden diagnostický pík při vlnočtu 2090 cm^{-1} [37], je velmi charakteristický, protože pochází od $-\text{CN}$ skupiny a nebývá překrytý jinou výraznou anorganickou komponentou (obr. 9). Druhý pás při 607 cm^{-1} , který je projevem valenčních vibrací skupin $\text{Fe}-\text{N}$ [37], nebývá v reálných vzorcích příliš zřetelný. Přítomnost síranů ve vzorku samotné pruské modře je ve spektrech doložena jejich intenzivním pásem u $1100\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$. Sírany pravděpodobně pochází z $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ nebo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$, které byly přidány během přípravy pruské modře.



Obrázek 9. Infračervená spektra vzorků obsahujících pruskou modř, jejíž jediný diagnostický pík (2090 cm^{-1}) je zakroužkovaný. Popis spekter shora: A - samotná pruská modř měřená metodou DRIFTS, B - samotná pruská modř měřená odrazovou technikou a C - reálný vzorek přemalby z obrazu na dřevě Panny Marie Ochránitelky. U reálného vzorku se u vlnočtu 1450 cm^{-1} objevuje inverzní pás uhličitánové skupiny.

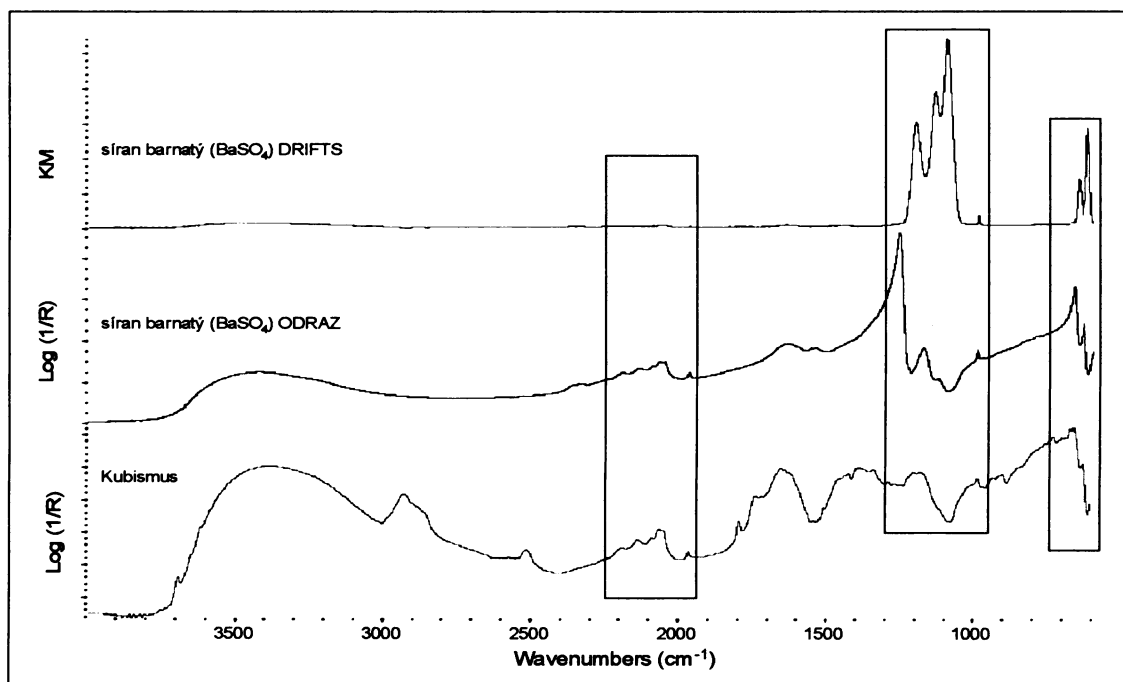
V reálném vzorku označeném Kubismus byl identifikován ftalocyanin (obr. 10) (756 cm^{-1} , 1290 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1507 cm^{-1} , 1724 cm^{-1} , 2576 cm^{-1} , 2647 cm^{-1}), síran barnatý (626 cm^{-1} , 656 cm^{-1} , 958 cm^{-1} , 1178 cm^{-1} , 1966 cm^{-1} , 2064 cm^{-1} , 2139 cm^{-1} , 2190 cm^{-1}), uhličitany (728 cm^{-1} , 1387 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} , 1795 cm^{-1} , 1966 cm^{-1} , 2139 cm^{-1} , 2514 cm^{-1}), olej (1745 cm^{-1} , 2856 cm^{-1} , 2928 cm^{-1}). Nalezený ftalocyanin dokládá, že dílo nemohlo být namalováno v roce 1930, ale nejdříve v letech 1935-1938. Je proto pravděpodobné, že zkoumaný obraz je padělek.



Obrázek 10. Porovnání reflexních infračervených spekter reálného vzorku označeného Kubismus a modelové barevné vrstvy s obsahem 30 % hm. ftalocyaninu měďnatého. V reálném vzorku byl nalezen ve velmi nízké koncentraci ftalocyanin.

V obrázku 11 je srovnání infračerveného spektra reálného vzorku Kubismus se spektry v něm obsaženého síranu barnatého, která byly naměřena metodami DRIFTS a ODRAZ. Porovnáním spekter lze zjistit, že odrazové spektrum reálného vzorku a síranu barnatého získaného metodou ODRAZ, na rozdíl od síranu barnatého měřeného metodou DRIFTS, si jsou velmi podobná. Široký pás u $1950\text{--}2250\text{ cm}^{-1}$ je pro síran barnatý charakteristický a odlišuje jej od jiných síranů. Tyto specifické pásy je sice možné složitě

interpretovat, ale zároveň slouží k jeho jednoznačné identifikaci. Obrázek 11 názorně dokazuje výhody měření infračervených spekter odrazovými technikami a jejich porovnání s obdobně měřenými (nejen modelovými) vzorky.



Obrázek 11. Porovnání odrazového spektra reálného vzorku označeného Kubismus a spekter síranu barnatého naměřených metodami DRIFTS a ODRAZ.

4.2 Vliv umělého stárnutí na spektrofotometrické vlastnosti modrých vrstev

4.2.1 Ftalocyanin měďnatý

Srovnáním difusně reflexních spekter ve viditelné oblasti záření nestárnutých (obr. 12) a uměle stárnutých (obr. 13) barevných vrstev s ftalocyaninem měďnatým bylo zjištěno, že umělé stárnutí nemělo na ftalocyanin žádný vliv. Pouze u nestárnutého vzorku o koncentraci 0,3 hm. % barviva ve vzorku došlo k chybnému naměření spektra. Ostatní spektra jsou po umělém stárnutí takřka totožná, protože ftalocyaninová barviva jsou velmi odolná vůči stárnutí.

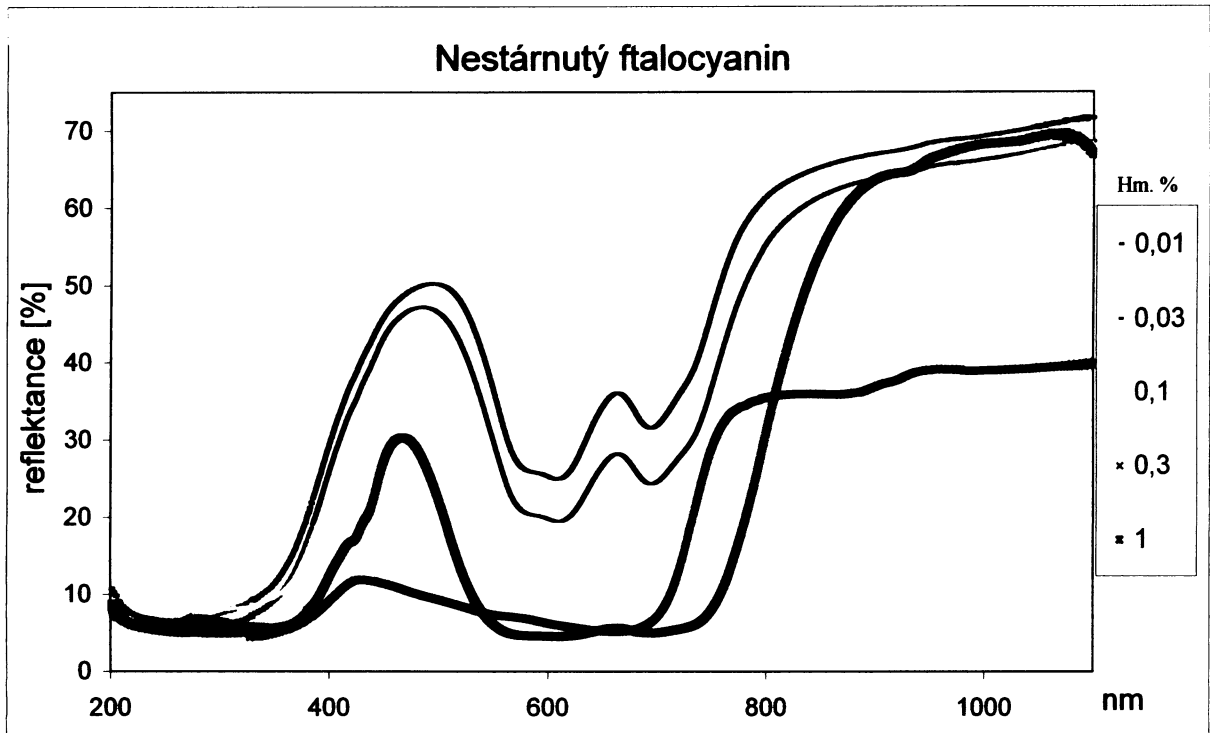
4.2.2 Pruská modř

U nestárnutých vzorků pruské modře je v obrázku 14 dobře vidět změna reflektance s přidavkem modrého barviva. Největší rozdíl ve tvaru spekter mezi dvěma po sobě následujícími koncentracemi barviva je u 0,1 a 0,3 hm. % barviva ve vzorku.

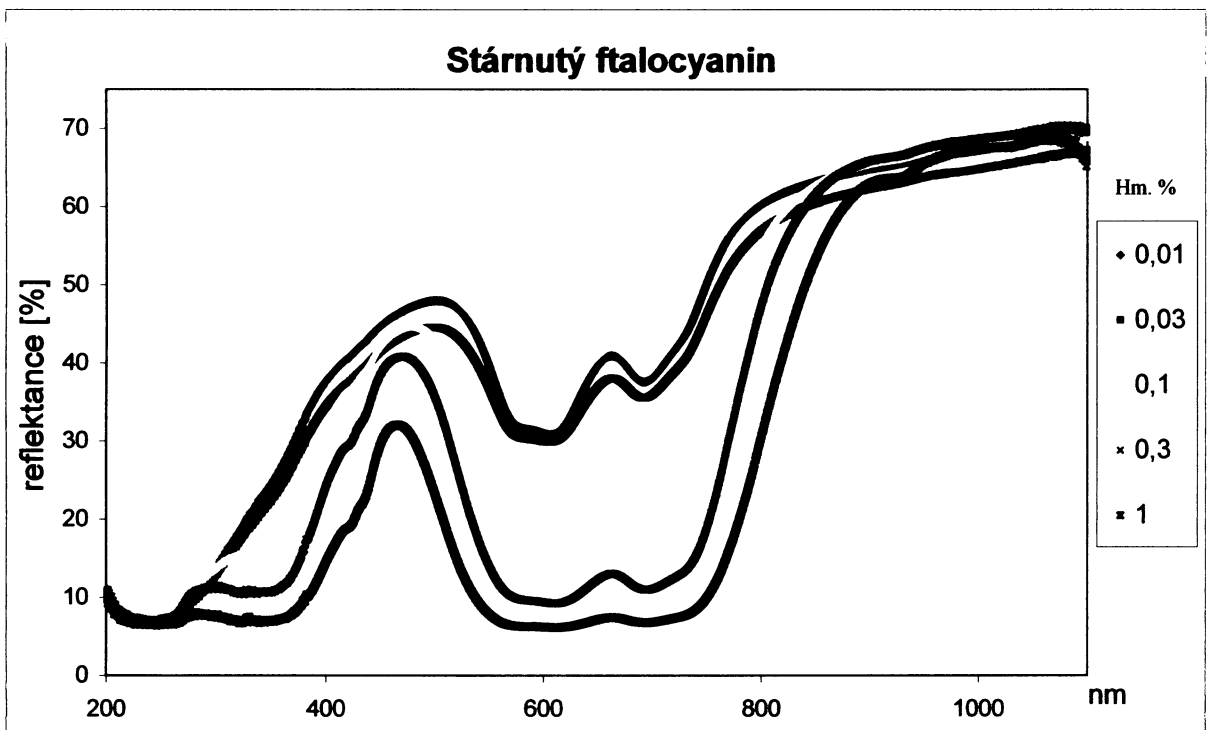
Stárnutím vzorků došlo ve všech případech k vyblednutí modře, největší změny jsou patrné u nejnižších koncentrací 0,1, 0,3 a 1 hm. % (obr. 14 a 15). Ve spektru vzorku o koncentraci 0,1 % hm. barviva není vidět téměř ani náznak modré barvy. Podobná situace nastala i u vzorku s koncentrací 0,3 hm. % pruské modři.

4.2.3 Indigo

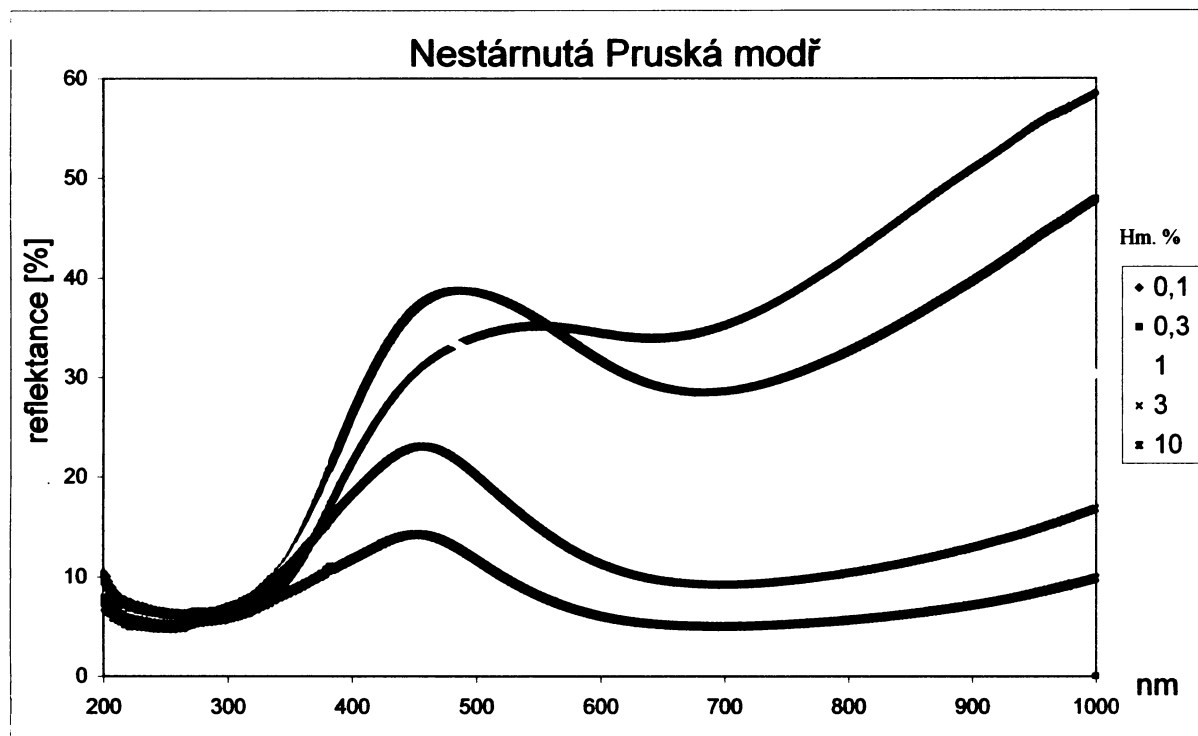
Ze všech tří studovaných modří jsou změny vyvolané umělým stárnutím nejpatrnější u přírodního indiga (viz obr. 16 a 17). U nejnižších koncentrací 0,01 a 0,03 hm. % barviva ve stárnutém vzorku došlo k téměř úplnému vyblednutí barviva. V jejich spektrech na obr. 17 není ani náznak přítomnosti modré barvy – žádný pokles reflektance v oblasti 600-700 nm.



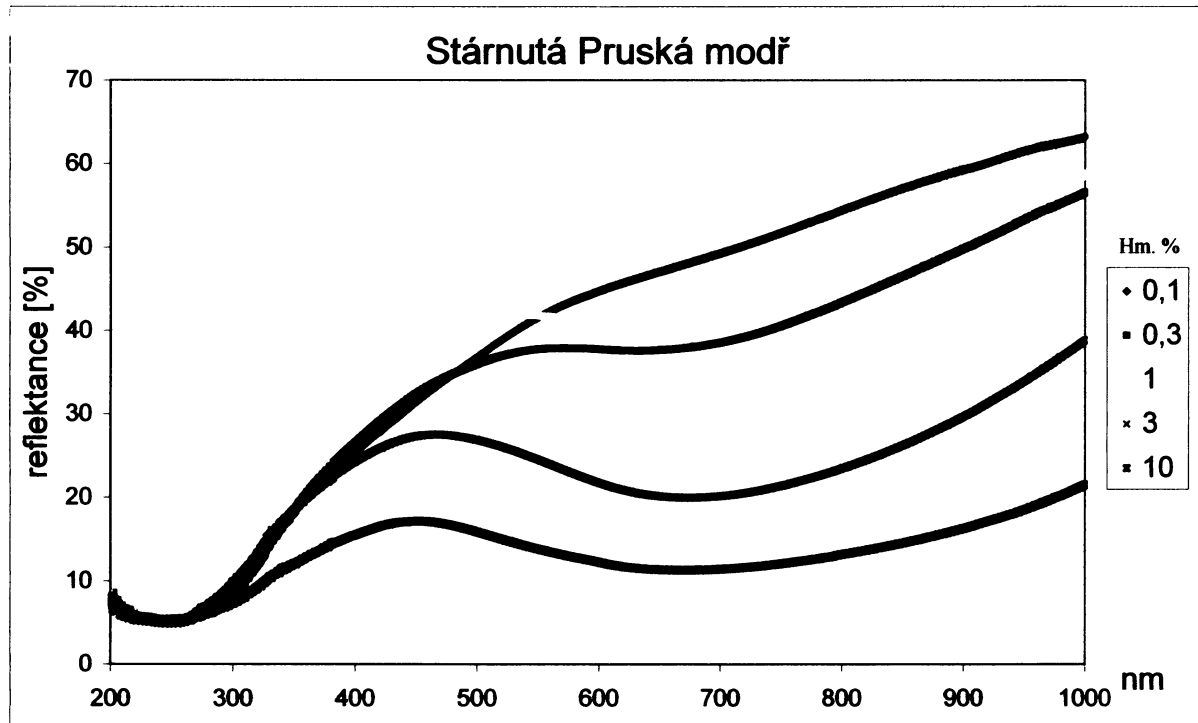
Obrázek 12. UV-Vis spektrum nestárnuté barevné vrstvy ftalocyaninu měďnatého s olejovým pojivem.



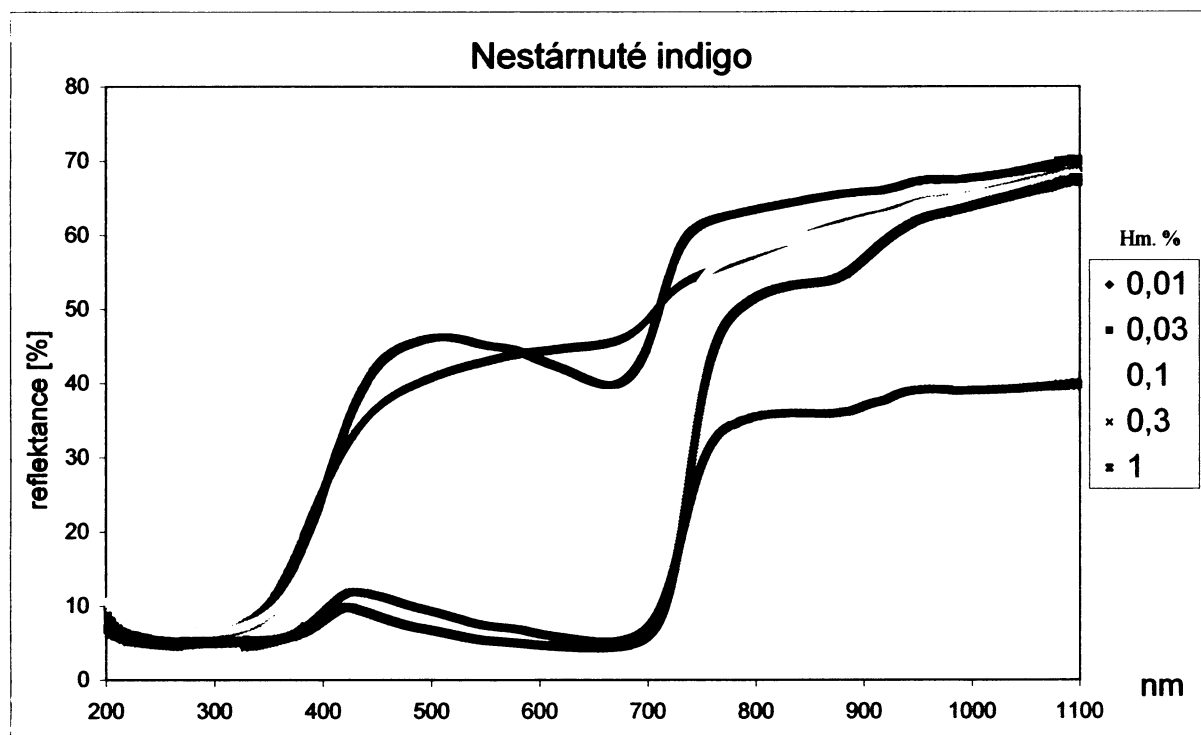
Obrázek 13. UV-Vis spektrum uměle stárnuté barevné vrstvy ftalocyaninu měďnatého s olejovým pojivem.



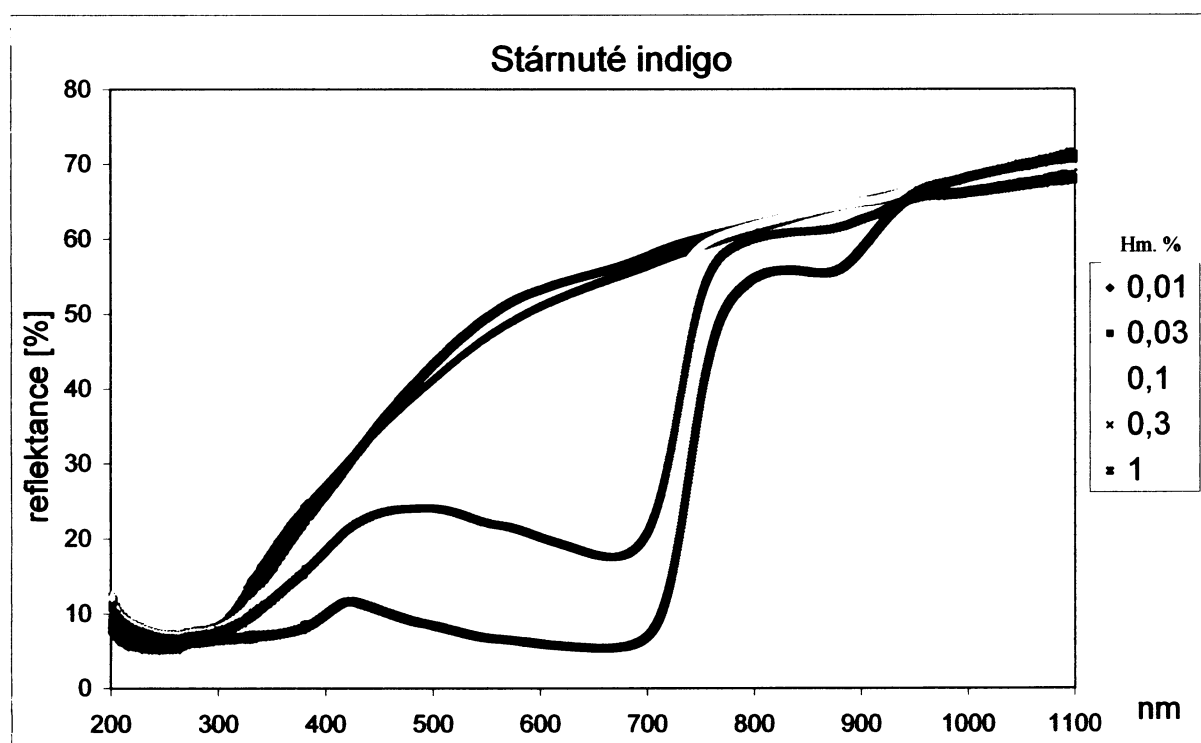
Obrázek 14. UV-Vis spektrum nestárnuté barevné vrstvy pruské modře s olejovým pojivem.



Obrázek 15. UV-Vis spektrum uměle stárnuté barevné vrstvy pruské modře s olejovým pojivem.



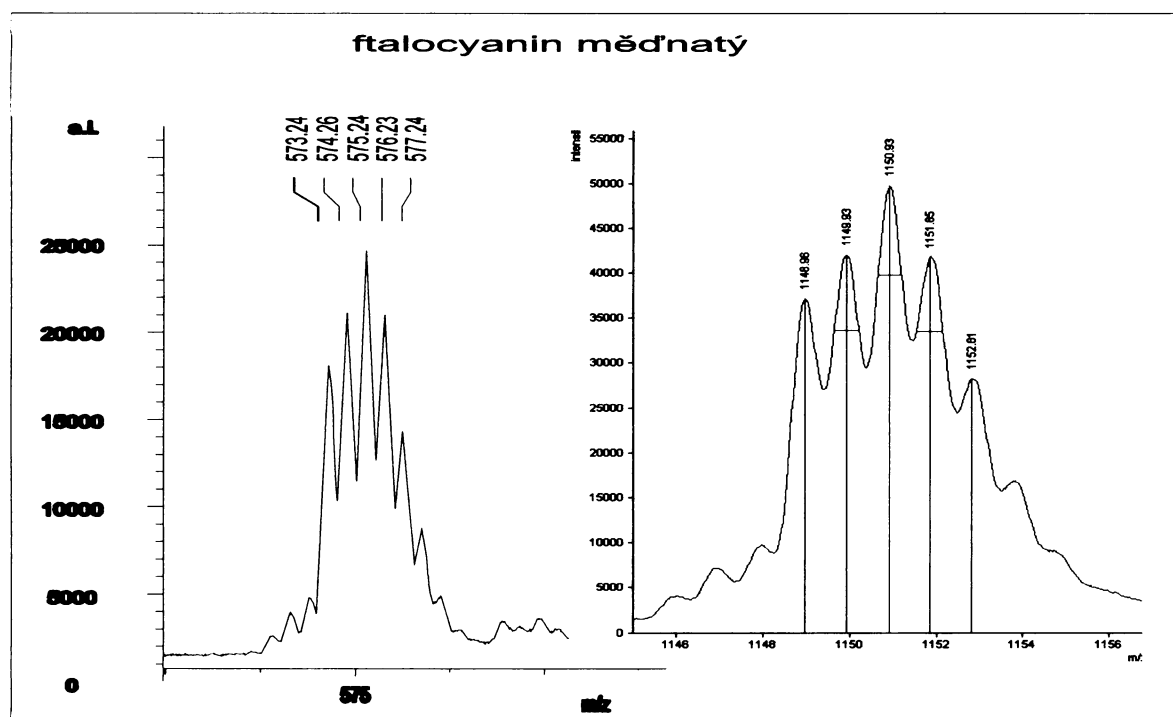
Obrázek 16. UV-Vis spektrum nestárnuté barevné vrstvy indiga s olejovým pojivem.



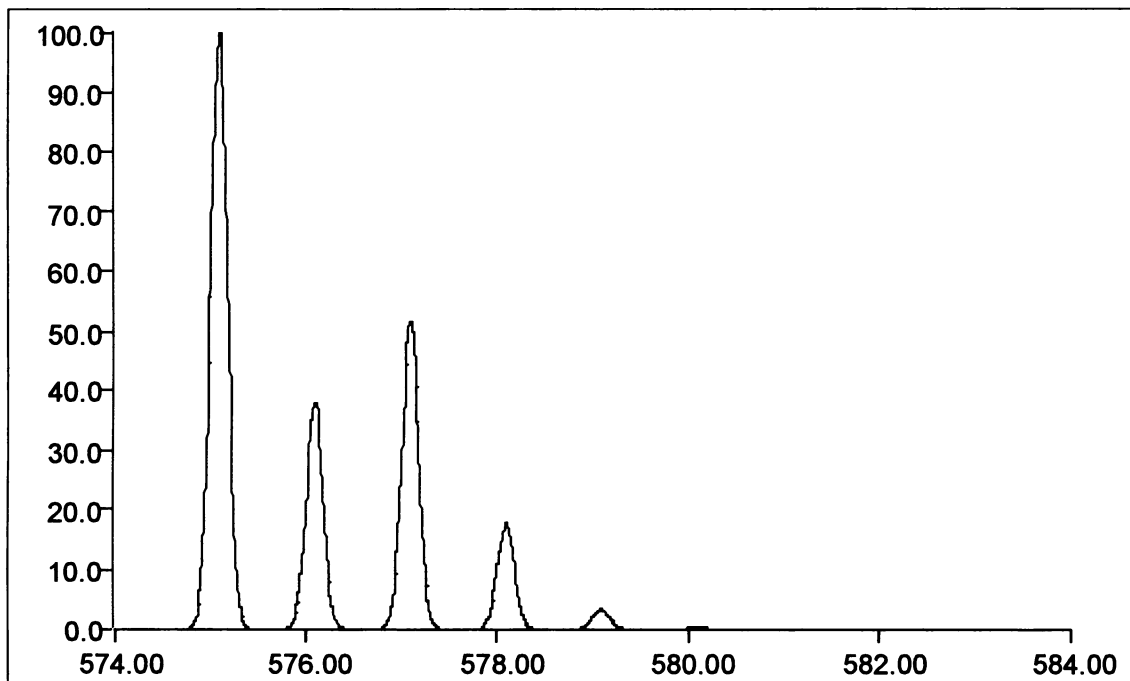
Obrázek 17. UV-Vis spektrum uměle stárnuté barevné vrstvy indiga s olejovým pojivem.

4.3 Identifikace modrých barviv pomocí MALDI-TOF MS

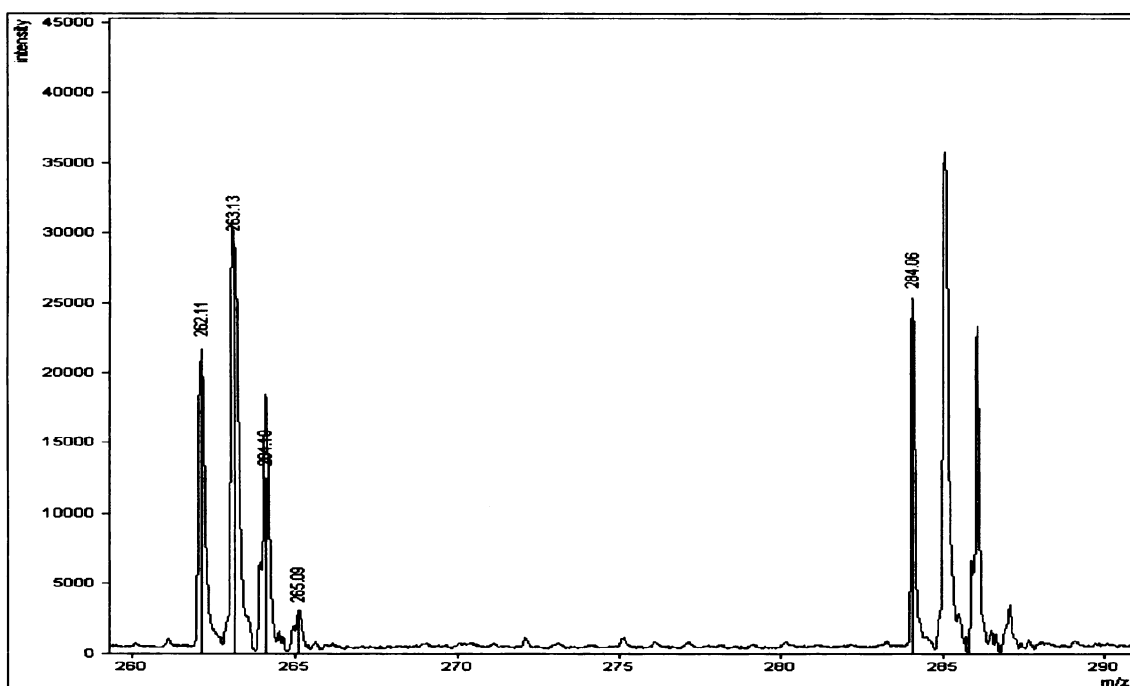
Studované modře – ftalocyanin měďnatý, indigo a pruská modř – byly analysovány hmotnostní spektrometrií na principu MALDI-TOF. S výjimkou pruské modře barviva poskytla kvalitní hmotnostní spektra s identifikačními píky. Pro ftalocyanin měďnatý jsou monoisotopické píky monomeru 575 *m/z*, dimeru 1150 *m/z* a v některých případech se dokonce objevuje i pík trimeru 1725 *m/z* (obr. 18). Klastř píků u ftalocyaninu měďnatého lze vysvětlit isotopovou distribucí, která byla matematicky vypočítána a její výsledek je na obrázku 19. Indigo se vyskytuje pouze v monomerní formě s píkem u 262 *m/z* a se svým sodíkovým aduktem při 284 *m/z* (obr. 20) [46]. Vypočtená isotopová distribuce v molekule indiga je zobrazena na obrázku 21. K pruské modři nebylo možné v jejím hmotnostním spektru přiřadit žádný charakteristický pík. Pruská modř může být komplexní sloučeninou hydrátu hexakynoželeznatanu draselno-železitého $KFe[Fe(CN)_6] \cdot xH_2O$ nebo se také uvádí $Fe_4[Fe(CN)_6]_3 \cdot 14-16H_2O$. Koordinační komplex $[Fe(CN)_6]^{4-}$ byl patrně zásahem laserového svazku rozbit, a proto se ve spektru neobjevil pík 212 *m/z*.



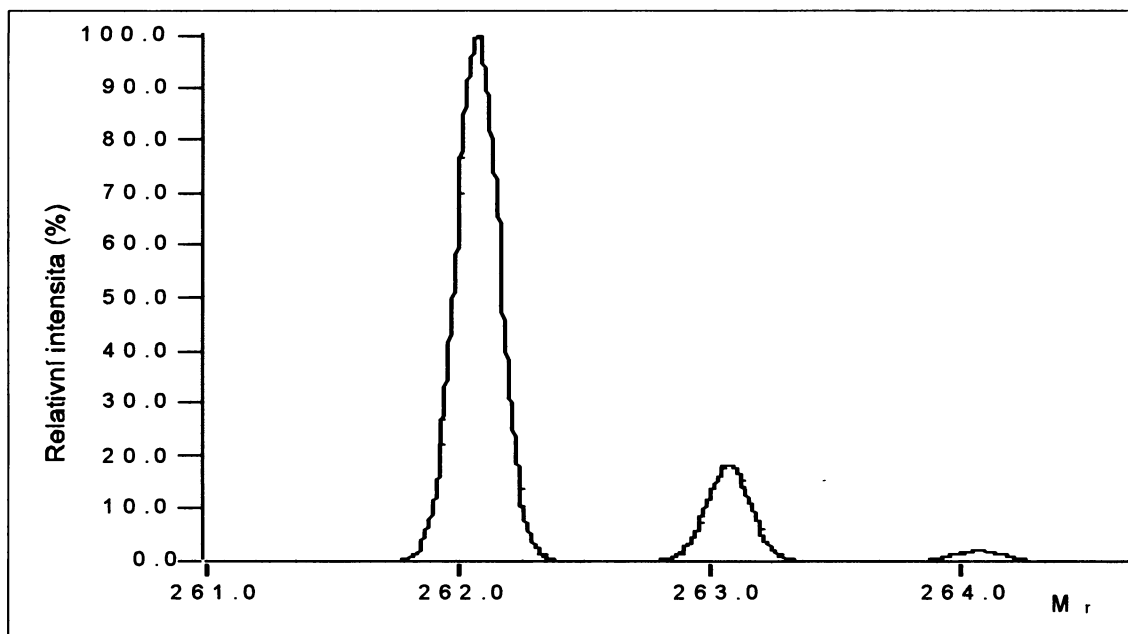
Obrázek 18. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF čistého ftalocyaninu měďnatého. Označené píky odpovídají isotopové distribuci v monomeru (vlevo) a dimeru (vpravo).



Obrázek 19. Vypočtená distribuce hmotnosti molekul ftalocyaninu měďnatého podle zastoupení jednotlivých izotopů.



Obrázek 20. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF samotného indiga.

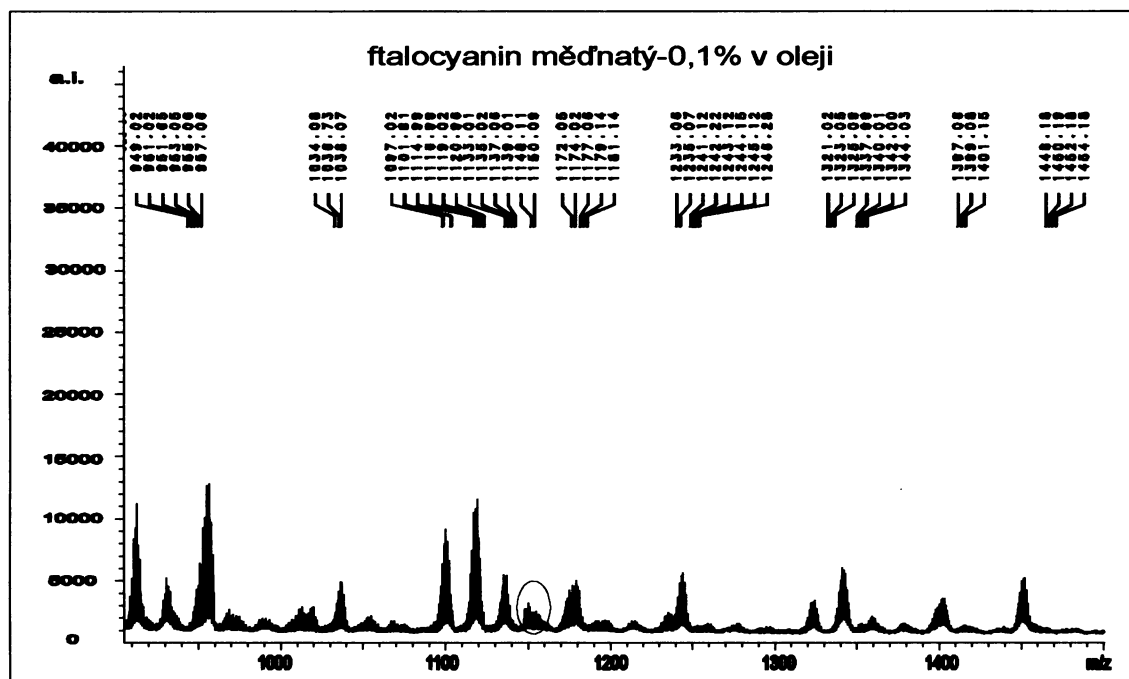


Obrázek 21. Vypočtená distribuce hmotnosti molekul indiga podle zastoupení jednotlivých isotopů.

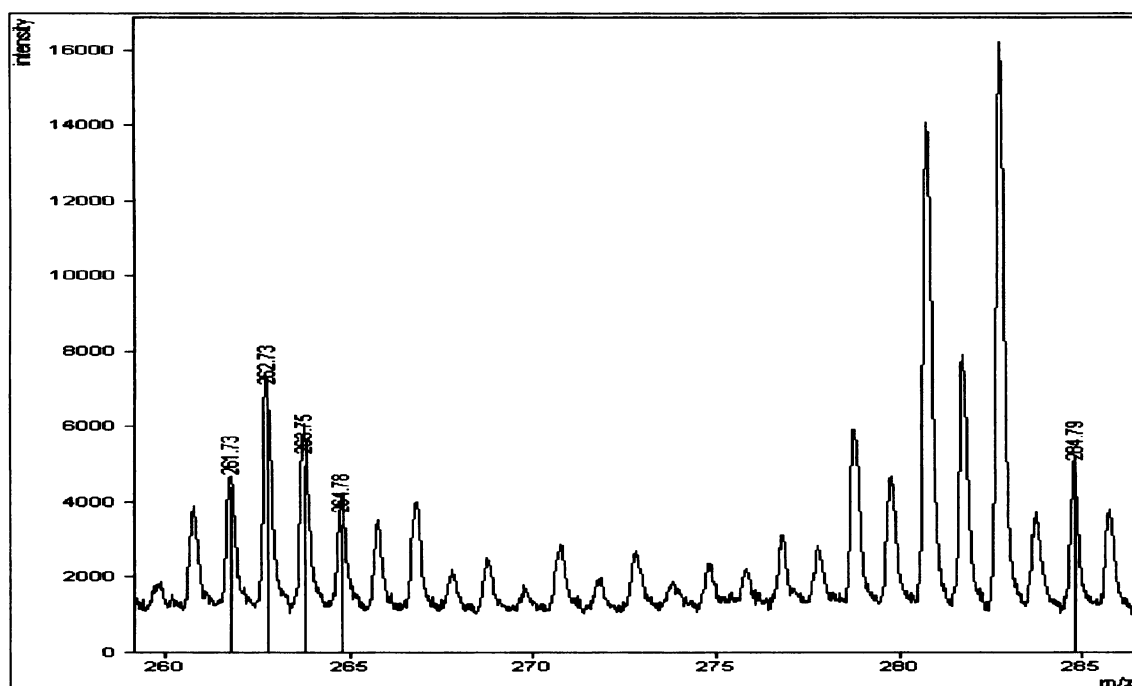
4.3.1 Nestárnuté vzorky

Po změření samotných barviv následovala analýza jejich suchých směsí s uhličitanem vápenatým a olovnatou bělobou ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$). Obě modře byly detekovány i ve směsích s nejnižším obsahem barviva, tj. při 0,01 hm. % (viz kap. 2.2). Přidaná matrice 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, která měla napomoci ionisaci molekul barviva a tím i zlepšení detekce, neměla na detekci barviv vliv, a protože spektra spíše komplikovala, nebyla později k dalším vzorkům přidávána.

Dále byly analysovány nestárnuté barevné vrstvy ftalocyaninu měďnatého a indiga, které byly připraveny smícháním jejich suchých směsí se lněným olejem. Mikrovzorky byly seškrábnuty z povrchu barevných vrstev a na vzorkovací destičku byly naneseny spolu s roztokem 30% acetonitrilu s 0,2% trifluoroctovou kyselinou. Pík odpovídající monomeru ftalocyaninu měďnatého se podařilo identifikovat při koncentraci 0,03 %, dimer byl nalezen až při koncentraci 0,1 % (obr. 22). Indigo bylo nalezeno dokonce při koncentraci 0,01 % barviva v suché směsi (obr. 23).



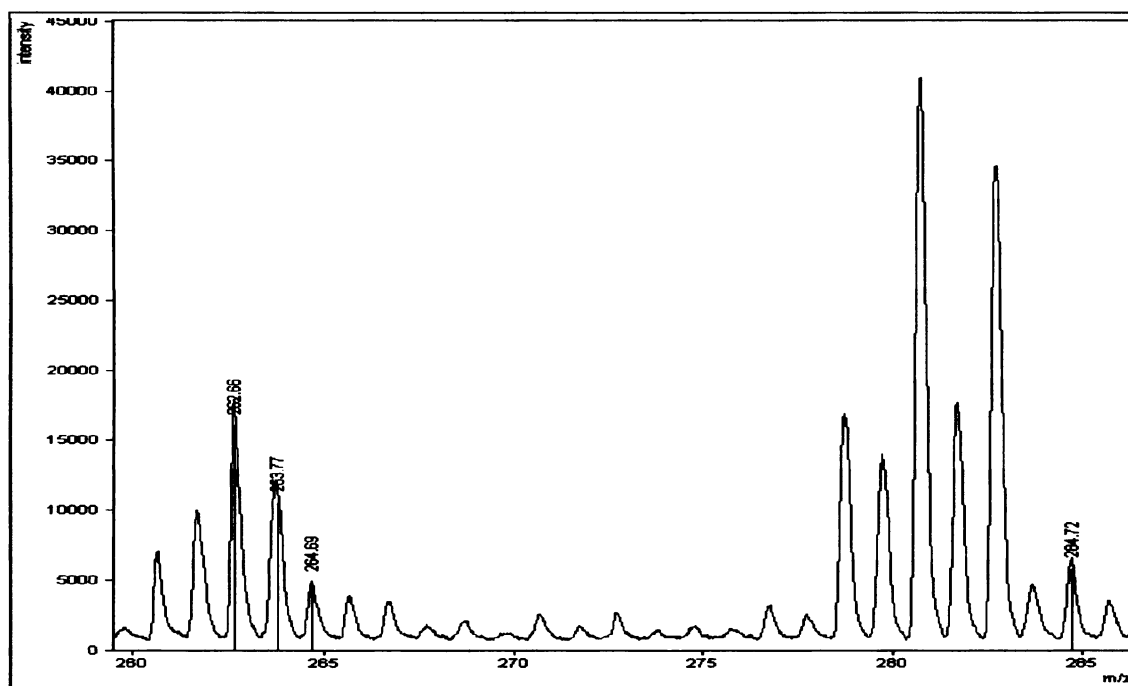
Obrázek 22. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF ftalocyaninu měďnatého o koncentraci 0,1 hm. % v olejovém pojivu. Dimer ftalocyaninu je modře zakroužkován.



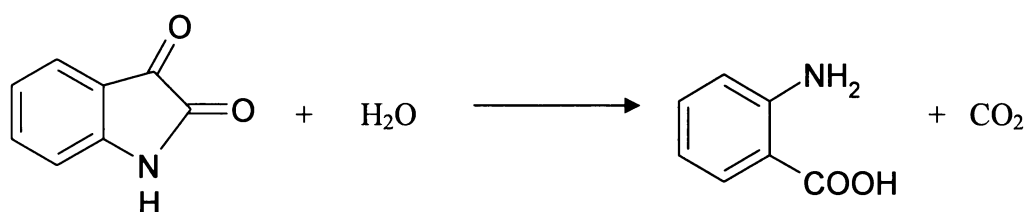
Obrázek 23. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF nestárnutého vzorku barevné vrstvy obsahující 0,01 hm. % indiga.

4.3.2 Stárnuté vzorky

Stejným způsobem byly připraveny k měření i vzorky uměle stárnutých barevných vrstev ftalocyaninu měďnatého a indiga. Ačkoliv nejméně koncentrované vzorky indiga byly zabarvené pouze dožluta zpolymerovaným lněným olejem a viditelnou spektrofotometrií ani lidským okem nebylo možné zachytit náznak modré barvy, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF dokázala i v takových vzorcích detekovat příslušné barvivo. Ftalocyanin měďnatý a indigo (obr. 24) se podařilo detekovat ve stárnutých vzorcích barevných vrstev dokonce při koncentraci barviva 0,01 %. Ve hmotnostním spektru stárnutého indiga se podařilo nalézt pouze velmi malé množství molekulových iontů isatinu $147\ m/z$ a téměř žádné molekulové ionty anhydridu kyseliny isatoikové $163\ m/z$, které jsou podle publikace [45] degradačními produkty indiga. Zato u stárnutých vzorků se výrazně zvýšil pík při $137\ m/z$, což by podle obrázku 25, převzatého z publikace autorů Muraganandam a Buttacharya [47], měl být molekulový iont kyseliny anthranilové.

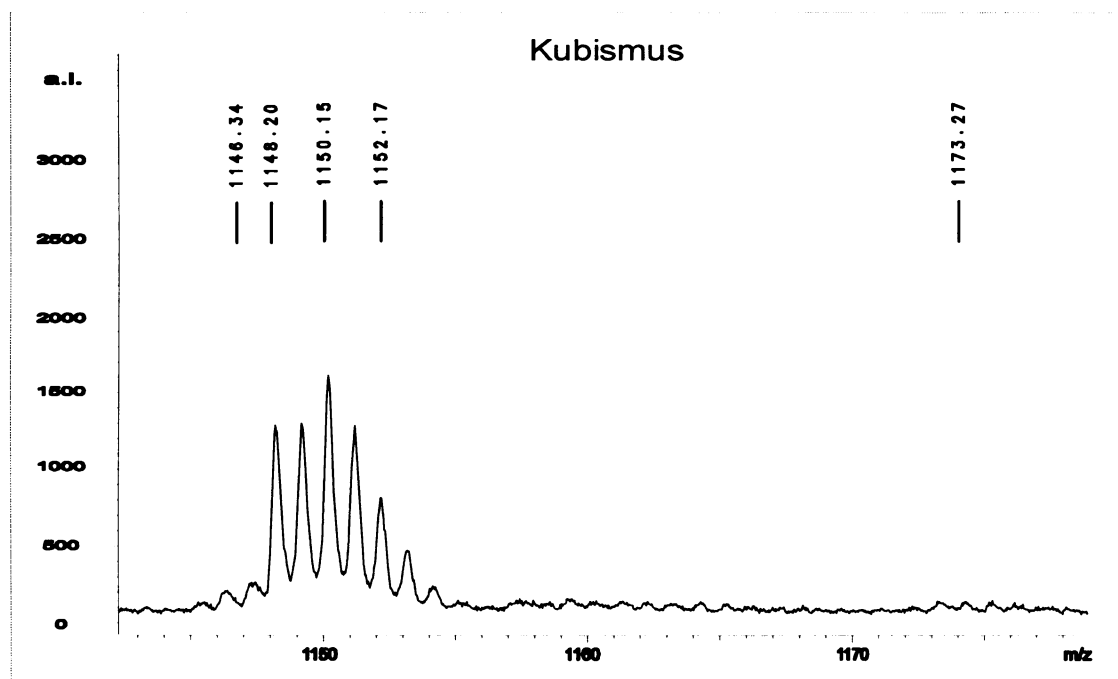


Obrázek 24. MALDI-TOF hmotnostní spektrum stárnutého vzorku barevné vrstvy obsahující 0,01 hm. % indiga.



Obrázek 25. Schéma vzniku kyseliny anthranilové z isatinu ve stárnutých vzorcích.

Vypracovaná metoda identifikace modrých barviv byla aplikována na reálný vzorek pojmenovaný Kubismus, který obsahoval velmi malý fragment modré barevné vrstvy. Pro úspěšnou identifikaci ftalocyaninu měďnatého v reálném vzorku bylo zapotřebí odhadem méně než 1 μg (Obrazová příloha obr. IV). Ve vzorku se podařilo bezpečně prokázat ftalocyanin měďnatý (obr. 26).

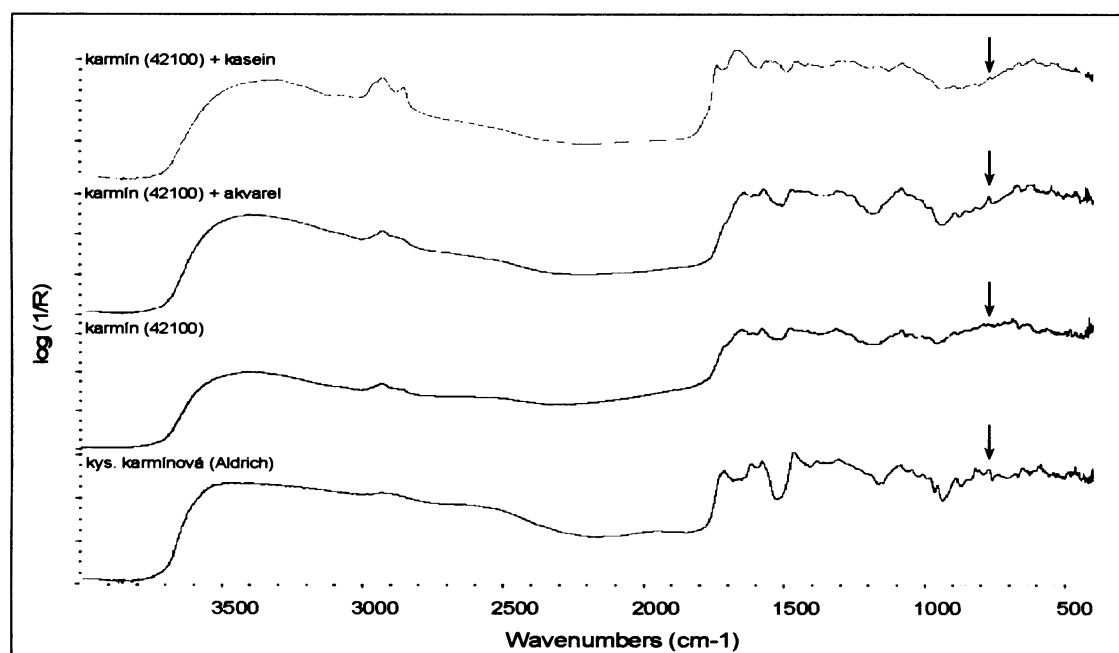


Obrázek 26. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF reálného vzorku Kubismus s dobře odlišeným signálem dimeru ftalocyanin měďnatý.

4.4 Identifikace přírodních červených barviv a pigmentů

4.4.1 Identifikace červených barviv a pigmentů infračervenou spektroskopií

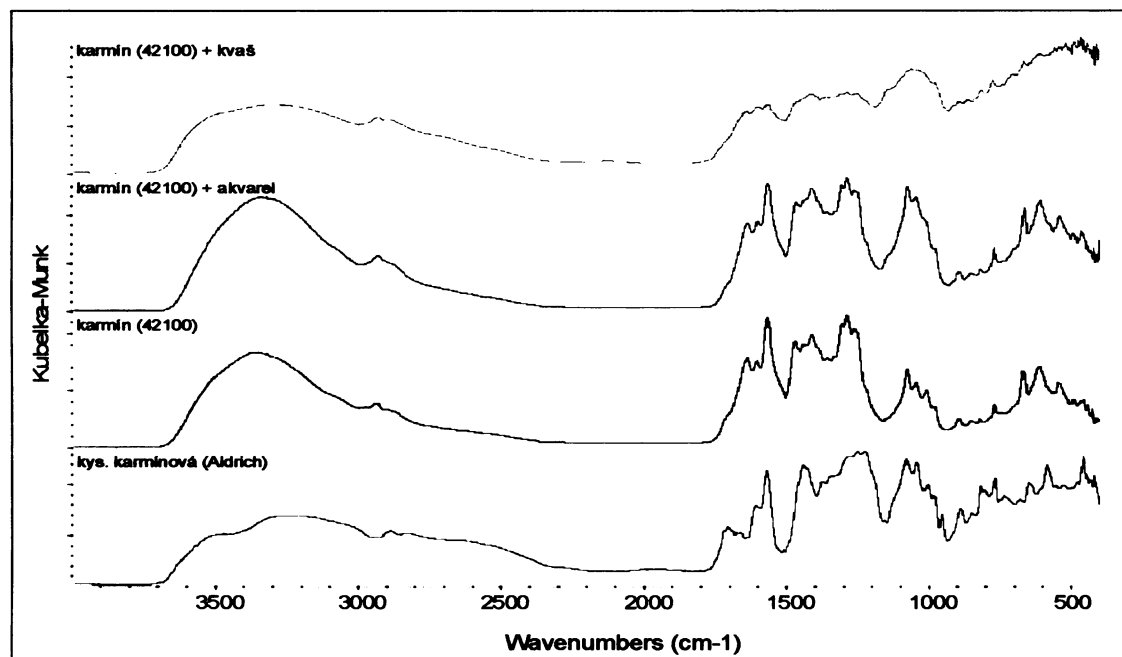
Přírodní červená barviva a pigmenty byly analysovány nejprve infračervenou spektroskopií. Ukázalo se, že infračervená spektroskopie není pro identifikaci červení vhodná, protože je touto metodou velmi obtížné rozlišit i jen samotná jednotlivá antrachinonová barviva kvůli jejich podobnému základnímu skeletu (kap. 1.2). Navíc jsou pásy minoritně zastoupených barvicích látek překryty intenzivními pásy anorganických látek, na které jsou barviva vysrážena nebo jsou s nimi smíchána jako plniva. Problematika identifikace organických červených barviv pomocí FTIR je podrobně řešena v mé diplomové práci [48].



Obrázek 27. Infračervená spektra získaná metodou ODRAZ karmínových látek. Ve spektrech šipkou je označen jediný společný pík u 772 cm⁻¹.

Na obrázku 27 jsou uvedena infračervená spektra získaná metodou ODRAZ kyseliny karmínové a materiálů, ve kterých je obsažena. Obsah kyseliny karmínové lze ve všech spektrech potvrdit pouze podle jednoho málo intenzivního pásu při 772 cm⁻¹. Ve spektrech

získaných metodou DRIFTS však nebylo možné nalézt ani jeden její pás (obr. 28). Na základě jediného průkazného pásu v odrazových spektrech nelze karmín ve směsích s pojivky spolehlivě identifikovat. Vybraný pás lze proto použít pouze jako doplňující nástroj v kombinaci s dalšími analytickými metodami [42].



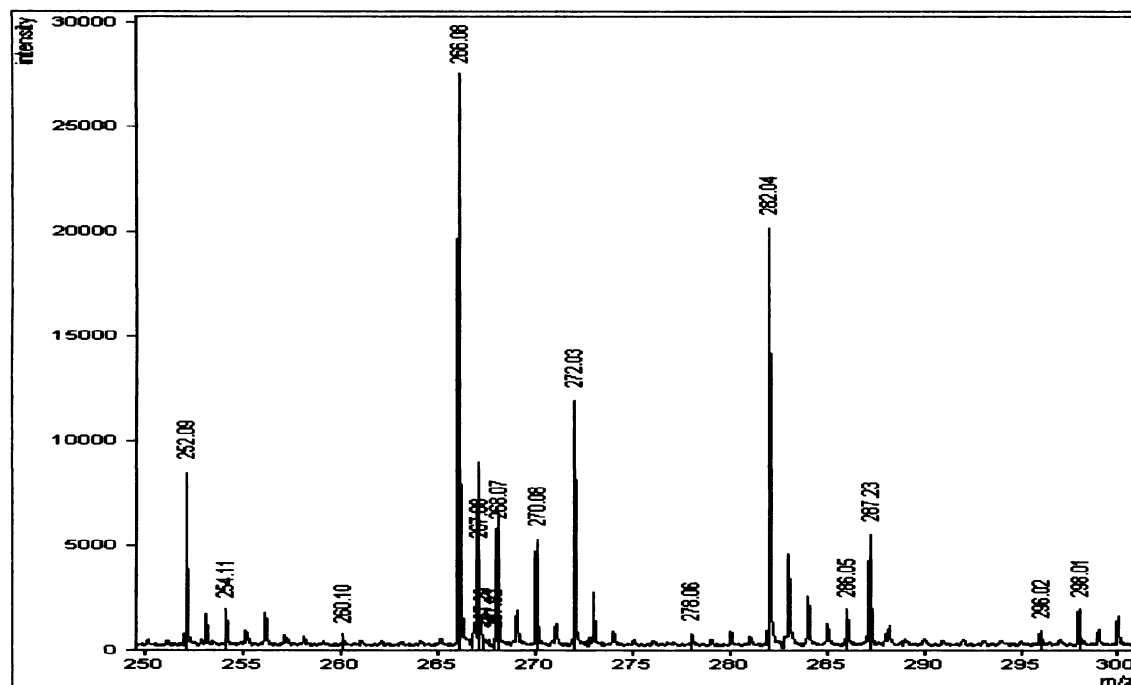
Obrázek 28. Infračervená spektra získaná metodou DRIFTS karmínových látek. Ve spektrech nebyl nalezen jediný společný pík.

4.4.2 Identifikace červených barviv a pigmentů pomocí MALDI-TOF MS

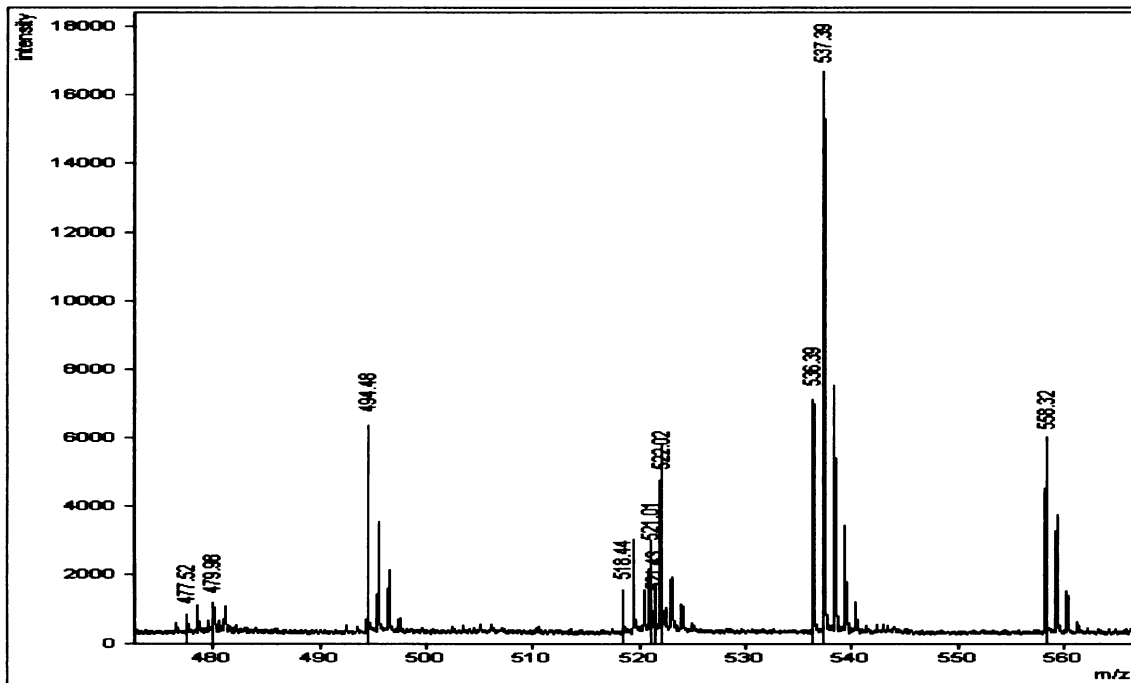
Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF byla v této práci poprvé použita k identifikaci červených organických barviv a pigmentů přírodního původu: dračí krve, karmínu, košenily, kraplaku, lakaové červeně a rotholzextraktu. Z uvedených barviv a pigmentů se i bez předešlého enzymového štěpení barviv podařilo nalézt molekulový iont barvicí látky u dračí krve, karmínu, košenily a lakaové červeně (obr. 29 a 30). Neúspěch v případě rotholzextraktu je pravděpodobně způsoben silnou adsorpcí barviva na anorganický substrát. U karmínu je barvicí látka nejspíše v nadbytku, proto se barvivo dostalo do roztoku a

mohl tak být ve spektru identifikován její molekulový iont. Kraplak byl enzymově štěpen v podobě usušených rostlinných částí, pravděpodobně proto se do roztoku neuvolnila žádná barvicí látka; např. alizarin a purpurin. Bohatou směs peptidů pocházejících z doprovodných proteinů, která vznikla po enzymovém rozkladu, se podařilo změřit jen u košenily a karmínu – pigmentů živočišného původu.

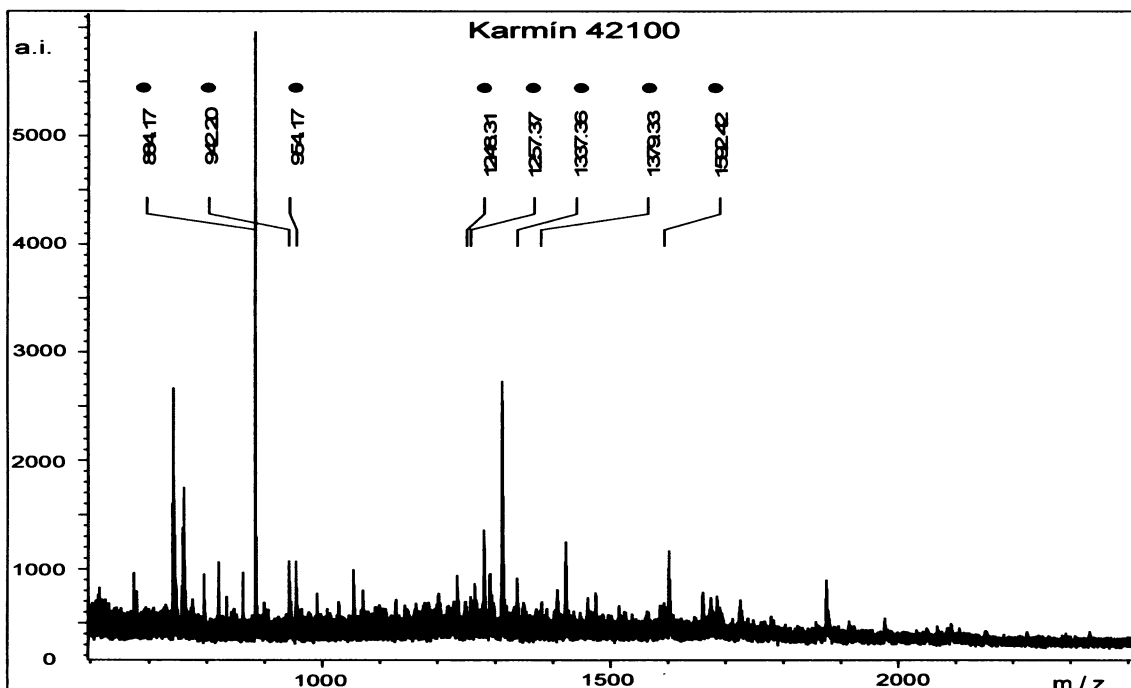
Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byla použita pro identifikaci červeného antrachinonového barviva – košenilového karmínu, který je tradičně vyráběn z hmyzu. Identifikace barviva je založena na porovnání peptidových štěpů vzniklých trypsinovým štěpením proteinů asociovaných s barvivem obsaženým v usušených tělech hmyzu *Coccus cacti*, které doprovází barvivo s peptidovými fragmenty komerčně dodávaného barviva – karmínu (obr. 31). Košenilový karmín byl posléze zjištěn v barevné vrstvě reálného vzorku (obr. 32) odebraného z opony Karlínského divadla postiženého povodní v roce 2002. Hmotnostní spektra jsou spolehlivějším důkazem než pouhá přítomnost proteinů asociovaných k barvivu, jak je popsáno v článku [34]. Tento výsledek je také mnohem cennější než identifikace červení díky podobnosti UV-Vis spekter 9,10-antrachinonových barviv, která se ovšem liší na základě původu barviva.



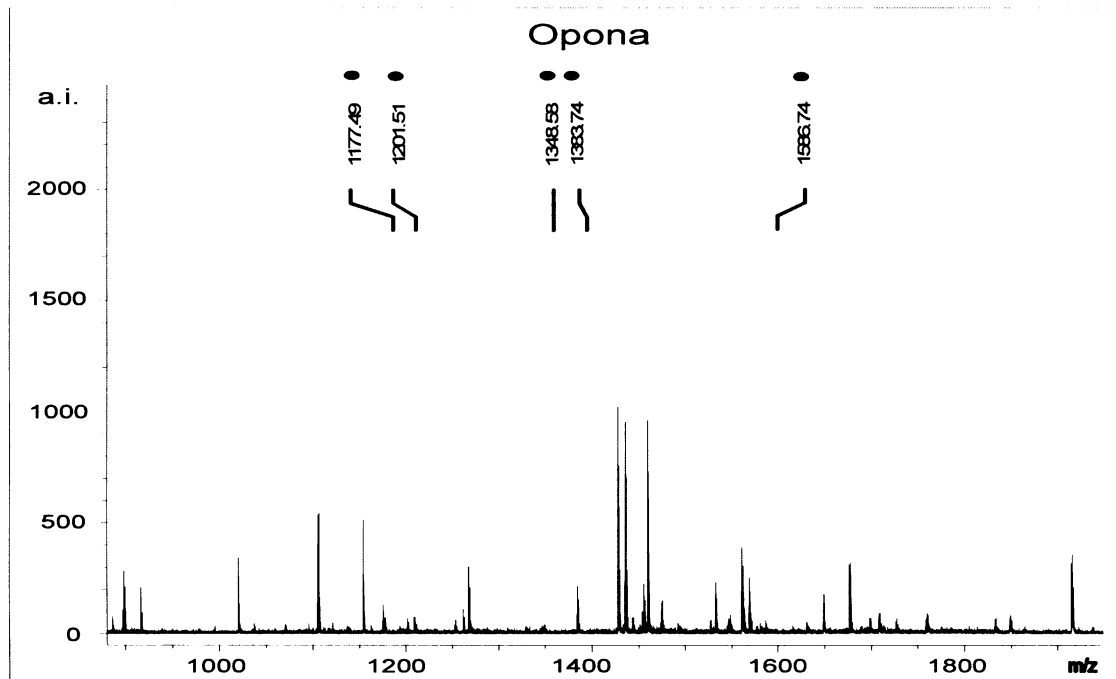
Obrázek 29. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF dračí krve s molekulovým iontem dracorhodinu (m/z 266) o vzorci $C_{17}H_{14}O_3$.



Obrázek 30. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF lakaové červeně s molekulovým iontem kyseliny lakaové formy A (m/z 537) o vzorci $C_{26}H_{19}NO_{12}$.



Obrázek 31. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF trypsinového štěpení komerčně dodávaného karmínu 42100. Označené hmotnosti odpovídají proteinovým štěpům z *Coccus cacti*.



Obrázek 32. Hmotnostní spektrum MALDI-TOF trypsinového štěpení Karlínské opony. Označené hmotnosti odpovídají proteinovým štěpům z *Coccus cacti*.

5. Závěr

Jedním z cílů této práce bylo pomocí FTIR a hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF zjistit nejnižší koncentrace neminerálních modrých barviv jak v čerstvých, tak i v uměle stárnutých vzorcích, při kterých by byla detekce indiga, pruské modře a ftalocyaninu měďnatého v odlišně připravených vzorcích ještě spolehlivá. Identifikace neminerálních modrých pigmentů je jinými analytickými metodami téměř neuskutečnitelná, ačkoliv jejich detekce je restaurátory velmi žádaná. Vybraná modrá barviva totiž umožňují alespoň přibližnou dataci uměleckých děl, a tím mohou napomoci i k ověření jejich pravosti.

FTIR je vhodná pro identifikaci tří běžně používaných neminerálních pigmentů: indiga, pruské modře a měďnatého ftalocyaninu, které jsou velmi důležité pro možnost datování uměleckých děl. Problémy s deformacemi infračervených spekter derivačními pásy je možné vyřešit přípravou mikrotomových řezů. Mikrotomové řezy jsou sice nejvhodnější pro měření transmisí technikou, ale v našem případě se více osvědčilo reflexně absorpční měření. V případě modelových vzorků lze mikrotomové řezy získat poměrně snadno, ale u reálných vzorků je většinou není možné získat, protože bývají často velmi nehomogenní a tudíž i křehké. Protože by se během pokusů o přípravu kvalitního mikrotomového řezu spotřebovala značná část vzácného reálného vzorku, který je ale nutné archivovat, a navíc by se po každém odkrojení řezu musela znovu dělat podrobná stratigrafie barevných vrstev, nedoporučujeme řešit kvalitu infračervených spekter touto komplikovanou úpravou vzorku. Nejjednodušším řešením této svízelné situace je proto odrazové měření povrchu neupravených vzorků. Dodatečné matematické zpracování naměřených spekter – Kramersovou-Kronigovou transformací – pro snadnější identifikaci použitých malířských materiálů však není vhodné, protože odrazová spektra jsou směsí spekulární a difusní reflexe, které nelze od sebe jednoduše oddělit. Identifikaci je proto nejlépe provádět porovnáním odrazových spekter zkoumaných reálných vzorků s odrazovými spektry námi připravených modelových vzorků, ve kterých nastávají obdobné typy deformací.

Nejnižší možné koncentrace pevných vzorků modrých pigmentů, které bylo možné zjistit infračervenou spektroskopií u nestárnutých vzorků, jsou pro indigo 0,3-1 hm. %, ftalocyanin měďnatý 0,3-1 hm. % a pruskou modř 1-3 hm. %. U stárnutých vzorků se detekce posunula k vyšším hodnotám u indiga na 3-10 % hm. a u ftalocyaninu měďnatého na 3 hm. % barviv v suchých směsích. Barevné změny vyvolané umělým stárnutím byly sledovány

spektrofotometrií ve viditelném světle. Posun nejnižší koncentrace nutné ke spolehlivé identifikaci k vyšším hodnotám je u indiga možné vysvětlit rozkladem molekul, což by mohlo souviset i se změnou barevnosti během umělého stárnutí pozorované difusně reflexní spektrofotometrií, a u ftalocyaninu měďnatého nejspíše sedimentací jeho molekul do větších hloubek barevné vrstvy. Ačkoliv vzorky o nejnižších koncentracích pruské modře působením umělého stárnutí značně vybledly, oproti očekávání se snížila nejnižší koncentrace nutná pro spolehlivou identifikaci přibližně o jeden řád na 0,3-1 hm. %. Tento jev lze vysvětlit pravděpodobným rozpadem komplexu $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot 14-16\text{H}_2\text{O}$ či $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ se zachováním skupiny $-\text{CN}$, kterou ve spektru detekujeme a kterou považujeme za důkaz přítomnosti pruské modře (jiné látky používané v uměleckých dílech tuto skupinu neobsahují). Zlepšení detekce lze přičíst velmi tenké nanesené barevné vrstvě a rovněž úbytku olejového pojiva, které se vsáklo do podkladové vrstvy. Poznatky získané na modelových vzorcích byly aplikovány na reálné vzorky. Pruskou modř se podařilo úspěšně detekovat v přemalbě deskového obrazu datovaného do roku 1500 a ftalocyanin měďnatý v moderním obrazu, který byl původně datován do období před komerčním rozšířením tohoto barviva, tj. před roky 1935-1938.

Výsledky získané infračervenou spektroskopií byly výrazně překonány hmotnostní spektrometrií na principu MALDI-TOF. U nestárnutých modelových vzorků neminerálních modrých barviv, byť pouze u ftalocyaninu měďnatého a indiga, se podařilo snížit nejnižší koncentraci nutnou pro jejich spolehlivou identifikaci na setiny hmotnostních procent barviva ve vzorku. U stárnutých vzorků se obě barviva podařilo identifikovat již při 0,01 hm. %. Bohužel se porovnáním spekter stárnutých a nestárnutých vzorků indiga nepodařilo nalézt žádný hmotnostní pík, který by indikoval rozpad molekuly indiga. U modelových vzorků pruské modře se pravděpodobně zásahem laseru rozbil její koordinační komplex, a tak pro pruskou modř nebylo možné nalézt ve spektru žádný identifikační pík. U reálných vzorků se podařilo jednoznačně identifikovat ftalocyanin měďnatý ve vzorku o hmotnosti menší než 1 μg , který již byl ve větším množství zkoumán infračervenou spektroskopií. Potvrdilo se tak, že analysovaný obraz nevznikl v době, do které byl původně datován.

V případě hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF bylo také cílem ukázat možnosti této metody při identifikaci přírodních červených organických barviv a pigmentů. Pomocí MALDI-TOF MS je možné některá barviva identifikovat podle jejich doprovodných proteinů pomocí enzymového štěpení, ale častěji lze barviva či pigmenty identifikovat podle

molekulového iontu jejich barvicí látky, a to dokonce bez jakékoliv předchozí úpravy vzorku. Doprovodné proteiny sice vypovídají o přímém původu barviva a hmotnostní spektrometrie je vůči nim velmi citlivá, ale protože jsou detekovatelné pouze u barviv a pigmentů živočišného původu, nehodí se pro identifikaci všech druhů přírodních červení. Peptidové štěpy vzniklé enzymovým rozkladem lze snáze získat z živočišných materiálů než z rostlinných. Proto by bylo pravděpodobně vhodné před samotným tryptickým štěpením upravit rostlinné materiály jinými enzymy, např. amylasami, aby se mohly jejich proteiny obsažené v tkáních uvolnit do roztoku. V případě enzymového rozkladu, ačkoliv pro identifikaci červených barviv a pigmentů není nutný, lze současně identifikovat barvivo a určit proteinová pojiva, která mohou být rovněž obsažená v analysované barevné vrstvě.

Výsledky této části disertační práce ukazují, že pro spolehlivou identifikaci neminerálních modrých pigmentů je vhodné kombinovat infračervenou spektroskopii a hmotnostní spektrometrii na principu MALDI-TOF. Infračervená spektroskopie má sice vyšší nejnížší koncentrace nutné pro spolehlivou identifikaci neminerálních modří, avšak dokáže všechny studované modře identifikovat. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF je mnohem citlivější než infračervená spektroskopie, ale zatím se jí nepodařilo identifikovat pruskou modř.

Námi vyvinutou metodu identifikace organických modrých a červených barviv a pigmentů pomocí MALDI-TOF MS lze v budoucnu aplikovat i na jiná přírodní barviva a pigmenty, například organické žlutě. Velmi zajímavé výsledky by rovněž mohlo přinést srovnání všech přírodních organických barviv a pigmentů, používaných v uměleckých dílech, z hlediska nejnížší koncentrace nutné pro jejich spolehlivou identifikaci touto metodou.

6. Literatura

1. Ortega-Avilés M., Vandenabeele P., Tenorio D., Murillo G., Jimenéz-Reyes M., Gutiérrez N.: *Spectrochim. Acta A* 550: 164-172 (2005).
2. Melessanaki K., Papadakis V., Balas C., Anglos D.: *Spectrochim. Acta B* 56: 2337-2346 (2001).
3. Burgio L., Clark R.J.H., Theodoraki K.: *Spectrochim. Acta A* 59: 2371-2389 (2003).
4. Burgio L., Clark R.J.H.: *J. Raman Spectrosc.* 31: 395-401 (2000).
5. Vandenabeele P., Bodé S., Alonso A., Moens L.: *Spectrochim. Acta A* 61: 2349-2356 (2005).
6. Andreev G.N., Schrader B., Schulz H., Fuchs R., Popov S., Handjieva N.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 371: 1009-1017 (2001).
7. Castro K., Pérez-Alonso M., Rodríguez-Laso M.D., Madariaga J.M.: *Spectrochim. Acta A* 60: 2919-2924 (2004).
8. Drewlo S., Brämer Ch.O., Madkour M., Mayer F., Steinbüchel A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1964–1969 (2001).
9. Kopecká I.: *Přehled přírodních barviv, Státní restaurátorské ateliéry, Praha* (1990).
10. Šimůnková E., Karhan J.: *Pigmenty, barviva a metody jejich identifikace, VŠCHT Praha* (1998).
11. Ciliberto E., Spoto G.: *Modern Analytical Methods in Art and Archeology, vol. 155 Chemical Analysis, Catania* (2000).
12. Kharbade B.V., Agarwal O.P.: *Identification of Natural Dyestuffs in Old Textiles.* 68-73 (1982)
13. Lancaster F.E., Lawrence J.F.: *J. Chromatogr. A* 732: 394-398 (1996).
14. Carvalho P.R.N., Collins C.H.: *Chromatogr.* 45: 63-66 (1997).
15. Grygar T., Kuckova S., Hradil D., Hradilova J.: *J. Solid State Electrochem.* 7: 706-713 (2003).
16. Puchalska M., Orlinska M., Ackacha M.A., Połec-Pawlak K., Jarosz M.: *J. Mass Spectrom.* 38: 1252-1258 (2003).
17. Ackacha M.A., Połec-Pawlak K., Jarosz M.: *J. Sep. Sci.* 26: 1028-1034 (2003).
18. Beutel S., Klein K., Knobbe G., Königfeld P., Petersen K., Ulber R., Scheper T.: *Biotechnol. Bioeng.* 80: 13-21 (2002).

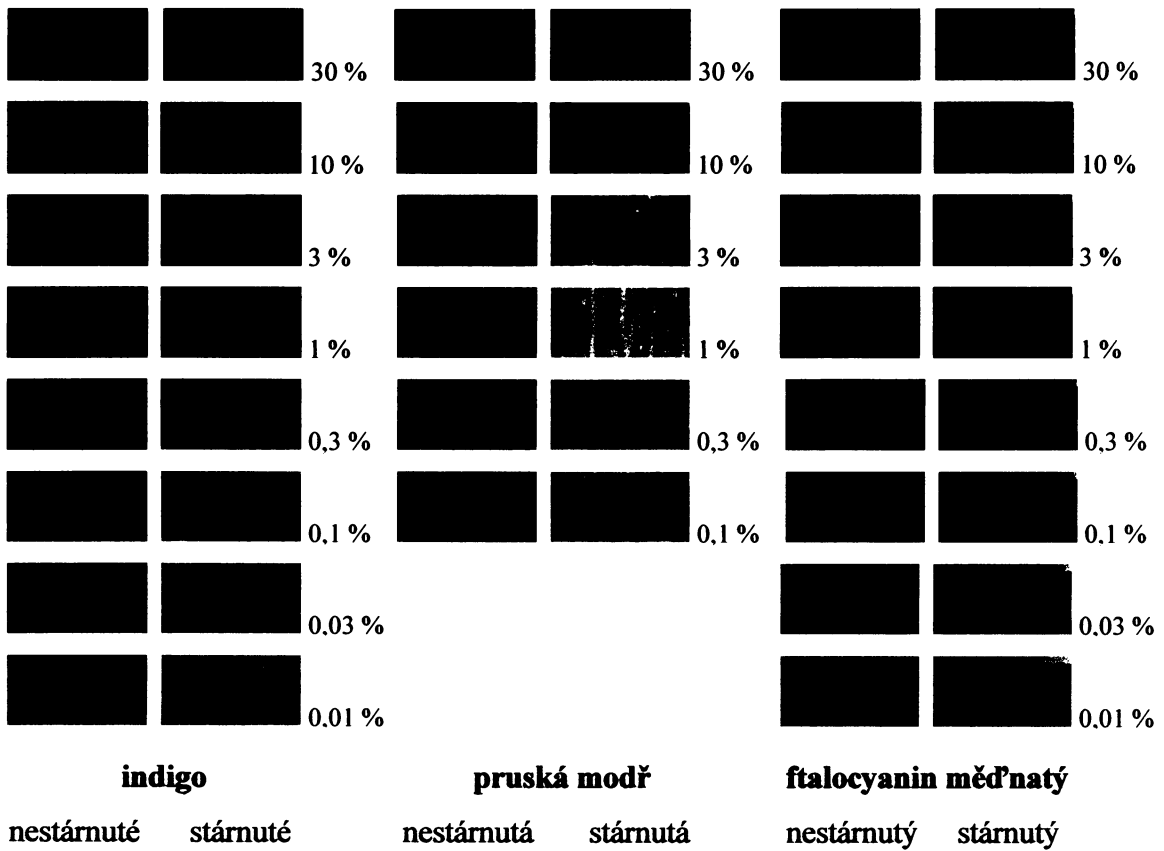
19. Hynek R., Kuckova S., Hradilova J., Kodicek M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 1896-1900 (2004).
20. Rai P.P., Shok M.: *Chromatogr.* 14: 599-600 (1981).
21. Djozan Dj., Assadi Y.: *Talanta* 42: 861-865 (1995).
22. Derksen G.C.H., Niederländer H.A.G., Teris A., van Beek T.A.: *J. Chromatogr. A* 978: 119-127 (2002).
23. Wouters J., Verhecken A.: *Belg. J. Zool.* 121: 211-225 (1991).
24. Wouters J., Verhecken A.: *Annl. Soc. ent. Fr.* 25: 393-410 (1989).
25. Wouters J., Verhecken A.: *Stud. Conserv.* 34: 189-200 (1989).
26. Wouters J.: *Stud. Conserv.* 30: 119-128 (1985).
27. Derksen G.C.H., van Beek T.A., Groot Æ., Capelle A.: *J. Chromatogr. A* 816: 277-281 (1998).
28. Weng W.Ch., Sheu S.J.: *J. High Resol. Chromatogr.* 23: 143-148 (2000).
29. Steinert J., Khalaf H. Rimpler M.: *J. Chromatogr. A* 723: 206-209 (1996).
30. Bosáková Z., Peršl J.: *J. High Resol. Chromatogr.* 23: 600-602 (2000).
31. Tóth Z.A., Raatikainen O., Naaranlathi T., Auriola S.: *J. Chromatogr. A* 630: 423-428 (1993).
32. Maie M.S., Parera S.D., Seldes A.M.: *Int. J. Mass Spectrom.* 232: 225-229 (2004).
33. Novotna P., Pacakova V., Bosakova Z., Stulik K.: *J. Chromatogr. A* 863: 235-241 (1999).
34. Lang P.L., Orna M.V., Richwine L.J., Mathews T.F., Nelson R.S.: *Microchem. J.* 46: 234-248 (1992).
35. Schweppe H.: *Handbuch der Naturfarbstoffe*, Ecomed, Landsberg (1993).
36. Šlampová A., Smělá D., Vondráčková A., Jančářová I., Kubáň V.: *Chem. Listy* 95: 163 (2001).
37. Berrie H.B.: Prussian Blue In: Fitzhugh E.W. (ed): *Artist's Pigments, A Handbook of Their History and Characteristics*, vol. 3, National Gallery of Art, New York, ch. 7, p. 191-217 (1997).
38. Losos L., *Techniky malby*, Praha, (1964).
39. Slánský B., *Technika malby díl I., Malířský a konzervační materiál*, SNKLHU, Praha, (1953).
40. Kučková Š.: *Diplomová práce – Identifikace proteinových pojiv v barevné vrstvě uměleckých děl metodou hmotnostní spektrometrie*. VŠCHT Praha (2006).

41. Havlová H.: *Bakalářská práce – Využití Ramanovy spektroskopie pro analýzu výtvarných děl*. PŘF UK Praha (2004).
42. Strnadová J.: *Bakalářská práce – Využití infračervené spektroskopie FTIR pro analýzu výtvarných děl*. PŘF UK Praha (2004).
43. Mock G.N., Rucker J.W.: *Am. Dyestuff Reporter* 15 (1991).
44. Maier P., Kruger F., Gruniger G.: *Melliand Textilber.* 11: 786-790 (1996).
45. Novotna P., Boon J.J., van der Horst J., Pacakova V.: *Color. Technol.* 119: 121-127 (2003).
46. Drewlo S., O. Brämer Ch., Madkour M., Mayer F., Steinbüchel A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1964–1969 (2001).
47. Muraganandam A.V., Buttacharya S.K.: *Indian J. Chem., Sect. B* 39: 125-129 (2000).
48. Kučková Š.: *Diplomová práce – Analýza organických pigmentů a pojiv*. PŘF UK Praha (2003).

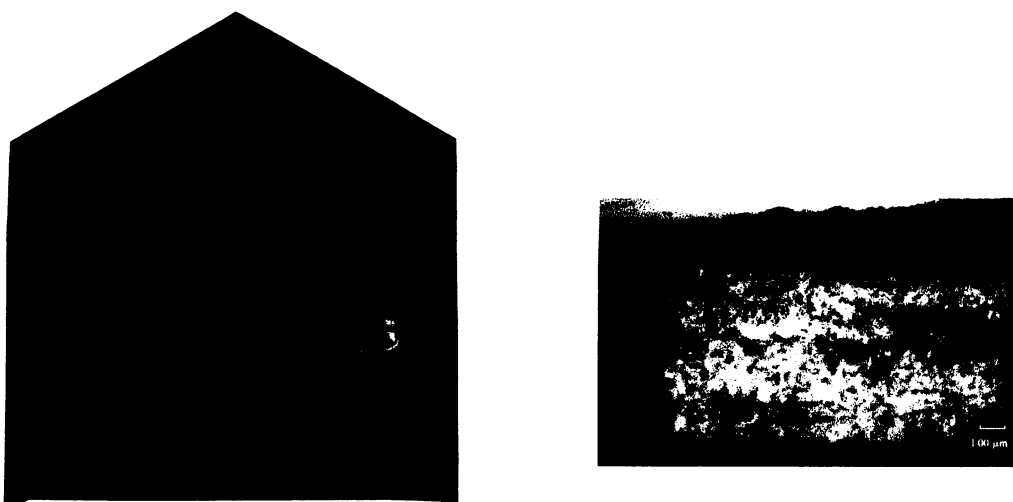
7. Seznam použitých zkratk

ESI MSD	elektro-spray ionizace v hmotnostně detekční spektrometrii
GC-FID	gas chromatography-flame ionisation detector (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysoko účinná kapalinová chromatografie)
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
TPCK	L-1-tosylamid-2-fenylethylchloromethylketon
MTBSTFA	N-tert-butyl dimethyl-silyl-N-methyltrifluoroacetamid
Py-GC-MS	pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry (pyrolýzní plynová chromatografie)
SEM/EDX	řádkovací elektronový mikroskop s energeticky-disperzním analysátorem rentgenového záření

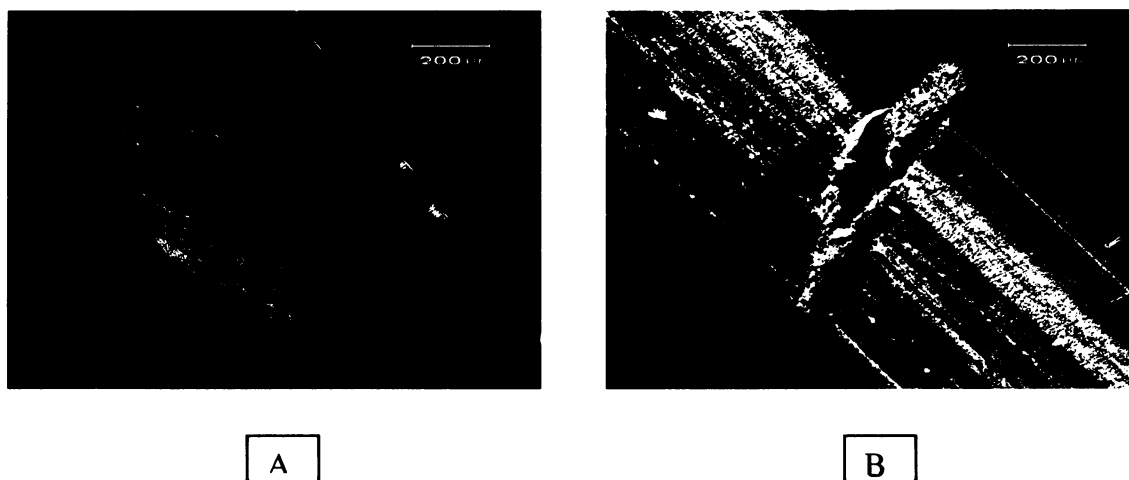
8. Obrazová příloha



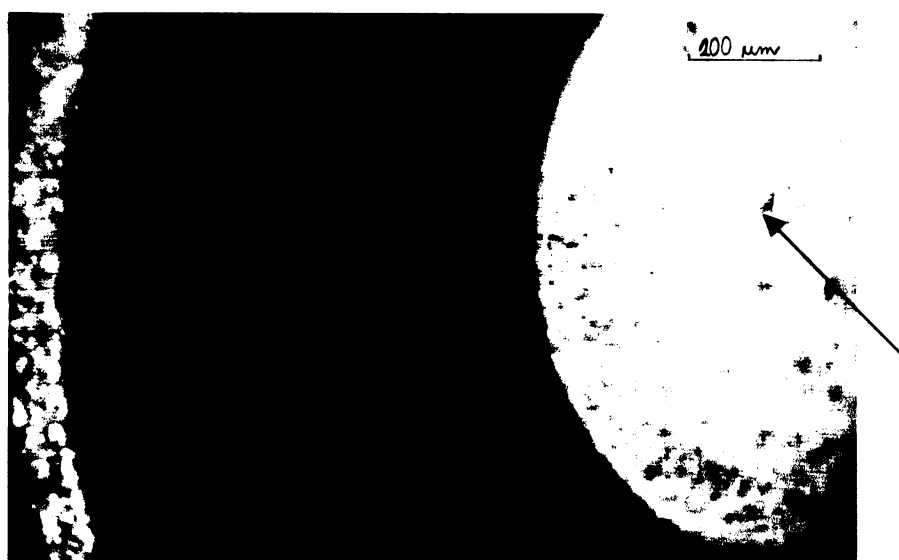
Obrázek I. Fotografie nestárnutých a stárnutých modelových barevných vrstev indiga, pruské modře a ftalocyaninu měďnatého.



Obrázek II. Obraz Panny Marie Ochránitelky datovaný do roku 1500 a studovaný fragment s analysovanou modrou přemalbou. (Foto archiv AVU Praha.)



Obrázek III. A: Fotografie ultramikrotomového řezu modelové barevné vrstvy obsahující 30 % hm. ftalocyaninu měďnatého. B: Fotografie ultramikrotomového řezu reálné barevné vrstvy.



Obrázek IV. Fotografie spotu na měřicí ocelové destičce během měření hmotnostního spektra metodou MALDI-TOF. Fragment reálného vzorku nazvaného Kubismus obsahující ftalocyanin měďnatý je označen šipkou.