

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIE PŘI OVĚŘOVÁNÍ PRAVOSTI
UMĚLECKÝCH DĚL**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Lucie Pušová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Konzultant:

Mgr. Andreea Maria Iordache, Ph.D.

Olomouc 2013

SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá problematikou ověřování pravosti uměleckých děl. V teoretické části jsou popsány způsoby padělání nejrůznějších uměleckých děl, například obrazů, fresek nebo plastik a jako příklad jedna kazuistika (padělatel Han van Meegeren). Poté jsou zmíněny různé vědecké metody používané při odhalování padělků, přičemž největší část je věnována metodám analytickým. Postupně jsou diskutovány metody spektrální, elektroanalytické a separační, především však kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie, a jejich konkrétní uplatnění při odhalování padělků. V experimentální části je testována metoda založená na hmotnostní spektrometrii s ionizací elektrosprejem pro analýzu čtyř monosacharidů a dvou alduronových kyselin, které jsou obsaženy v rostlinných pryskyřicích, používaných na výrobu barev pro umělecké malíře. Při analýze byla použita kyselina trihydrogenboritá pro zlepšení ionizace a možné odlišení analyzovaných látek s ní reagujících a nereagujících. Dosažené výsledky mohou být základem pro vývoj metody odlišující různé rostlinné pryskyřice v uměleckých dílech.

SUMMARY

The thesis deals with the authentication of works of art. The theoretical part describes techniques of counterfeiting of works of art (paintings, frescos, sculptures etc.) and a story of a counterfeiter Han van Meegeren. Further, various scientific approaches used to detect forgeries, mainly methods of chemical analysis, are mentioned. Spectral, electroanalytical and separation methods, especially liquid chromatography and mass spectrometry, and their practical applications in the detection of counterfeits are discussed. In the experimental part, attention has been paid to a method based on mass spectrometry with electrospray ionization for analysis of four monosaccharides and two alduronic acids occurring in different plant gums used by painters. Trihydrogenboric acid was applied to improve ionization and differentiated of analytes giving positive or no reaction with this acid. The results can become the basis for the development of a method distinguishing different plant gums in works of art.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....
Lucie Pušová

Poděkování

Děkuji panu prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce, za čas, ochotu, připomínky a cenné rady, které mi věnoval. Děkuji také mé konzultantce Mgr. Andreee Marii Iordache, Ph.D., za obětavost, ochotu, trpělivost a čas, který mi při měření věnovala. Nakonec bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za psychickou podporu.

OBSAH	Strana
1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 OVĚŘOVÁNÍ PRAVOSTI UMĚLECKÝCH DĚL	7
2.1.1 Padělání	7
2.1.2 Metody odhalování padělků	10
2.1.3 Han van Meegeren, padělatel století	12
2.2 ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ VE FORENZNÍ CHEMII	14
2.2.1 Radiokarbonová metoda	14
2.2.2 Spektrální metody	15
2.2.3 Elektroanalytické metody	17
2.2.4 Separční metody	17
2.2.4.1 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie	20
2.2.4.2 Hmotnostní spektrometrie	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	24
3.2 PRACOVNÍ POSTUP	25
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	26
4.1 ANALÝZA MONOSACHARIDŮ A ALDURONOVÝCH KYSELIN OBSAŽENÝCH V PŘÍRODNÍCH PRYSKYŘICÍCH	26
4.1.1 Ribulosa	27
4.1.2 Ribosa	29
4.1.3 Arabinosa	30
4.1.4 Xylosa	31
4.1.5 Glukuronová kyselina	32
4.1.6 Galakturonová kyselina	33
5. ZÁVĚR	34
6 . LITERATURA	36
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	38
7.1 SEZNAM OBRÁZKŮ	39
7.2 SEZNAM TABULEK	39
8. PŘÍLOHY	40

1. ÚVOD

Při řešení soudních sporů jsou velmi významné forenzní vědy jako například daktyloskopie (zkoumá otisky prstů), balistika (identifikuje zbraně podle projektilu), soudní lékařství (stanoví čas a příčinu smrti), ale i chemie (identifikuje látky z místa činu). Forenzní vědci nakonec prezentují své poznatky jako znalci před soudem.

Forenzní chemie se spolu s toxikologií, chemií životního prostředí, požární chemií atd. řadí mezi kriminalistickou chemii. Úkolem kriminalistické chemie je například zkoumání léčiv a drog, zjišťování technických příčin požárů, zkoumání ovzduší a vody, zkoumání pohonných hmot, zkoumání příčin a následků ekologických havárií a mnoho dalších. Dále se chemie uplatňuje při zkoumání listin, dokladů, uměleckých děl apod. Obecně jsou předmětem jejího zkoumání vlastnosti, vnitřní stavba, složení a přeměny nejrůznějších látek, které se mohou objevit v kriminalistické praxi.¹

Pro forenzní účely se používá mnoho metod analytické chemie poskytujících kvalitativní (zkoumaná látka je ve vzorku obsažena) a kvantitativní výsledky (ve vzorku je x % zkoumané látky).²

Předložená práce se zaměřuje na problematiku ověřování pravosti uměleckých děl. Uvedu postupy při padělání a dále také metody používané při odhalování padělků. Zaměřím se hlavně na analytické metody. Praktická část se bude věnovat analýze monosacharidů hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. K přípravě vzorků použiji kyselinu trihydrogenboritou pro zlepšení ionizace. Monosacharidy jsou součástí rostlinných pryskyřic, které slouží jako pojivové médium při přípravě barev pro umělce. Na základě přítomnosti či nepřítomnosti konkrétního monosacharidu nebo kyseliny lze určit druhy rostlinných pryskyřic.³

2. TEORETICKÁ ČÁST

2. 1 Ověřování pravosti uměleckých děl

Umění v užším smyslu, tzv. umění krásné, v němž se klade důraz na tvořivost, originalitu a individualitu umělce, v sobě zahrnuje známá odvětví, která můžeme rozdělit na umění výtvarná, vytvářející trvalá vizuální umělecká díla (například malířství, architektura, sochařství, šperkařství, keramika atd.), a umění hudební, kde sám umělec vystupuje před publikem (například zpěv, tanec, hudba, divadlo atd.). Počátky umění můžeme najít už v pravěku. Pravděpodobně nejstarší je tanec a pravěké výtvarné umění. Umění se vyvíjí i v současnosti, vznikají nové druhy umění, nové umělecké styly atp. ⁴

Umělecká díla se kopírují odjakživa a to z různých důvodů. Mohla být vytvořena kopie velmi starého obrazu, jehož originál nebyl vlivem stáří příliš čitelný, například pro didaktické účely nebo kvůli zachování podoby tohoto obrazu do budoucna. Ovšem nejčastějším důvodem, proč jsou umělecká díla kopírována, je finanční zisk. V tomto smyslu se již o kopii mluví jako o padělku. ^{5,6}

2. 1. 1 Padělání

Padělek je výtvarný výrobek, který se vydává za něco jiného, než čím skutečně je. Padělají se práce nejen z oboru malířství a sochařství, ale i výrobky uměleckých řemesel aj. Nezáleží na tom, zda je zfalšování úplné, nebo šlo jen o úpravu již existujícího díla. Za falzifikaci je bráno i podepsání díla jménem umělce, jehož práce jsou na trhu žádanější než práce původního autora, nebo dokonce dodatečné signování díla jménem umělce, jenž dílo vytvořil, ale nepodepsal.

Padělá se všechno, z čeho má padělatel zisk, jako jsou obrazy, sochy, plastiky, knižní vazby, nábytek, koberce, stříbrné poháry, svícní, poštovní známky, sarkofágy,

porcelán, rytiny, zbraně, kostýmy, noty, rukopisy, listiny, cenné papíry, peníze, mince, pečeti, těžítka, prsteny, kolky a mnoho dalšího.

Z uměleckých děl se nejčastěji padělají obrazy. Falzifikátor může zvolit různé způsoby, jak dílo vytvořit, aby mělo dobový vzhled. Použije například neatraktivní dobový obraz a přemaluje jej obrazem novým. Falzum může zhotovit i na starý materiál, který ovšem musí upravit, aby odpovídal požadované době. Stejně tak může posloužit i nový materiál, kterému padělatel dodá starý vzhled. Často využívá starého dobového materiálu, sloužícího k jiným účelům (např. dřevěný podklad pro malbu může nahradit zadní stěna skříně, ten měděný pak deska z měděné střešní krytiny apod.)⁶

Potvrzení pravosti uměleckého díla je možné pomocí mnoha technik a jejich uplatněním na jakoukoliv součást tohoto díla, například lak, rám obrazu, plátno, pigment, nebo pojidlo. Pojidla vodová, balzámy, pryskyřice, oleje a vosky se používají převážně k přípravě barev a jak vyplývá z názvu, jejich funkcí je spojit jednotlivé složky pigmentu a případně další komponenty, aby vznikla barva, kterou je umělec schopen použít k tvorbě.

Přírodní vodová pojidla jsou koloidní látky, které označujeme také jako lepidla kvůli jejich značné lepivosti. Mohou být jak živočišného (kasein, albumin, bílek, kostní, kožní a rybí kliš aj.), tak rostlinného původu (arabská a třešňová guma, škrob, tragant atd.) Z chemického hlediska jsou to komplikované polysacharidy, znečištěné bílkovinami, fenolickými látkami aj. Mají kyselý charakter a skládají se z různých monosacharidů, například arabinosy, glukosy, ribosy, kyseliny askorbové atd.³

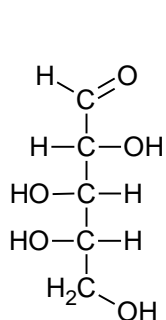
Mezi umělci jsou přírodní pojidla velice oblíbená kvůli jejich vlastnostem. Všechny tyto látky jsou velice stálé, netmavnou, nezloutnou, schnou pouhým odpařením vody a po uschnutí nepodléhají v suchém prostředí dalším změnám. Nevýhodou však je, že ve vlhkém prostředí bobtnají a snadno tak podlehnou rozkladu způsobovanému mikroorganismy. Nebo naopak ve velmi suchém prostředí vyschnou až příliš a hrozí popraskání a odlupování malby. Většinou je tento problém vyřešen přimícháním hygroskopické látky, jež pomáhá udržet vlhkost. Bývá to například med, sirup, cukr, glukosa nebo glycerin.

Z rostlinných pryskyřic (klovatin) se hojně používá **arabská guma**, pocházející ze severoafrických akácií, například akácie senegalské a akácie arabské. Skládá se z monosacharidů rhamnosy, arabinosy, galaktosy a glukuronové kyseliny.

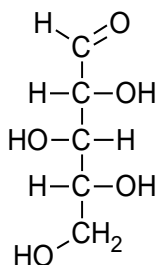
Třešňová guma je druhem pryskyřice vytékající z ovocných stromů, kam patří například i guma švestková aj. Skládá se z manosy/xylozy, arabinosy, galaktosy a glukuronové kyseliny.

Třetí často používanou rostlinnou pryskyřicí je **tragant**, který pochází z rostlin rodu kozincovitých rostoucích v Persii, Malé Asii, v Řecku a na Krétě. Skládá se z xylozy, arabinosy/glukosy, galaktosy, fukosy a galakturonové kyseliny.³

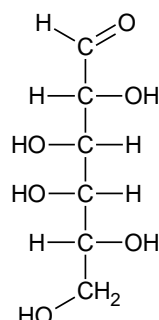
Monosacharidy a cukerné kyseliny, které mohou být obsaženy v rostlinných pojivech:³



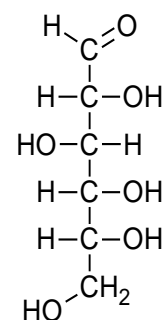
L -arabinosa (Ara)



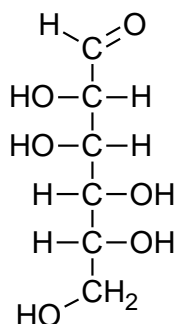
D -xylosa (Xyl)



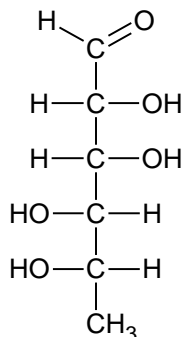
D -galaktosa (Gal)



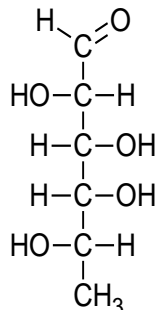
D -glukosa (Glu)



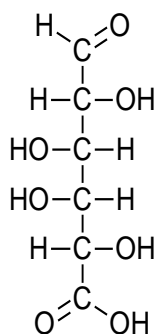
D -manosa (Man)



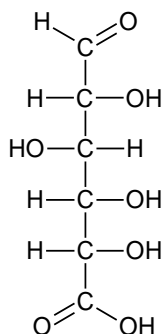
L -rhamnosa (Rham)



L -fukosa (Fuc)



D -galakturonová kyselina (GalAc)



D -glukuronová kyselina (GluAc)

2. 1. 2 Metody odhalování padělků

Prvotní podezření, že by se mohlo jednat o falzum, vzbuzuje velmi nízká cena, několikrát přelesený rub plátna, motiv obrazu nezapadající do autorovy monografie nebo rozprodej soukromé sbírky. Padělatelé se zaměřují jak na historická díla velkých umělců, tak i na díla umělců současných jako jsou Jan Zrzavý, Josef Šíma, Otakar Kubín, Jan Kanyza aj.

Pravost uměleckého díla je zkoumána mnoha odborníky. V první řadě jsou to **historici umění**, kteří se specializují na dané období nebo daného umělce, **restaurátoři** se, mimo jiné, zaměřují na odborné odběry vzorků, **mineralogové** hledají odlišnosti v jednotlivých barevných pigmentech, **mechanoskopici** zkoumají rámy obrazů, **defektoskopici** rentgenují plátna, **dendrologové** určují druhy použitých dřevin, **grafologové** rozhodují o pravosti umělcova podpisu, kdy podle předlohy originálů hodnotí sklon, délku a výšku podpisu, techniku psaní jednotlivých písmen atd. Odborníků a expertů podílejících se na ověřování pravosti uměleckých děl je daleko více, než je uvedeno výše, ovšem rozhodující význam mají výsledky z chemické laboratoře.^{7,8}

Odhalení falzifikátu ztěžuje fakt, že velcí umělci byli mnohdy také učitelé a žáci přebírali styl svých učitelů, proto mohou být jejich díla velmi podobná. V některých případech dokonce umělec signoval dílo žáka svým podpisem na důkaz toho, že žák prošel zkouškou.⁷

Umělecký předmět musí být pro ověření pravosti posuzován jako celek, i kdyby byl jakkoliv složitý. Určující je dobová technika, kterou nelze nikdy vystihnout naprosto přesně se všemi detaily, a také proměny v čase – stárnutí, které se projevuje jak ve vnějším vzhledu tak ve fyzikálních vlastnostech. Obrazy jsou rentgenovány, mikroskopicky je určen druh dřeva, je studována přípravná kresba, systém vrstev malby a druh některých pigmentů, povaha pojidla, složení podkladu, charakter rukopisu, způsob zlacení a puncování atd. Pro odlišení falz se nejvíce osvědčila analýza modrých a žlutých pigmentů, protože jejich složení a výskyt je specifický.⁹

Čím větší je časový interval mezi vznikem originálu a jeho kopií, tím je schopnost rozeznat originál vyšší. Falzifikáty může od originálu odlišovat cokoliv, proto je nutné mít srovnávací materiál (barvy, štětce, palety nebo originál obrazu umělce z daného období).

Slavní umělci používali do svých ráků pouze ručně vyrobené hřebíčky, protože jiné v té době ani nebyly, proto rentgenem odhalené strojově vyrobené hřebíčky usvědčí dílo jako falzum. Padělatelé většinou nedodrží přesný postup přípravy podkladu pro malbu a zjednoduší si jej, což opět usnadňuje potvrzení falza. Do krakel (prasklin v krycím laku), které lze také uměle vytvořit, je vtírán vatou prach, aby se docílilo věrohodnosti, ale jeho složení neodpovídá skutečnosti, že by se zde ukládal postupně několik desítek nebo stovek let. Mušince na malbě jsou nahrazovány rozprášeným asfaltem rozpuštěným v terpentýnu, proto jen jednoduchá analýza odhalí, že nepochází od živočichů. Měděná deska využívaná jako podklad pro malbu má postupem času jinou poréznost na čistém rubu než na barvou překrytém líci, proto je těžké tento typ podkladu napodobit. Také zlaté pláty používané ke zlacení nebyly tak tenké, jako jsou dnes a lišily se i v chemickém složení.⁶

Zkoumaný obraz se prohlíží pod různými světly. Ultrafialové (UV) záření způsobí luminiscenci, což odhalí odlišnosti složení barevných vrstev. To může znamenat dodatečné zásahy do díla, přemalby, retuše, které vznikly později nad vrstvou ochranného laku, jenž chránil původní malbu. Infračervená (IR) reflektografie nejlépe odhalí rozvrhovou kresbu.⁸

Je vidět, že k odhalení falzifikátu může posloužit celá řada indicií. Jak již bylo uvedeno, zkoumá se plátno, dřevo, kov, rám, barvy, pigmenty, podkladový nátěr, pojivo, zlacení a puncování, ochranný lak, vrstva prachu, cizorodé částice, organické formy života (červotoči, bakterie, plísně, mušince atd.), ale také motiv (téma) malby, styl malíře, nanášení barev, používání druhů barev a jejich odstínů a mnoho dalšího.

V současné době se pracuje na možnosti využití **výpočetní techniky** při ověřování pravosti uměleckých děl. K tomuto účelu slouží speciální software, který pomáhá historikům umění a znalcům určit, zda je příslušný obraz originálem či nikoliv. Styl malířského rukopisu konkrétního umělce je pomocí statistického měření převeden do série matematických rovnic. Software najde charakteristické znaky, např. pokud jde o kladení štětce či tužky, zda levou či pravou rukou, typické linie tahů a nanášení barev atd. Zkoumaný obraz je v co nejlepší kvalitě naskenován do počítače, pomyslně rozdělen na 64 částí a aplikací matematického

algoritmu vznikne speciální software pro ověřování děl jednoho konkrétního umělce. Software dokáže matematicky popsat vlastnosti, které ani lidské oko nezachytí, což je jeho obrovskou výhodou. Pro další vývoj této metody je zapotřebí vstoupit do dalších galerií a nasbírat data z mnoha obrazů dalších umělců, čímž se vytvoří velká databáze. Navíc je nezbytné program dále zdokonalovat a zlepšovat jeho statistické vlastnosti.⁵

Metoda má i své nevýhody. Většina vynikajících malířů byla také proslulými učiteli mnoha žáků, kteří přebírali styl svého mistra, jak již bylo uvedeno. Další omezení představuje moderní umění. U obrazů, na nichž se například v menší míře používá kontrast, je všechno složitější. Umělec také může během několika let podstatně obměnit svůj styl, takže metoda může označit obraz téhož autora za padělek. Metoda však projevuje vysokou spolehlivost u výtvarného umění minulosti, které patří mezi nejdražší a nejvyhledávanější.⁵

2. 1. 3 Han van Meegeren, padělatel století

Nizozemský malíř **Hanricus Antonius van Meegeren** (*10.10.1889 †30.12.1947) byl jedním z největších padělatelů v historii umění. Studoval architekturu na Technickém institutu v Delftu, ale dostudoval až uměleckou akademii v Haagu, kde také působil jako zastupující asistent.

Specializoval se především na padělání obrazů největšího nizozemského malíře Jana Vermeera (Jan Vermeer van Delf), jenž žil v Nizozemsku o 250 let dříve. Meegeren nebyl ve své době uznávaným malířem, avšak jeho práce podepsané Vermeerovým jménem byly považovány za vrcholné umění. Zájem o pravého Vermeera vyvolalo počátkem 20. století pozdní docenění impresionismu. Jeho děl se však dochovalo velmi málo, což bylo podle historiků neuspokojivé pro chronologické uspořádání vývoje umělceva osobního stylu. Očekávali proto, že se další díla postupně objeví. Této myšlence vyhověl Meegeren a tak začalo na plno jeho tvůrčí období.

Meegeren nekopíroval již existující malby, maloval chybějící obrazy. Vermeerův styl si osvojil tak dokonale, že i největší soudobí znalci po opakovaných analýzách trvali na pravosti obrazů. Jeho nejzdařilejší obraz Emauzští učedníci visel v Boymanově muzeu

v Rotterdamu, jakožto nejvýznamnější z nizozemských kulturních památek. Ještě dnes se najdou lidé, kteří nevěří, že se jednalo o padělek. Věrohodnost svým obrazům dodával například tím, že si sám míchal barvy a nakonec celé plátno zapekl v kuchyňské troubě, aby dostalo starou patinu.

Zvrat přinesl až prodej dalšího z padělaných obrazů. Kupujícím byl Hermann Göring. Hned po válce byl Meegeren zatčen a obviněn z kolaborace a rozprodávání národního kulturního dědictví, za což mu hrozil mnohem vyšší trest než jen za padělatelství, proto se ke všemu přiznal. Odborníci mu ovšem nevěřili, proto namaloval ve vězení pod dohledem další Vermeerův obraz, ale ani poté mu neuvěřili. Obrat přineslo až nakreslení původního obrazu nacházejícího se pod jeho Emauzskými učedníky. Tato kresba se opravdu pod obrazem po prosvícení rentgenovými paprsky objevila. Královna poté chtěla udělit Meegerenovi milost, ten však zemřel dříve na selhání srdce.

Meegeren sice pracoval s barvami, které si sám míchal, tu a tam se v nich ale objevily příměsi, které nemohl Vermeer používat, protože v té době ještě neexistovaly. Dále pracoval se syntetickými pryskyřicemi, aby jeho díla prošla testem na rozpustnost (čím je lak starší, tím hůře je rozpustný). To bylo ovšem dokázáno až poté, co se přiznal. Používal pravděpodobně fenolformaldehydové pryskyřice. Analýza této syntetické pryskyřice z malého množství vzorku není snadná. Hlavním problémem je oddělení pryskyřice od pigmentu, což se vyřeší jednoduše rozpuštěním vzorku olovnaté běloby ve zředěné kyselině chloristé. Olovnatá běloba a přírodní pryskyřice se zcela rozpustí, kdežto syntetická pryskyřice nikoliv. Také barevné reakce na fenoly a aldehydy byly pozitivní. Dále změření indexu lomu potvrdilo, že se v tomto případě jednalo o syntetické a nikoliv přírodní pryskyřice, jelikož se výrazně lišil od těch přírodních. Později byla provedena doplňující analýza pomocí pyrolýzní plynové chromatografie (PGC), která potvrdila přítomnost fenolu, o-kresolu, p-kresolu, 2,6-dimethylfenolu a 2,4-dimethylfenolu, jež vznikly pyrolýzou fenolformaldehydové pryskyřice.

Meegerenův případ ukončil kariéru několika expertům, kteří považovali obrazy za pravé, a byl prohlášen za národního hrdinu. Jeho padělky jsou považovány za vrchol padělatelství uměleckých děl a dnes mají vysokou hodnotu. V roce 1997 byl obraz Ježíš v chrámu diskutující s židovskými učenci prodán za necelý 1 milion korun.^{6,10}

2. 2 Analytické metody používané ve forenzní chemii

Analytických metod používaných ve forenzní chemii je značné množství a dají se kombinovat mnoha různými způsoby, aby splnily i ty nejnáročnější požadavky. Kromě výborných výsledků jsou to i požadavky ekonomické, materiální, personální, časové atd. Volba optimální metody pro dosažení spolehlivých výsledků je velmi významná, neboť vzorky nebývají obvykle čisté chemické látky, ale směsi chemických sloučenin. Největší důraz však musí být kladen na odběr vzorku, protože chyby způsobené odběrem vzorku jsou často neodstranitelné.¹¹

2. 2. 1 Radiokarbonová metoda

K určení stáří a identifikaci uměleckých děl se používá **radiokarbonová metoda**, která je ovšem destruktivní, proto nemají některé muzejní exponáty jasný původ. Jejich majitel zkrátka odmítl odebrání vzorku pro analýzu a tím poškodil exponát.

Při analýze klasickou radiokarbonovou metodou se odebraný vzorek rozpustí v silné kyselině nebo zásadě a poté spálí. V uvolněném oxidu uhličitým se určuje obsah radioaktivního izotopu uhlíku ^{14}C . Z poměru množství izotopu ^{14}C k jeho sesterskému (stabilnímu) ^{12}C , lze vypočítat dobu zániku organické formy života. Nelze tedy určit, kdy byl obraz namalován, nýbrž kdy byl pokácen strom, ze kterého je papír, na němž je obraz namalován.^{12, 13}

Na konferenci v roce 2010, kterou pořádá Americká chemická společnost, předvedli vědci metodu, která využívá k získání ^{14}C plazma a měla by být nedestruktivní.

Pro nedestruktivní metodu se využívá speciální komora, do které se umístí zkoumaný předmět. V komoře vytvořený ionizovaný plyn nepatrně oxiduje povrch zkoumaného předmětu a tím z něj uvolňuje potřebný oxid uhličitý. Oxid poté slouží ke stejnému účelu jako u destruktivní metody. Tento způsob lze uplatnit například na analýzu dřeva, kůže, mumifikované tkáně i gázy atd.^{12, 13}

2. 2. 2 Spektrální metody

Spektrální metody se zabývají vznikem, měřením a interpretací emisních nebo absorpčních spekter. Celá řada metod z této skupiny je nedestruktivní, a proto velmi často využívaná při analýze uměleckých děl.

Energeticky disperzní rentgenová fluorescence (EDXRF) s radionuklidovým buzením je metoda stanovení prvkového složení zejména pevných, ale i kapalných materiálů. Analýza je rychlá a relativně snadná, bez jakékoliv úpravy vzorku. Je také nedestruktivní, vzorek není změněn ani poškozen. Metoda se využívá pro stanovení prvkového složení vzorků a ke stanovení tloušťky vrstvy prvku na libovolném materiálu. Analýzy je možné provádět i v terénu například u nepřepravitelných vzorků, a analyzována může být jen malá část velkého vzorku (zdi nebo omítky domu, velmi cenné předměty nebo předměty, jejichž stav přepravu neumožňuje apod.).

Metoda je využívána také k prvkovým analýzám slitin neznámých kovů zejména slitin drahých kovů, kovových předmětů vysoké kulturní nebo historické hodnoty (kovové plastiky, mince, nádobí, sakrální předměty, železné a bronzové archeologické nálezy) a k identifikaci barevných pigmentů zejména na olejomalbách, akvarelech, polychromovaných plastikách, freskách atd. za účelem verifikace uměleckých děl.¹⁴

EDXRF se jakožto přenosná nedestruktivní metoda využívá také pro studium elementárního složení pravěkých jeskynních maleb. Díky tomu lze určit, kdy byly malby vytvořeny.¹⁵

S použitím více spektrálních technik byla zkoumána tradiční japonská umělecká díla (např. japonské hůlky nebo skládací zástěna zvaná byobu). Japonská paleta neobsahuje příliš mnoho pigmentů, zato jsou velmi specifické. Během dvacet století dlouhého vývoje se stále k výrobě pigmentů používají saze a lastury z ústřic a později také zlato, stříbro, azurit a malachit.

Nejprve byly japonské barevné hůlky zkoumány pomocí nedestruktivní **energeticky disperzní rentgenové fluorescence (EDXRF)** pro stanovení přítomných látek a vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými hůlkami. Z analýzy byl patrný pravděpodobný

výskyt některých pigmentů a plnidel, ale protože jde o elementární techniku, nebylo možné jednoznačně identifikovat anorganické chemické sloučeniny nebo určit jakékoli organické komponenty. Poté byly hůlky analyzovány **rentgenovou difrakcí (XRD)** pro dosažení informací o vlastnostech složení podle analýzy krystalické fáze. Tato technika potvrdila přítomnost většiny pigmentů a plnidel. Nakonec byly hůlky analyzovány **infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR)**, která identifikovala jak druh organických pigmentů, tak druh pojiva. Mnohdy bývá FTIR doplněna o analýzu **Ramanovou spektroskopií**, jako tomu bylo u zkoumání japonské skládací zástěny, jelikož se tyto techniky vhodně doplňují.^{16, 17}

FTIR a **Ramanova spektroskopie** slouží dále například k rozlišení a identifikaci červeného inkoustu v otiscích pečetí. Metoda rozliší jednotlivé složky barviva organického i anorganického původu.¹⁸

Kombinací dvou nedestruktivních technik, **mikro-rentgenové fluorescenční spektroskopie (XRF)**, která odhaluje atomové složení, a **mikro-Ramanovy spektroskopie (MRS)**, která odhaluje molekulární informace, lze získat údaje o chemickém složení barev použitých na zkoumaném objektu. MRS má velkou výhodu v tom, že dokáže analyzovat směsi různých pigmentů, ze kterých se skládá určitý barevný odstín a poskytne tak spektra jednotlivých částecek. Nevýhodou obou technik je jejich neschopnost studovat spodní vrstvy malby. Přesto jsou velmi užitečné jako předběžné studie umožňující výběr míst pro následný odběr vzorků. Tím se sníží jejich počet nutný pro spolehlivou analýzu a následky pro umělecké dílo budou minimální. Tyto techniky byly úspěšně použity k prostudování nizozemských deskových obrazů z konce 14. století, u nichž je odběr vzorku kvůli jejich vysoké kulturní hodnotě zakázán.¹⁹

Nedestruktivní a neinvazivní metoda, **optická koherentní tomografie (OCT)**, se používá k zobrazení vnitřních struktur malby. Tato metoda využívá infračervené záření, které proniká hlouběji a má vysokou rozlišovací schopnost. Na základě toho může odhalit například hloubku umístění autorova podpisu a tím rozhodnout o jeho autorství.²⁰

2. 2. 3 Elektroanalytické metody

Elektroanalytické metody zkoumají vlastnosti a chování roztoku v závislosti na jeho složení a koncentraci. Jsou založeny na měření některé z elektrických veličin (např. napětí, proud, vodivost atd.)

Elektrochemické metody mohou být použity pro doplnění např. mikroskopických a spektroskopických technik a pro získání chemických, mineralogických atd. informací o složení vzorku z uměleckých děl a archeologických artefaktů.²¹

Voltametrie mikročástic (VMP) je obecná metoda pro studium pevných látek založena na mechanickém upevnění mikro- nebo nanogramů mírně rozpustné pevné látky k povrchu inertní elektrody (nejčastěji parafínem impregnované grafitové elektrody (PIGE)) ponořené do vhodného elektrolytu, jejíž odezva je zaznamenávána. Metoda poskytuje přímé informace o mineralogickém složení a oxidačních stavech zkoumaných analytů. Je velice užitečná pro analýzu uměleckých děl, protože dokáže, mimo jiné, identifikovat původní materiály a techniky používané umělci. Využívá se v oblastech archeologie, restaurátorství a ochrany životního prostředí, v nichž slouží k analýze anorganických i organických pigmentů, nástěnných maleb i olejomalb, keramických a skleněných materiálů, kovů a jejich slitin, textilu a dále pro hodnocení dopadu okolních podmínek na zachování kovových předmětů. Její velkou výhodou je, že vyžaduje jen malé množství vzorku a je velice citlivá.²¹

2. 2. 4 Separační metody

Separační metody slouží k oddělení jednotlivých složek ze směsi s využitím různých vlastností, ať už je to rozpustnost, hmotnost, teplota varu nebo elektrický náboj. Rozseparovaný vzorek se používá k další analýze.

Plynová chromatografie (GC) je hojně využívanou analytickou metodou v analýze uměleckých děl. Nejčastěji ve spojení s další technikou, například hmotnostní spektrometrií (MS). Byla využita například k identifikaci a rozlišení rostlinných pryskyřic nesoucích označení Dračí krev. Tuto červenou pryskyřici vylučují rostliny patřící do rodů *Dracaena* (Afrika), *Daemonorops* (jihovýchodní Asie), *Pterocarpus* a *Croton* (oba Jižní Amerika). Jelikož se Dračí krev vyskytuje ve směsi s jinými materiály, které umělecké dílo obsahuje, je použití GC-MS velmi výhodné. Vzorek se před analýzou několikrát extrahuje, čímž se oddělí jednotlivá pojidla (oleje, vosky, pryskyřice, proteiny a polysacharidy). Pomocí tohoto postupu mohou být detekovány i minoritní komponenty a chromatogramy jsou lépe čitelné. V závěru lze poté rozlišit, z kterého rodu Dračí krev pochází.²²

Kromě Dračí krve lze metodou GC-MS stanovit například další rostlinné pryskyřice, vosky, tuky atd.^{23, 24, 25, 26}

Kapilární elektroforéza (CE), jako zástupce elektromigračních separačních metod dělí elektricky nabitě částice ve stejnosměrném elektrickém poli na základě rozdílné elektroforetické pohyblivosti.

Tato metoda je úspěšně používána mimo jiné ke stopové analýze v oblastech například výbušných a povýstřelových zplodin, organických nebo anorganických sloučenin atd. Pro forenzní vědce je snad nejdůležitější vlastností CE mimořádně malý požadavek na vzorek (nanolitry), který je výhodou v minimalizaci znehodnocení analyzovaného dokumentu. Jedná-li se o analýzu inkoustů nebo barviv, k níž se CE ve forenzní chemii hojně používá, je tato vlastnost nepostradatelná. K detekci většiny inkoustových komponent slouží obvykle UV-VIS detektor s diodovým polem. Proces je automatizovaný, rychlý a reprodukovatelný. Metoda má využití v analýze inkoustů psacích per, ale také v analýze potravinářských barviv, textilních barviv a inkoustových barev. Dále zjistí přítomnost nebarevných přídatných látek v inkoustu, které by mohly být použity jako identifikátory.³

Z těchto nebarevných látek se může jednat například o identifikaci rostlinných pryskyřic, které jsou používány v historických a uměleckých pracích, kde plní úlohu pojiva pigmentů při přípravě barviv. Různé rostlinné pryskyřice (například arabská guma, třešňová guma nebo klovatina) obsahují různé monosacharidové složky (například kyselinu

glukuronovou, rhamnosu, manosu, arabinosu atd.) a právě na základě jejich přítomnosti či nepřítomnosti může být určen druh pryskyřice.³

Jiným modelem CE je **micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)**. Tato kombinace elektroforézy a chromatografie umožňuje oddělení neutrálních částic a využívá k tomu interakci s micelami.²⁸

Jedna z možných aplikací MEKC je separace červených organických pigmentů (například madder, červené santalové dřevo, dračí krev atd.). Jako aktivní látka se pro tuto separaci používá dodecylsulfát sodný. Metoda je rychlá, jednoduchá a pro takováto stanovení velmi vhodná. Další důležitá výhoda je minimální požadavek na množství vzorku.²⁹

Další separační technikou je **papírová chromatografie (PC)**, kterou účinně nahrazuje **chromatografie na tenké vrstvě (TLC)**, byla široce používána pro analýzu barev a inkoustů díky jejímu snadnému použití a nízkým nákladům.³⁰

Kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD) byla použita při studiu hedvábných italských tapisérií. Cílem bylo získat informace o použitých barvivech (například světlice barvířská), které slouží k posouzení pravosti díla, k nastudování umělcovy techniky, ale hlavně k získání potřebných údajů pro restaurátory. Ti je potřebují pro pochopení degradačních procesů, jimž dílo podléhá, a na základě toho poté volí techniku potřebnou pro čištění.

Identifikace organických barviv je poměrně složitá. Barviva jsou velice labilní (barvy přichází o svou světlost, v průběhu extrakce mohou podléhat chemickým změnám jako například dekarboxylaci, dehydrataci atd.). Samotný vzorek obsahuje tohoto barviva jen nízkou koncentraci, která může být ještě snížena přítomností produktů rozkladu nebo prachu. Před samotnou analýzou se proto vzorek extrahuje dimethylsulfoxidem a hydrolyzuje v kyselém prostředí. Tento čistý a zakonzentrováný extrakt se nakonec analyzuje HPLC-DAD. Technika je velmi vhodná i pro analýzu složitých vzorků, jakým je například světlice barvířská.³¹

Kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem (HPLC-FLD) má uplatnění v analýze bílkovinných klišů z poživových médií používaných v obrazových uměleckých dílech. Nejvíce se používají klišy z rosolu jatečných zvířat, albuminu, kaseinu nebo vaječné bílkoviny. Bílkoviny mohou být analyzovány podle relativního množství jejich aminokyselin. Vzorek musí být nejprve hydrolyzován, aby se uvolnily aminokyseliny, které jsou následně analyzovány. Vzhledem k tomu, že aminokyseliny nemají fluorescenční vlastnosti, je nutná jejich předchozí derivatizace. Používané činidlo je v tomto případě o-ftalaldehyd s 2-merkptoethanolem. Samotná analýza probíhá na C18 kolonách s gradientovou elucí. Poměr mezi plochou píku každé aminokyseliny a plochou píku leucinu umožňuje charakterizovat různé bílkoviny (leucin poskytuje pík poměrně stabilní s nízkou variabilitou). Charakterizace bílkovinných klišů je potřebná například před konzervací nebo restaurováním uměleckých děl.³²

2. 2. 4. 1 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojení separačních a spektrálních technik je velice výhodné. Separační technikou je směs rozdělena a spektrální technika odhalí strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. Mnohdy jsou přímo identifikovány jednotlivé složky.

Kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem (HPLC-DAD-MS) má uplatnění v analýze organických barviv z textilních vzorků. Před samotnou analýzou musí být textilní vzorky zpracovány tak, aby se z nich vyextrahovalo barvivo, které obsahují. Nejčastěji se k tomuto účelu používá roztok kyseliny chlorovodíkové v methanolu a extrakce se provádí při vyšších teplotách. Nicméně, tato metoda má některé nevýhody včetně toho, že v silně kyselém prostředí dochází k rozkladu glykosidů. Použitím kyseliny trifluoroctové (TFA), místo kyseliny chlorovodíkové, lze docílit mírnějšího prostředí pro extrakci, aniž by se snížila účinnost extrakce. Příkladem barviva analyzovaného tímto způsobem je logwood, které bylo analyzováno kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací v negativním módu (LC-MS-ESI⁻), a fuchsin, jehož komponenty byly analyzovány v pozitivním módu (LC-MS-ESI⁺). Referenční barvy komerčního fuchsinu jsou zřídka čisté, většinou jsou

prodávány jako "základní fuchsin", což je směs čtyř homologů (pararosanilin, rosaniline, magenta II a nový fuchsin). Proto také nemůže být použita HPLC-DAD pro identifikaci těchto látek a používá se HPLC-MS.³³

Kapalinová chromatografie s reverzní fází ve spojení se spektrofotometrickou a hmotnostní detekcí (RP-HPLC-UV-VIS-ESI-MS) byla úspěšně aplikována při charakterizaci přírodních barviv u vybraných ornátů z katedrály Wawel (Krakov, Polsko), které byly vyrobeny pro královský dvůr Jagellonské dynastie, jež vládla v Polsku v letech 1386-1572.

Vyvinutá RP-HPLC metoda umožňuje identifikaci 29 barevných látek, vyskytujících se v přírodních barvivech, od polárních kyselin a glykosidových derivátů flavonoidů a antrachinonů, přes jejich méně polárních aglykony, až k nepolárním antrachinonům a indigoidním barvivům. Některá barviva se neionizují v ESI, například hematein nebo hematoxylin. V jejich případě pouze spektrofotometrická detekce ve viditelné oblasti spektra poskytla informace potřebné pro identifikaci. MS detektor je více selektivní a často také mnohem citlivější než UV-VIS. Poskytuje navíc informace, které umožňují objasnění struktur zkoumaných barviv.³⁴

Metoda je dále vhodná pro analýzu modrých přírodních barviv, indigotinu a kyseliny karmínové, což jsou hlavní barviva extrahovaná z vlákna pocházejícího z modročervené italské tapisérie, která byla zkoumána. Modrá barviva byla identifikována pomocí 15 barevných komponent v nich přítomných.³⁵

Další uplatnění této metody představuje identifikace indigoidních barviv (indigo, indirubin, isoindigo, isoindirubin), barevných složek přírodních barev a jejich přírodních nebo syntetických prekurzorů. Metoda umožnila identifikovat indigo a jeho složky v pravém indickém indigu (indigo z indigovníku a Tyrian purpur). Byla aplikována na identifikaci přírodních barviv z vlákna japonské tapisérie pocházející z 19. století s názvem Jeřáby v krajině. Byl uplatněn postup zpracování vzorku založený na zmrazení a mletí vzorku před extrakcí barviv z textilu. Vyvinutá metoda umožňuje rychlé, snadné a citlivé stanovení a identifikaci zkoumaných vzorků.^{36,37}

Kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) byla analyzována přírodní barviva z historických textilií, konkrétně z vlny a přírodního hedvábí, pocházejících z období Mamlúků (Benaki Museum, Athény, Řecko).³⁸

Přírodní barviva z vlny a přírodního hedvábí byla analyzována stejnou metodou ze vzorků pocházejících ze 4. až 12. století z Egypta a patřících do kolekce raně křesťanského umění ve varšavském Národním muzeu.³⁹

Dále byla HPLC-MS použita pro analýzu tří výšivek s náboženskou tematikou a dvou brokátových sametů, pocházejících ze 17. až 18. století, jež jsou majetkem Národního muzea umění v Rumunsku.⁴⁰

Kapalinovou chromatografií s reverzní fází ve spojení s hmotnostní detekcí RP-HPLC-ESI-MS byla identifikována a charakterizována přírodní barviva extrahovaná z historických textilií. K analýze bylo spotřebováno jen malé množství vzorku a jako analyzátor byla použita iontová past.

Ukázalo se, že jak **LC-MS**, ale také **LC-MS/MS** jsou univerzální nástroje pro identifikaci a potvrzení barviv v historických textiliích.⁴¹

HPLC-ESI-MS/MS lze analyzovat 21 aminokyselin obsažených v bílkovinných pojivech temperových maleb bez nutnosti derivatizace. Tato metoda je založena na hydrolýze bílkovinných složek a následné instrumentální analýze HPLC-(+)ESI-MS/MS. V tomto případě se použil trojitý kvadrupólový detektor. Optimalizovaná metoda ukazuje obecně dobrou reprodukovatelnost a přesnost a umožňuje kvantitativní stanovení aminokyselin v pojivech proteinových temper.⁴²

Stejně instrumentální metody bylo využito pro identifikaci proteinových pojiv v historických barvách, kdy byly proteiny štěpeny enzymaticky, nejčastěji trypsinem, na jednotlivé peptidy, rozseparovány a následně detekovány HPLC-ESI-MS/MS.⁴³

2. 2. 4. 2 Hmotnostní spektrometrie

Laserová ablace - hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP MS) jako technika pro analýzu pevných mikro vzorků je sice destruktivní, ale odběr vzorku poškodí plochu velikou pouze asi 50 μ m v průměru. Může být použita pro určení původu vzorků okrového barviva z tradičních australských domorodých uměleckých děl. Tyto okry jsou složeny z čistě přírodních materiálů (například směs oxidů železa a hlíny, křemen, burel, draslík, sodík, různé další barvy od bílé až po temně hnědou a dokonce i jiné druhy okrů), jejichž složení je po mineralogické a chemické stránce zcela jedinečné právě podle oblasti, ve které se vyskytují. Pomocí LA-ICP-MS byla vytvořena databáze, která slouží k prokázání místa původu okru. Největší uplatnění lze nalézt při odhalování padělků.⁴⁴

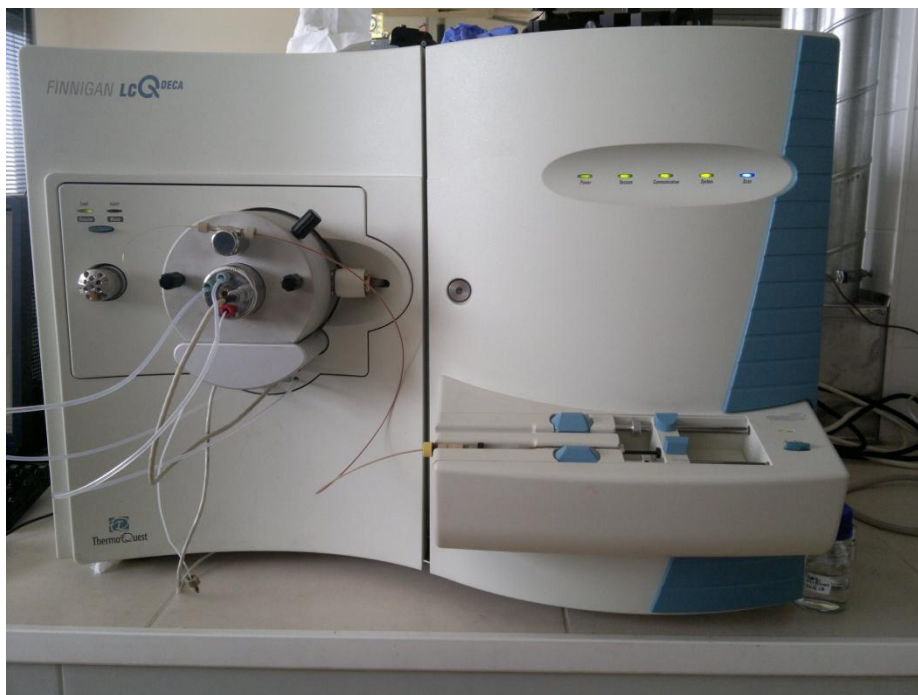
Laserová desorpce/ionizace - hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem (LDI-TOF MS) je vhodná k analýze organických barviv a pigmentů (například pruské modři, indiga a ftalocyaninové modři). Tato modrá barviva se nejlépe hodí pro dataci a autentifikaci uměleckého díla. Analýza vyžaduje jen nepatrné množství vzorku (mikrogramy), což je velkou výhodou pro zkoumání uměleckých děl.⁴⁵

Laserová desorpce/ionizace za asistence matrice - hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) poskytuje rychlou, univerzální a spolehlivou metodu s vysokou citlivostí a relativní tolerancí vůči nečistotám pro identifikaci barviv a pigmentů historických textilií z nepatrného množství vzorku. Příprava vzorku zahrnuje minimální manipulaci, a tím i minimální ztrátu vzorku. Srovnání spektra aniontů a spektra kationtů poskytuje informace o barvivu nebo pigmentu a ve většině případů dokonce identitu látky. V ideálních podmínkách mohou spektra rozlišit izomery.⁴⁶

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Měření bylo prováděno na hmotnostním spektrometru (LCQ DECA, Thermo Finnigan, San Jose, USA) s kvadrupólovou iontovou pastí a ionizací elektrosprejem (ESI). Roztok vzorku byl přímo zaváděn do iontového zdroje 500 μ l stříkačkou Hamilton a lineárním pumpou, která byla součástí spektrometru. Další přístroje využívané při experimentu byly analytické váhy (New Classic MS, Mettler, Toledo, USA), pH metr (Imolab series pH 720), ultrazvuková čistička (Elma S40H, Elmasonic) a stanice pro přípravu čisté vody (direct Q UV Millipore, MA, Bedford, USA).



Obr. 1 - Hmotnostní spektrometr

Byly měřeny standardy čtyř cukrů a dvou kyselin (vše Sigma Aldrich, Praha, Česká republika): D -(-)-arabinoza, D -(+)-xyloza, D -(-)-riboza, D -(-)-ribulosa, D -glukuronová kyselina a D -(+)-galakturonová kyselina.

Dále byla používána kyselina trihydrogenboritá p.a. (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika), hydroxid sodný p.a. (Lach Ner, Neratovice, Česká republika), methanol (HPLC SG, Lab_Scan, Gliwice, Poland), voda kvality pro HPLC a kyselina mravenčí 99,7% (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika).

3. 2 Pracovní postup

Roztok potřebný k promývání hmotnostního spektrometru mezi jednotlivými měřeními byla směs methanolu, vody kvality pro HPLC a koncentrované kyseliny mravenčí v poměru 49,5 : 49,5 : 1 (v/v).

Nejprve byl připraven roztok kyseliny trihydrogenborité o koncentraci 1mmol/l. Požadované pH roztoku 9,25 bylo upraveno 0,1 molárním roztokem hydroxidu sodného.

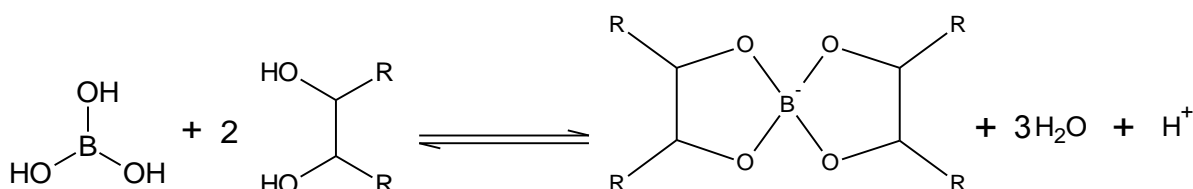
Uvedený roztok kyseliny byl dále použit na přípravu všech čtyř roztoků standardů cukrů a dvou roztoků standardů kyselin. Koncentrace výsledného roztoku byla vždy 10mmol/l. Požadované množství analytu (cukru nebo kyseliny) bylo důkladně rozpuštěno v připraveném roztoku kyseliny trihydrogenborité pomocí ultrazvukové lázně a před analýzou byly výsledné roztoky přefiltrovány, aby nedošlo k zanesení vstupní kapiláry nečistotami.

Před každým měřením analytu byl nejprve měřen slepý vzorek (blank), v tomto případě roztok kyseliny trihydrogenborité o pH 9,25.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Analýza monosacharidů a alduronových kyselin obsažených v přírodních pryskyřicích

Při analýze monosacharidů byl použit, jak již bylo zmíněno, roztok kyseliny trihydrogenborité. Koncentrace roztoku kyseliny byla 10 krát menší než koncentrace standardů. Díky tomu je možné ve spektrech pozorovat ionty jak samotných analytů, tak analytů po reakci s kyselinou trihydrogenboritou.



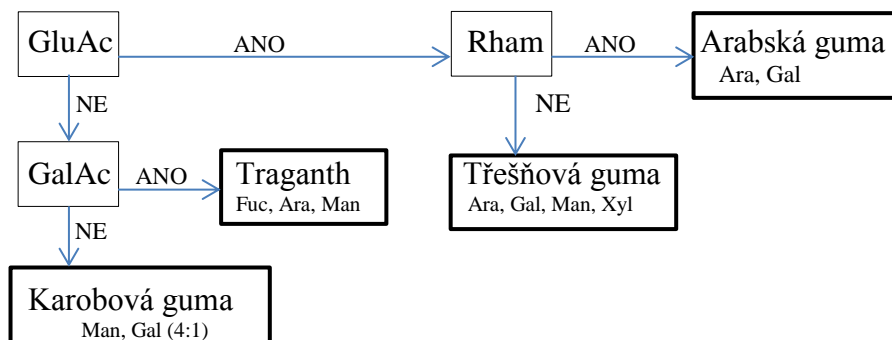
Obr. 2 - Reakce kyseliny trihydrogenborité s vicinálním diolem dvou monosacharidů.

V důsledku reakce s kyselinou trihydrogenboritou byl ve spektrech monosacharidů pozorován signál při m/z 307, který odpovídá produktu reakce dvou molekul monosacharidu s jednou molekulou kyseliny trihydrogenborité (Obr. 2), což lze očekávat vzhledem k nadbytku monosacharidu. Další významné ionty (m/z 148,9 a 194,9) lze přisoudit nemodifikovanému sacharidu. Přítomnost či nepřítomnost eventuálně poměr signálů zmíněných iontů dovoluje odlišit jednotlivé látky. Je očekávatelné, že ion m/z 307 nebude přítomen u cukrů nereagujících s kyselinou trihydrogenboritou.

Patrná je i přítomnost lehčího izotopu boru ^{10}B , která se ve spektru projeví menším píkem, s relativní intenzitou okolo 25 %, nacházejícím se o $\Delta m/z=1$ před dominantními píky (viz přílohy).

Samotná identifikace rostlinných pryskyřic probíhá na základě přítomnosti toho kterého monosacharidu nebo kyseliny, například pro arabskou gumu je určující přítomnost glukuronové kyseliny a rhamnosy, pro třešňovou gumu glukuronové kyseliny a arabinosy a pro tragant galakturonové kyseliny a fukosy.³

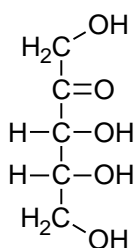
K odlišení rostlinných pryskyřic od syntetických slouží jejich rozdílná rozpustnost. Přírodní jsou dobře rozpustné ve vodných rozpouštědlech, kdežto syntetické nikoli. Nejen rozpustnost, ale i indexy lomu jsou rozdílné pro přírodní a syntetické pryskyřice. ¹⁰



Obr. 3 - Systém pro identifikaci rostlinných pryskyřic podle obsahu monosacharidů. Převzato z literatury ³

V souvislosti s uvedeným schématem (Obr. 3) byly na vybraných analytech zkoumány možnosti jejich detekce hmotnostní spektrometrií za využití výše uvedené reakce s kyselinou trihydrogenboritou. Nejprve byly pro každou látku hledány vhodné přístrojové parametry za účelem získání co nejvyšší intenzity signálu měřeného vzorku. Všechna měření probíhala v negativním módu.

4. 1. 1 Ribulosa

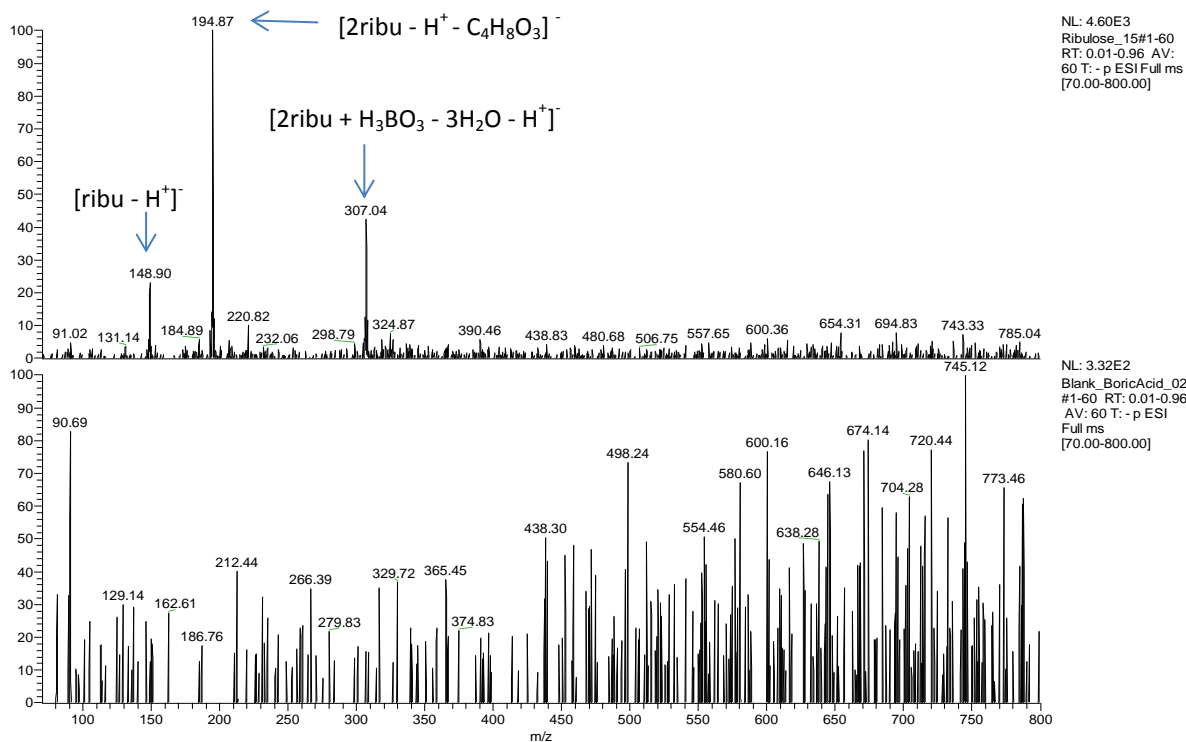


Monosacharid ribulosa má monoizotopickou molekulovou hmotnost 150,0528. Nejintenzivnější signál byl pozorován pro ion m/z 307,1, dva menší píky se ve spektru vyskytovaly při m/z 148,9 a 194,9 (Obr. 4, 5). Testované nastavení přístroje je přehledně uvedeno v tabulce I.

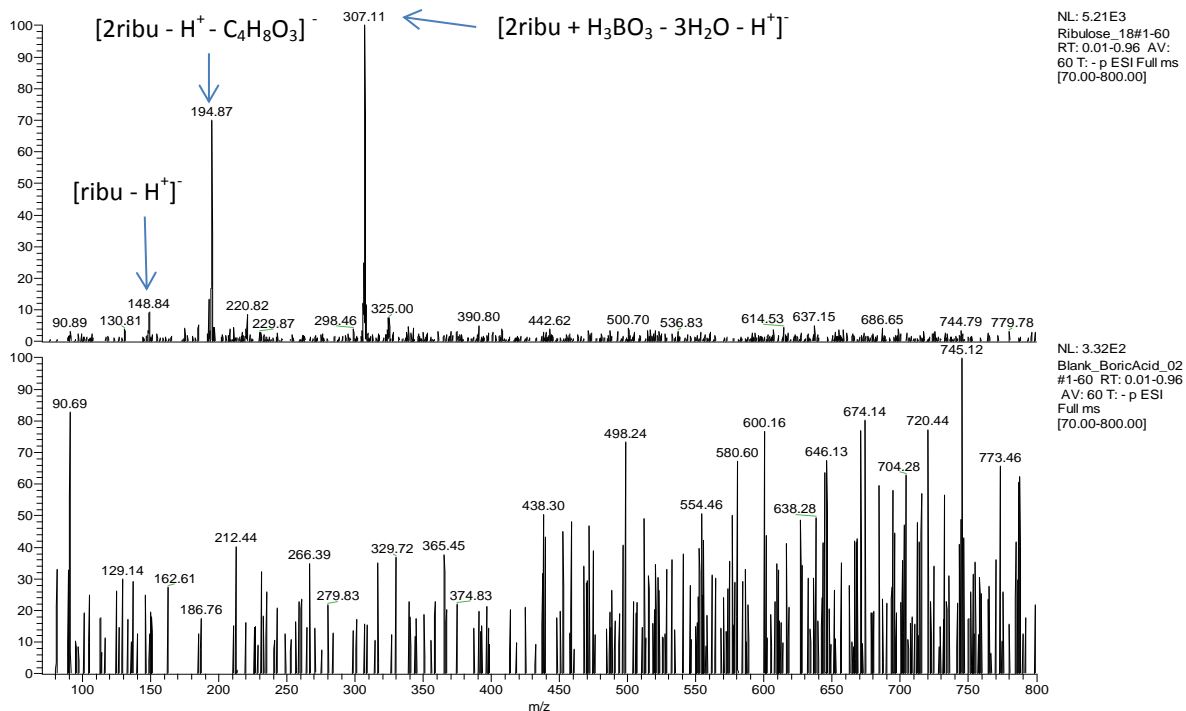
Tab. I: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro ribulosu

číslo měření	1	2	3	4
průtok zmlžovacího plynu (arb)	80,0	80,0	90,0	80,0
sprejovací napětí (kV)	5,0	5,0	4,5	4,5
teplota vstupní kapiláry (°C)	200,0	190,0	190,0	190,0
napětí na vstupní kapiláře (V)	-15,0	-15,0	-15,0	-15,0
intenzita signálu m/z 194,9	$4,60 \cdot 10^3$			
intenzita signálu m/z 307,1		$4,70 \cdot 10^3$	$5,18 \cdot 10^3$	$5,21 \cdot 10^3$

Změna parametrů přístroje neovlivnila zásadním způsobem absolutní intenzitu základního iontu, ale byla pozorována změna relativního zastoupení iontů ve spektru. Se snížením teploty klesá relativní intenzita fragmentu m/z 194,9 a roste pro ion m/z 307,1.

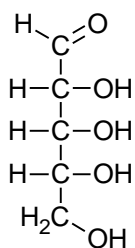


Obr. 4 - Spektrum ribulosity při podmínkách číslo 1. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.



Obr. 5 - Spektrum ribulosity při podmínkách číslo 4. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

4. 1. 2 Ribosa

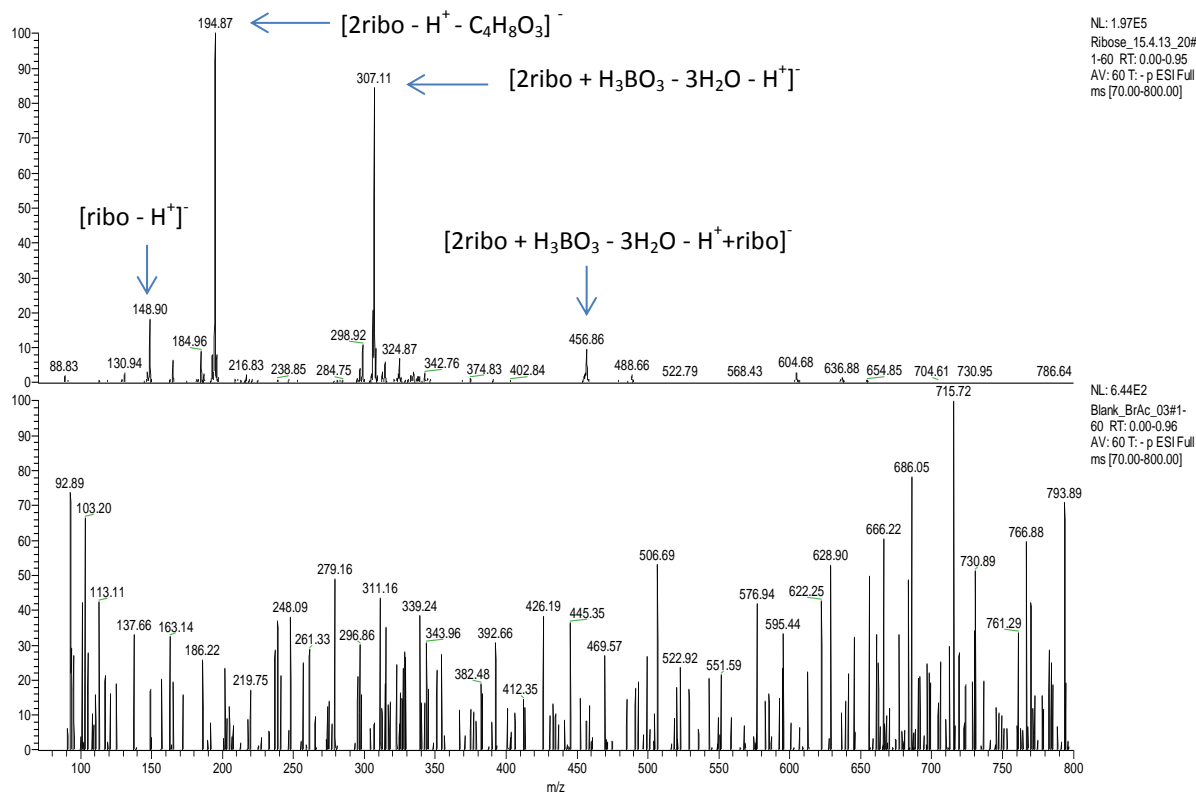


Monosacharid ribosa má monoizotopickou molekulovou hmotnost 150,0528. Nejintenzivnější signál byl pozorován pro ion m/z 194,9, tři menší píky se ve spektru vyskytovaly při m/z 148,9 a 307,1 a 456,9 (Obr. 6). Testované nastavení přístroje je přehledně uvedeno v tabulce II.

Tab. II: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro ribosu

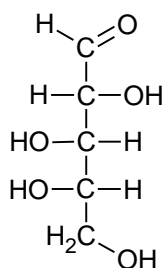
číslo měření	1	2
průtok zmlžovacího plynu (arb)	50,0	75
sprejovací napětí (kV)	5,0	5,0
teplota vstupní kapiláry (°C)	200,0	200,0
napětí na vstupní kapiláře (V)	-15,0	-15,0
intenzita signálu m/z 194,9	$5,71 \cdot 10^5$	$1,97 \cdot 10^5$

Změna parametrů přístroje neovlivnila zásadním způsobem absolutní intenzitu základního iontu, ale byla opět pozorována změna relativního zastoupení iontů ve spektru, podobně jako tomu bylo u ribulosu.



Obr. 6 - Spektrum ribosy při podmínkách číslo 2. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

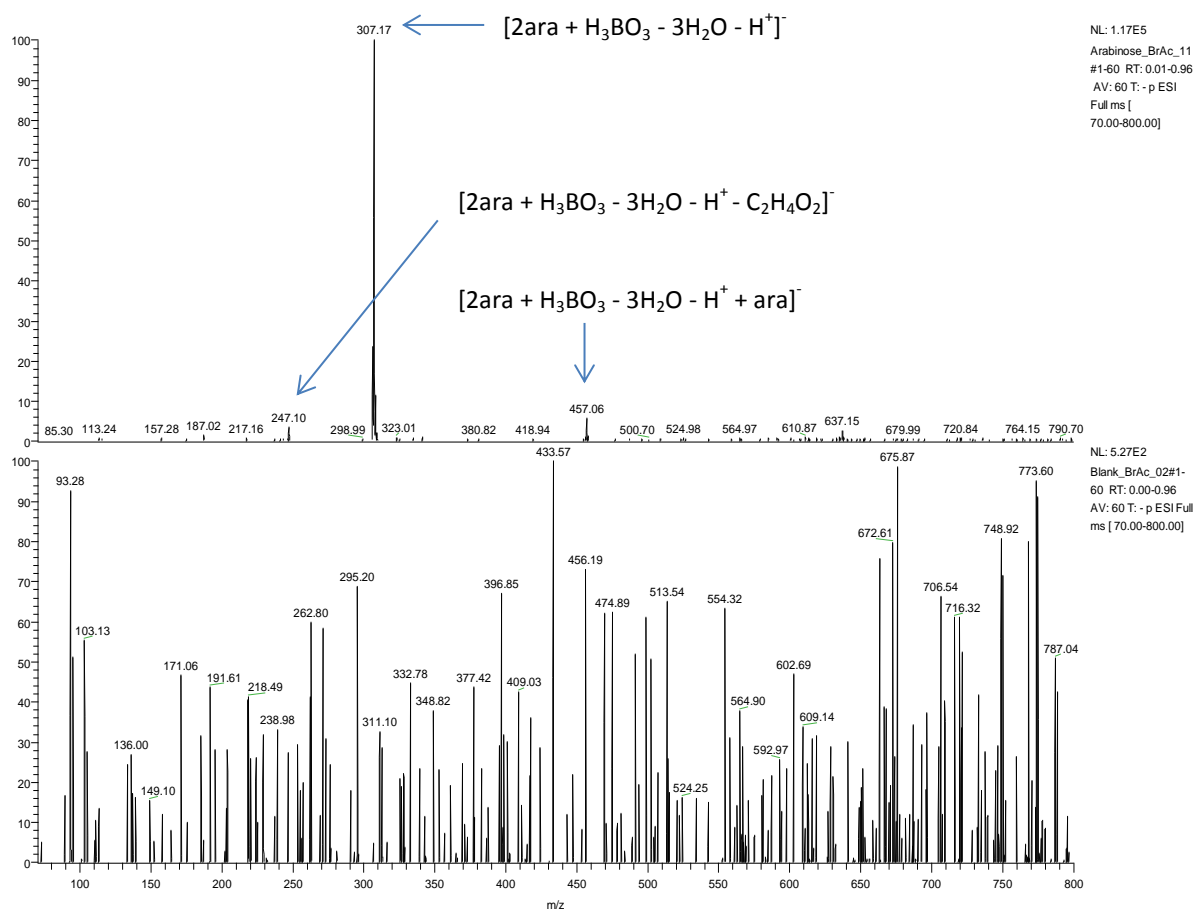
4. 1. 3 Arabinosa



Monosacharid arabinosa má monoizotopickou molekulovou hmotnost 150,0528. Nejintenzivnější signál byl pozorován pro ion m/z 307,2, dva menší píky se ve spektru vyskytovaly při m/z 247,1 a 457,1 (Obr. 7). Nastavení přístroje je uvedeno v tabulce III. Dobré intenzity signálu se podařilo dosáhnout hned při prvním nastavení přístroje, proto je uvedena jen jedna série parametrů.

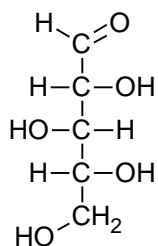
Tab. III: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro arabinosu

číslo měření	1
průtok zmlžovacího plynu (arb)	80,0
sprejovací napětí (kV)	3,0
teplota vstupní kapiláry (°C)	170,0
napětí na vstupní kapiláře (V)	-10,0
intenzita signálu m/z 307,2	$1,17 \cdot 10^5$



Obr. 7 - Spektrum arabinosy. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

4. 1. 4 Xylosa

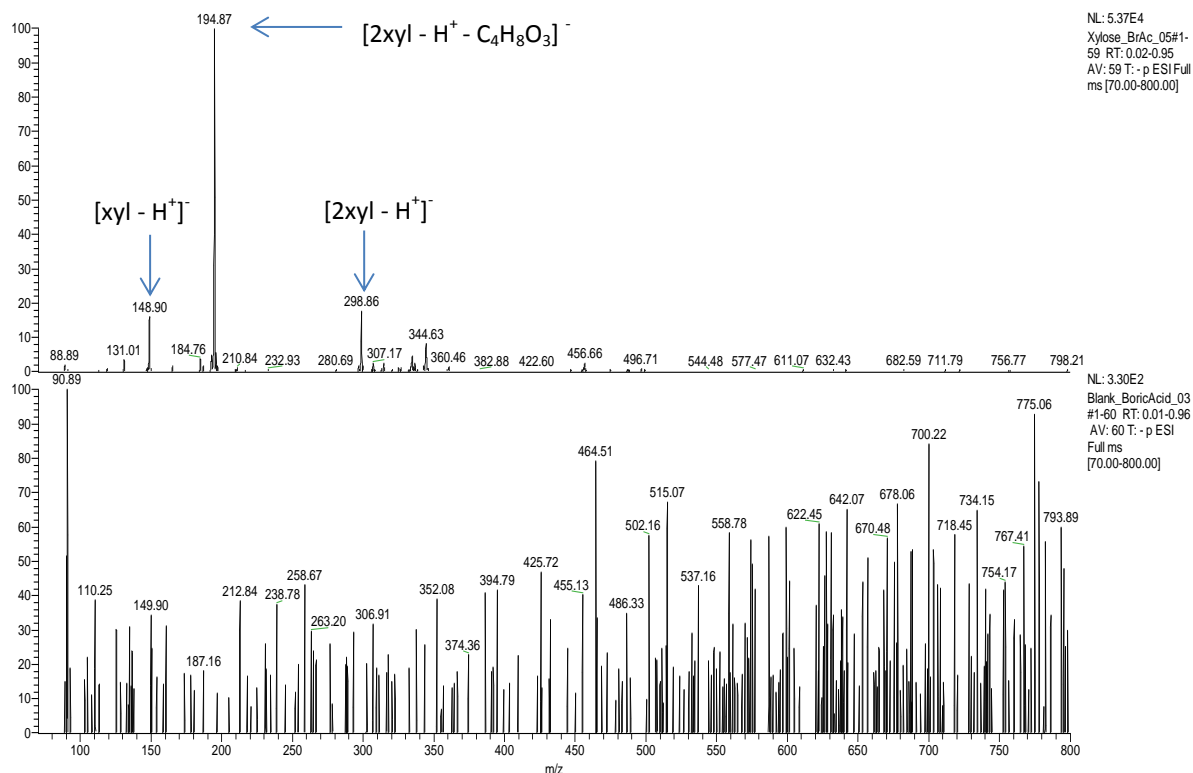


Monosacharid xylosa má monoizotopickou molekulovou hmotnost 150,0528. Nejintenzivnější signál byl pozorován pro ion m/z 194,9, dva menší píky se ve spektru vyskytovaly při m/z 148,9 a 298,9 (Obr. 8). Xylosa s kyselinou trihydrogenboritou neposkytla pozorovatelné produkty. Testované nastavení přístroje je přehledně uvedeno v tabulce IV.

Tab. IV: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro xylosu

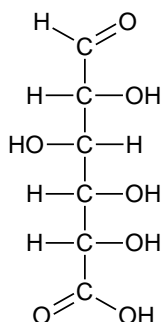
číslo měření	1	2	3	4	5	6
průtok zmlžovacího plynu (arb)	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
sprejovací napětí (kV)	5,0	5,0	4,0	4,5	4,5	4,5
teplota vstupní kapiláry (°C)	200,0	170,0	180,0	195,0	190,0	180,0
napětí na vstupní kapiláře (V)	-15,0	-15,0	-15,0	-15,0	-15,0	-15,0
intenzita signálu m/z 194,9	$4,1 \cdot 10^4$	$3,92 \cdot 10^4$	$3,38 \cdot 10^4$	$4,43 \cdot 10^4$	$3,97 \cdot 10^4$	$5,37 \cdot 10^4$

Změna parametrů přístroje neovlivnila zásadním způsobem absolutní intenzitu základního iontu, ani nebyla pozorována změna relativního zastoupení iontů ve spektru.



Obr. 8 - Spektrum xylosy při podmínkách číslo 6. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

4. 1. 5 Glukuronová kyselina



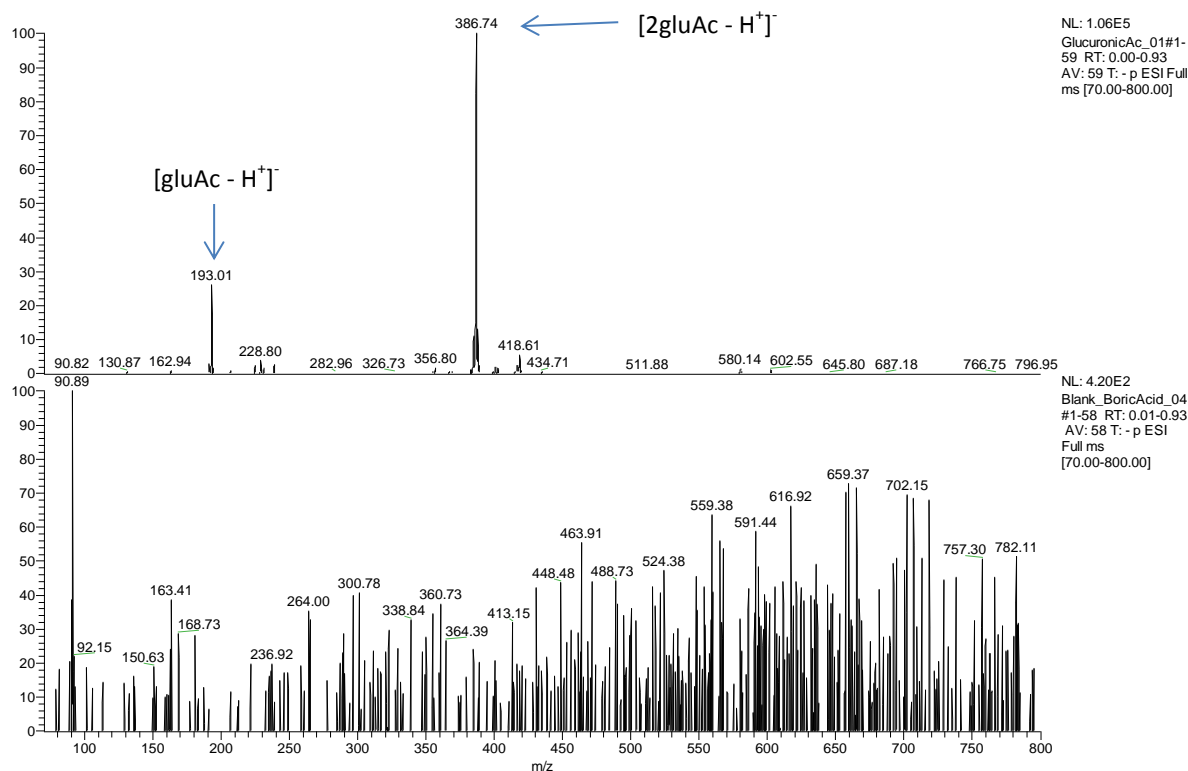
Glukuronová kyselina má monoizotopickou molekulovou hmotnost 194,0427. Nejintenzivnější signál byl pozorován pro ion m/z 386,7, menší pík se ve spektru vyskytoval při m/z 193,0 (Obr. 9).

Glukuronová kyselina s kyselinou trihydrogenboritou nereaguje (nebyl pozorován patřičný signál). Testované nastavení přístroje je přehledně uvedeno v tabulce V.

Tab. V: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro glukuronovou kyselinu

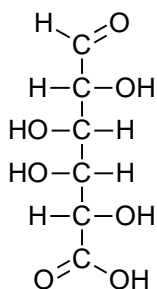
číslo měření	1	2	3	4
průtok zmlžovacího plynu (arb)	70,0	75,0	75,0	75,0
sprejovací napětí (kV)	5,0	4,5	4,5	4,5
teplota vstupní kapiláry (°C)	190,0	180,0	200,0	190,0
napětí na vstupní kapiláře (V)	-15,0	-15,0	-15,0	-15,0
intenzita signálu m/z 386,7	$7,20 \cdot 10^4$	$6,21 \cdot 10^4$	$5,25 \cdot 10^4$	$1,06 \cdot 10^5$

Změna parametrů přístroje neovlivnila zásadním způsobem absolutní intenzitu základního iontu, ani nebyla pozorována změna relativního zastoupení iontů ve spektru.



Obr. 9 - Spektrum glukuronové kyseliny při podmínkách číslo 4. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

4. 1. 6 Galakturonová kyselina



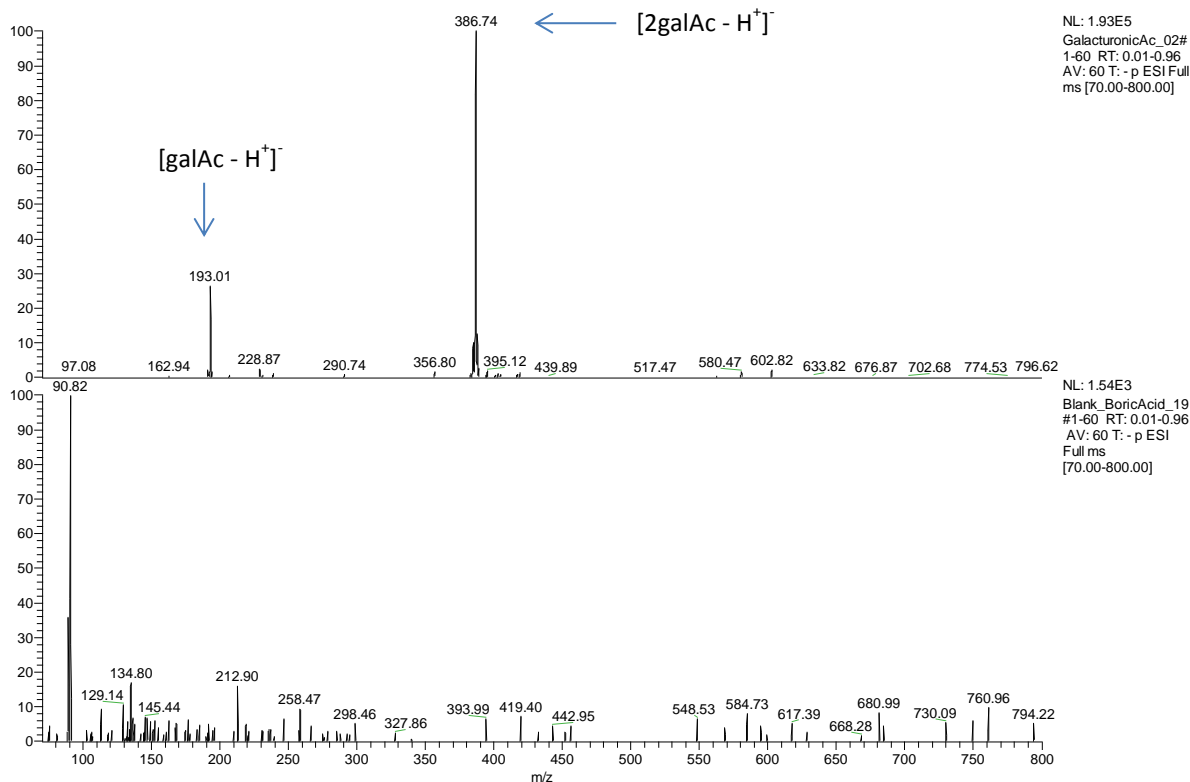
Galakturonová kyselina má monoizotopickou molekulovou hmotnost 194,0427. Nejintenzivnější signál byl pozorován pro ion m/z 386,7, menší pík se ve spektru vyskytoval při m/z 193,0 (Obr. 10).

Galakturonová kyselina s kyselinou trihydrogenboritou opět nereaguje (rovněž nebyl pozorován patřičný signál). Testované nastavení přístroje Je přehledně uvedeno v tabulce VI.

Tab. VI: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro galakturonovou kyselinu

číslo měření	1	2	3
průtok zmlžovacího plynu (arb)	60,0	75,0	75,0
sprejovací napětí (kV)	4,0	4,5	4,0
teplota vstupní kapiláry (°C)	200,0	200,0	200,0
napětí na vstupní kapiláře (V)	-15,0	-15,0	-15,0
intenzita signálu m/z 386,7	$3,98 \cdot 10^4$	$1,17 \cdot 10^5$	$1,93 \cdot 10^5$

Změna parametrů přístroje neovlivnila zásadním způsobem absolutní intenzitu základního iontu, ani nebyla pozorována změna relativního zastoupení iontů ve spektru.



Obr. 10 - Spektrum galakturonové kyseliny při podmínkách číslo 3. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat problematiku padělání uměleckých děl, nahlédnout do způsobů padělání ať už obrazů, fresek, soch nebo rytin a shrnout různé způsoby odhalování těchto falzifikátů. Hluběji je zde rozebrána analýza pomocí analytické chemie, přes spektrální a elektrochemické metody až k separačním technikám. Významné postavení v této oblasti zaujímá kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie, jež jsou hlavním předmětem zájmu této práce.

Je zřejmé, že diskutované techniky mají značný význam při odhalování nejrůznějších detailů uměleckého díla, které mohou potvrdit či vyvrátit jeho pravost (např. analýza vzorků pigmentů z různých vrstev). Jednou z možností, jak odhalit falzifikát je například analýza organických barviv (logwood, fuchsin atd.) z textilních vzorků. Na základě chemického složení barviva může být určeno období, ve kterém zkoumaný předmět vznikl a tím odhalen padělek.³³

Hmotnostní spektrometrii s ionizací elektrosprejem byly analyzovány standardy čtyř monosacharidů a dvou kyselin. K přípravě vzorků byl použit roztok kyseliny trihydrogenborité pH 9,25. Kyselina trihydrogenboritá byla zvolena za účelem zlepšení ionizace a možnosti odlišit různé látky dle jejich reaktivity s ní. Koncentrace roztoku kyseliny byla 10 krát menší než koncentrace analytů. To dovolilo ve spektrech pozorovat ionty jak samotných analytů, tak analytů po reakci s kyselinou trihydrogenboritou. Ve spektrech byl pozorován signál při m/z 307, který odpovídá produktu reakce dvou molekul monosacharidu s jednou molekulou kyseliny trihydrogenborité.

Přítomnost boru ve struktuře iontu byla potvrzena izotopickým píkem s relativní intenzitou okolo 25 %, nacházejícím se o $\Delta m/z=1$ před dominantním iontem produktu reakce. Signál souvisí s přítomností lehčího izotopu boru ^{10}B . Další významné ionty (m/z 148,9 a 194,9) byly přisouzeny nemodifikovanému sacharidu. Přítomnost či nepřítomnost eventuálně poměr signálů zmíněných iontů dovoluje odlišit jednotlivé látky.

Ion m/z 307 nebyl přítomen u cukrů nereagujících s kyselinou trihydrogenboritou, ani u alduronových kyselin. Spektrum kyselin bylo navíc téměř totožné. K jejich odlišení by muselo být využito separace, například kapalinovou chromatografií.

Dosažené výsledky mohou být východiskem dalšího výzkumu zaměřeného na širší pojetí analýzy monosacharidů, od identifikace monosacharidů ve směsi, přes rozbor a určení druhu rostlinné pryskyřice až po analýzu složité směsi pojidel.

6. LITERATURA

1. Musil J., Konrád Z., Suchánek J.: *Kriminalistika*. C. H. Beck, Praha 2004.
2. Šimovček I. a kol.: *Kriminalistika*. Iura Edition, Bratislava 2001.
3. Grössl M. a kol.: *J. Chromatogr. A* **1077**, 80-89 (2005).
4. Otto J.: *Ottův Slovník naučný, illustrovaná encyklopedie obecných vědomostí*, Praha (1907) / *Ottův slovník naučný, svazek 26 (Umělé údy - Umění)*, str. 170, heslo Umění.
5. <http://svetvedy.cz/padelatele-budou-mit-smulu/>, 18. 10. 2012
6. Arnau F.: *Umění padělatelů, padělatelé umění, tři tisíce let podvodů se starožitnostmi*. Orbis, Praha 1973.
7. <http://bizzzone.vodafone.cz/cs/tema/polovina-obrazu-jsou-padelky-54.shtml>, 18. 10. 2012
8. <http://www.ceskatelevize.cz/porady/10121359557-port/tema/637-odhalovani-padelku/>, 18. 10. 2012
9. <http://www.technologiaartis.org/1vse-studie-histor.html>, 13. 10. 2012
10. Breek R., Froentjes W.: *Stud. Conserv.* **20**, 183-189 (1975).
11. Ho M. H.: *Analytical Methods in Forensic Chemistry*, E. Horwood, New York 1990.
12. Rowe M. W.: *Anal. Chem.* **81**, 1728-1735 (2009).
13. Weiss R. J., Chartier D. R., McCrone W. C.: *Scientific detection of fakery in art*. Bellingham, Wash., USA 1998.
14. <http://www.lrm.cz/cz-rfa.html>, 18. 10. 2012
15. Nuevo M. J. a kol.: *X-Ray Spectrom.* **41**, 1-5 (2012).
16. Manso M. a kol.: *Spectrochim. Acta, Part B* **65**, 321-327 (2010).
17. Pessanha S. a kol.: *J. Raman Spectrosc.* **41**, 1510-1516 (2010).
18. Wang X.-F. a kol.: *Spectrochim. Acta, Part A* **97**, 986-994 (2012).
19. Fremout W. a kol.: *J. Raman Spectrosc.* **37**, 1035-1045 (2006).
20. Castillejo M. a kol.: *Lasers in the conservation of artworks*. Crc press, USA 2007
21. Doménech-Carbó A.: *J. Solid State Electrochem.* **14**, 363-379 (2010).
22. Baumer U., Dietemann P.: *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 1363-1376 (2010).
23. Bersani D. a kol.: *J. Cult. Herit.* **9**, 97-102 (2008).
24. van Keulen H.: *Int. J. of Mass Spectrom.* **284**, 162-169 (2009).

25. Colombini M. P. a kol.: *Microchem. J.* **67**, 385-396 (2000).
26. Bonaduce I. a kol.: *J. Chromatogr. A* **1175**, 275–282 (2007).
27. Cruces-Blanco C., Ga´miz–Gracia L., Garcı´a -Campaña A . M.: *Trends Anal. Chem.* **26**, 215-226 (2007).
28. Klouda P.: *Modernı´ analytické metody*. Ostrava 2003.
29. Maguregui M. I. a kol.: *J. Chromatogr. A* **1154**, 429–436 (2007).
30. Forgacs E., Cserhati T.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **25**, 1521-1541 (2002)
31. Degano I. a kol.: *J. Cult. Herit.* **12**, 295–299 (2011).
32. Peris-Vicente J. a kol.: *Talanta* **68**, 1648–1654 (2006).
33. Mantzouris D. a kol.: *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 3065–3079 (2011)
34. Lech K ., Jarosz M .: *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 3241–3251 (2011)
35. Pawlak K. a kol.: *J. Mass Spectrom.* **41**, 613-622 (2006)
36. Puchalska M. a kol.: *J. Mass Spectrom.* **39**, 1441–1449 (2004)
37. Rosenberg E.: *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 33–57 (2008)
38. Valianou L. a kol.: *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 2175-2189 (2009)
39. Orska-Gawry´s J. a kol.: *J. Chromatogr. A* **989**, 239–248 (2003)
40. Petroviciu I. a kol.: *J. Cult. Herit.* **13**, 89–97 (2012)
41. Petroviciu I. a kol.: *Microchem. J.* **95**, 247–254 (2010)
42. Zangrando R. a kol.: *Anal. Chim. Acta* **675**, 1 –7 (2010)
43. Fremout W. a kol.: *Anal. Chim. Acta* **658**, 156–162 (2010)
44. Green R. L., Walting R. J.: *J. Forensic Sci.* **52**, 851-859 (2007).
45. Kučková Š., Hynek R., Němec I., Kodiček M., Jehlička J.: *Surf. Interface Anal.* **44**, 963–967 (2012).
46. L. J. Soltzberg a kol.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 2001–2006 (2007).
47. Brighid P. a kol.: *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. Chuan-Fa Chang, 2012.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Ara - arabinosa

CE - kapilární elektroforéza

DAD - detektor diodového pole

EDXRF - energeticky disperzní rentgenová fluorescence

ESI⁻ - ionizace elektrosprejem v negativním módu

ESI⁺ - ionizace elektrosprejem v pozitivním módu

FLD - fluorescenční detektor

FTIR - infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Fuc - fukosa

Gal - galaktosa

GalAc - galakturonová kyselina

GC - plynová chromatografie

Glu - glukosa

GluAc - glukuronová kyselina

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICP - indukčně vázané plazma

IR - infračervená oblast

LA - laserová ablace

LC - kapalinová chromatografie

LDI - laserová desorpce/ionizace

MALDI - laserová desorpce/ionizace za asistence matrice

Man - manosa

MEKC - micelární elektrokinetická chromatografie

MRS - mikro Ramanova spektroskopie

MS - hmotnostní spektrometrie

MS/MS - tandemová hmotnostní spektrometrie

OCT - optická koherentní tomografie

PC - papírová chromatografie

PGC - pyrolýzní plynová chromatografie

PIGE - parafinem impregnované grafitové elektrody

Rham - rhamnosa

RP-HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází

TFA - trifluoroctová kyselina

TLC - chromatografie na tenké vrstvě

TOF - průletový analyzátor

UV - ultrafialová oblast

UV-VIS - viditelná a ultrafialová oblast

VMP - voltametrie mikročastic

XRD - rentgenová difrakce

XRF - rentgenová fluorescenční spektroskopie

Xyl - xylosa

7. 1 Seznam obrázků

Obr. 1 - Hmotnostní spektrometr

Obr. 2 - Reakce kyseliny trihydrogenborité s vicinálním diolem dvou monosacharidů.

Obr. 3 - Systém pro identifikaci rostlinných pryskyřic podle obsahu monosacharidů.

Obr. 4 - Spektrum ribulosy při podmínkách číslo 1. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

Obr. 5 - Spektrum ribulosy při podmínkách číslo 4. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

Obr. 6 - Spektrum ribosy při podmínkách číslo 2. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

Obr. 7 - Spektrum arabinosy. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

Obr. 8 - Spektrum xylosy při podmínkách číslo 6. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

Obr. 9 - Spektrum glukuronové kyseliny při podmínkách číslo 4. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

Obr. 10 - Spektrum galakturonové kyseliny při podmínkách číslo 3. Nahoře vzorek, dole slepý pokus.

7. 2 Seznam tabulek

Tab. I: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro ribulosu

Tab. II: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro ribosu

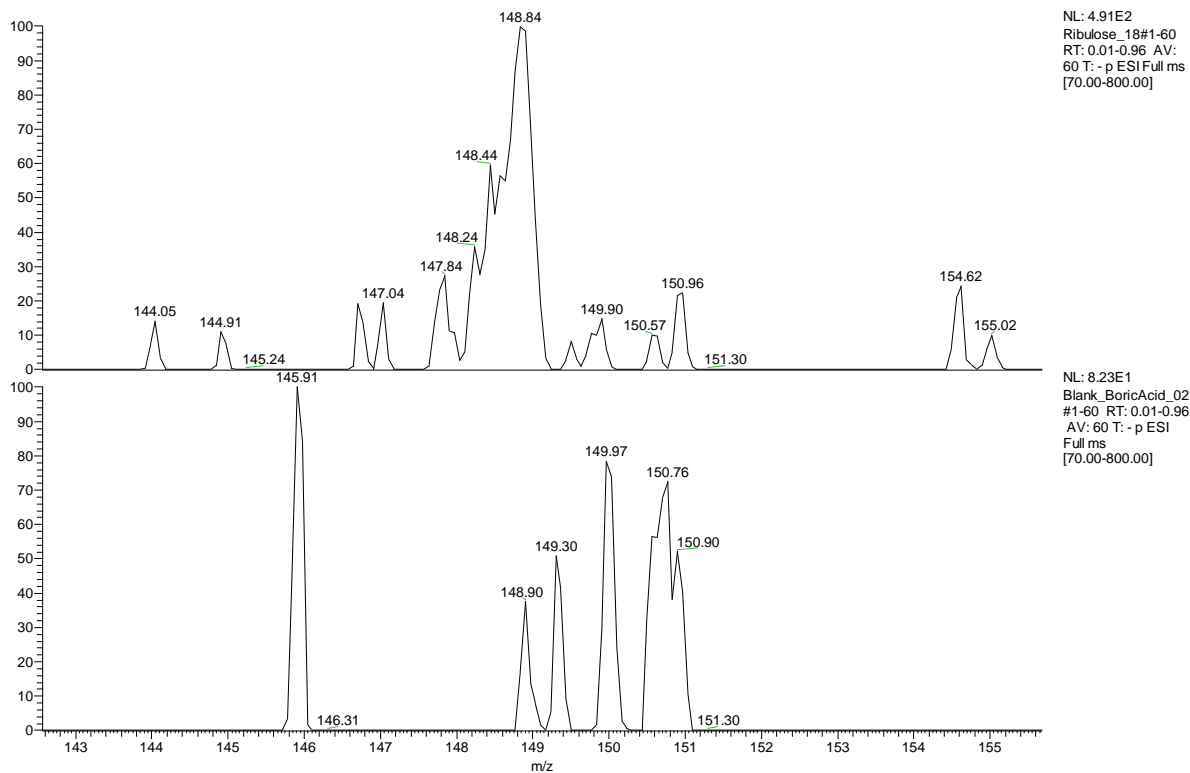
Tab. III: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro arabinosu

Tab. IV: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro xylosu

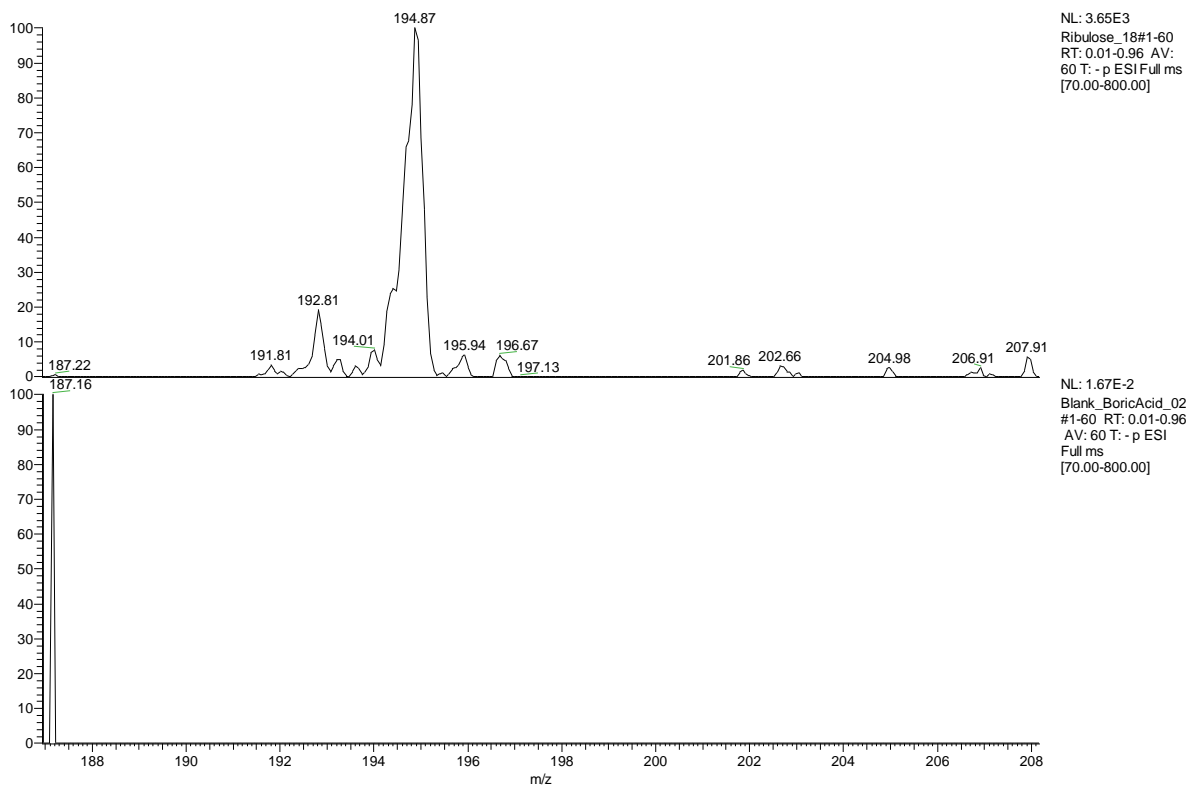
Tab. V: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro glukuronovou kyselinu

Tab. VI: Použité nastavení hmotnostního spektrometru pro galakturonovou kyselinu

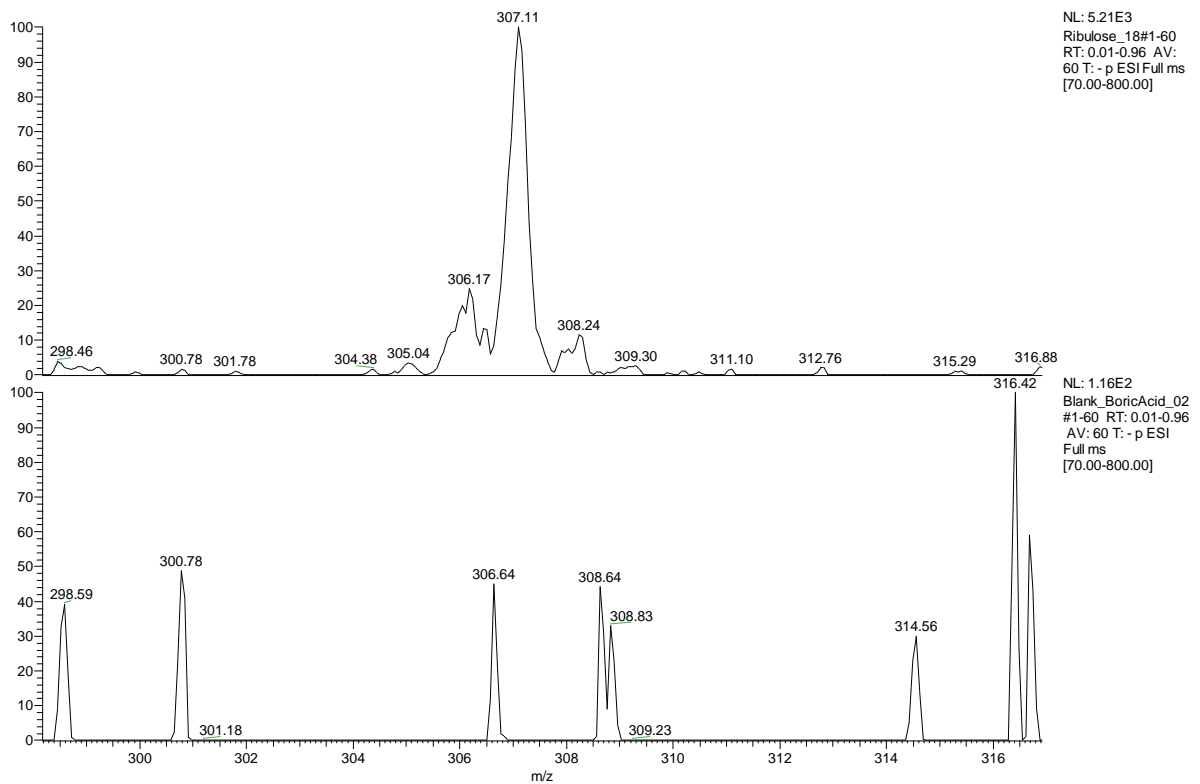
8. PŘÍLOHY



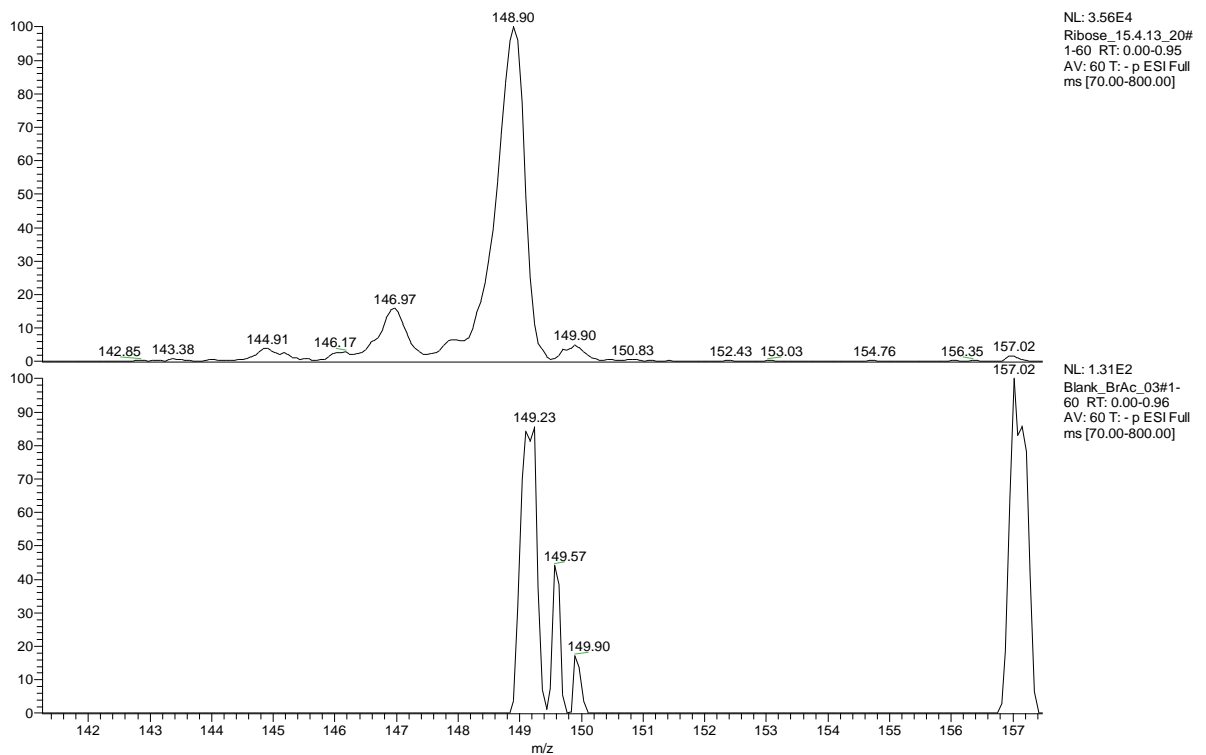
Příloha 1. ribulosa - detail spektra pro m/z 148,8.



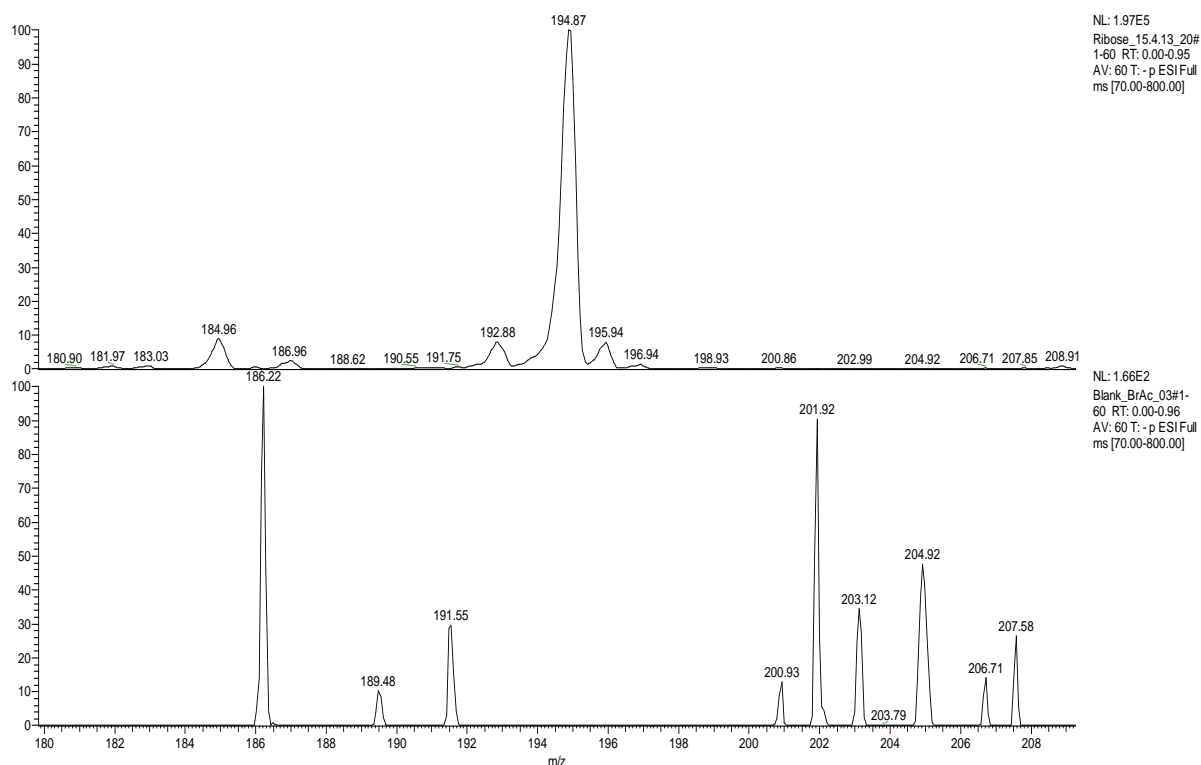
Příloha 2. ribulosa - detail spektra pro m/z 194,9.



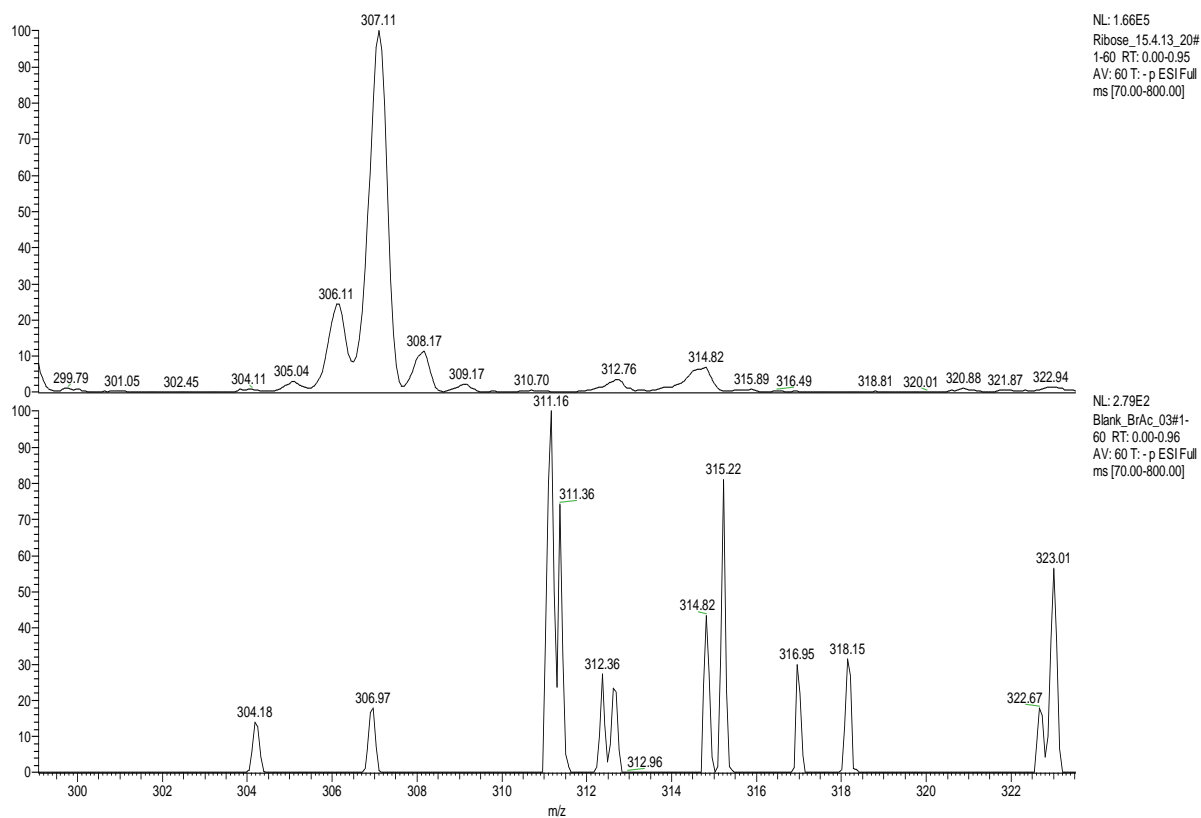
Příloha 3. ribulosa - detail spektra pro m/z 307,1. Signál při m/z 306 naznačuje možnou přítomnost izotopu boru ¹⁰B.



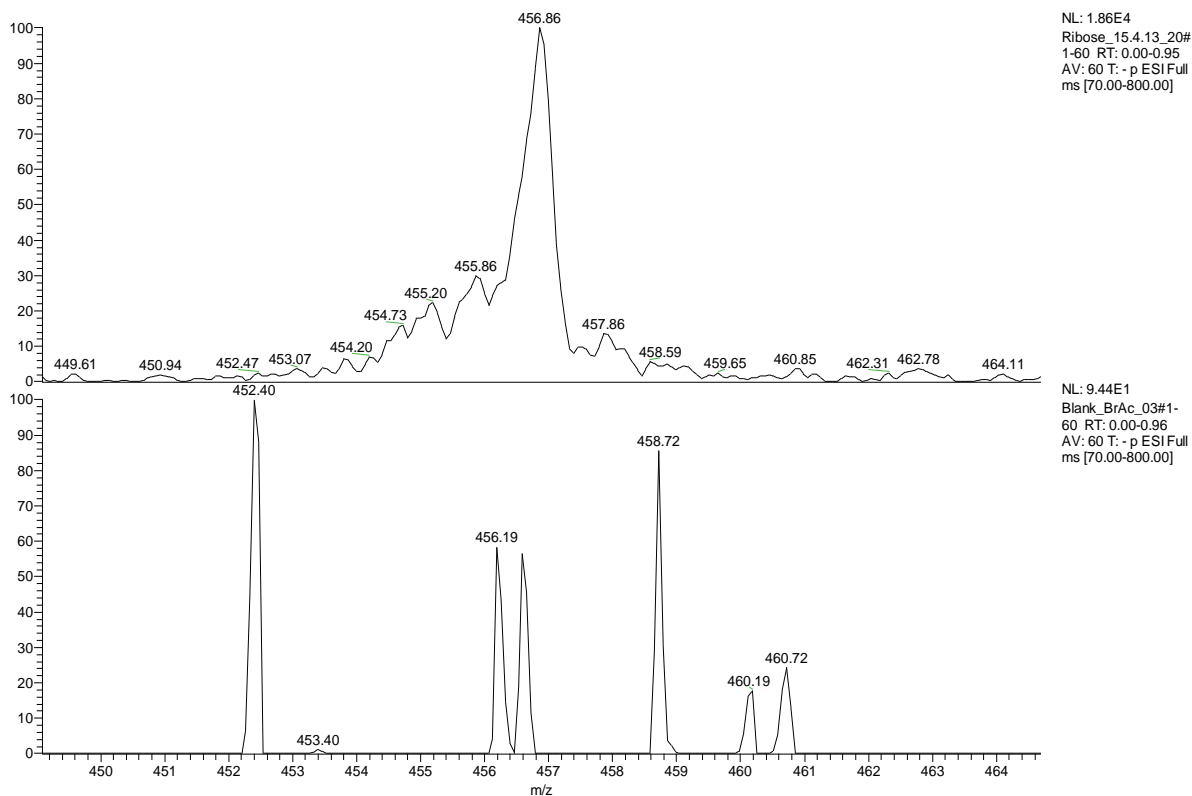
Příloha 4. ribosa - detail spektra pro m/z 148,9.



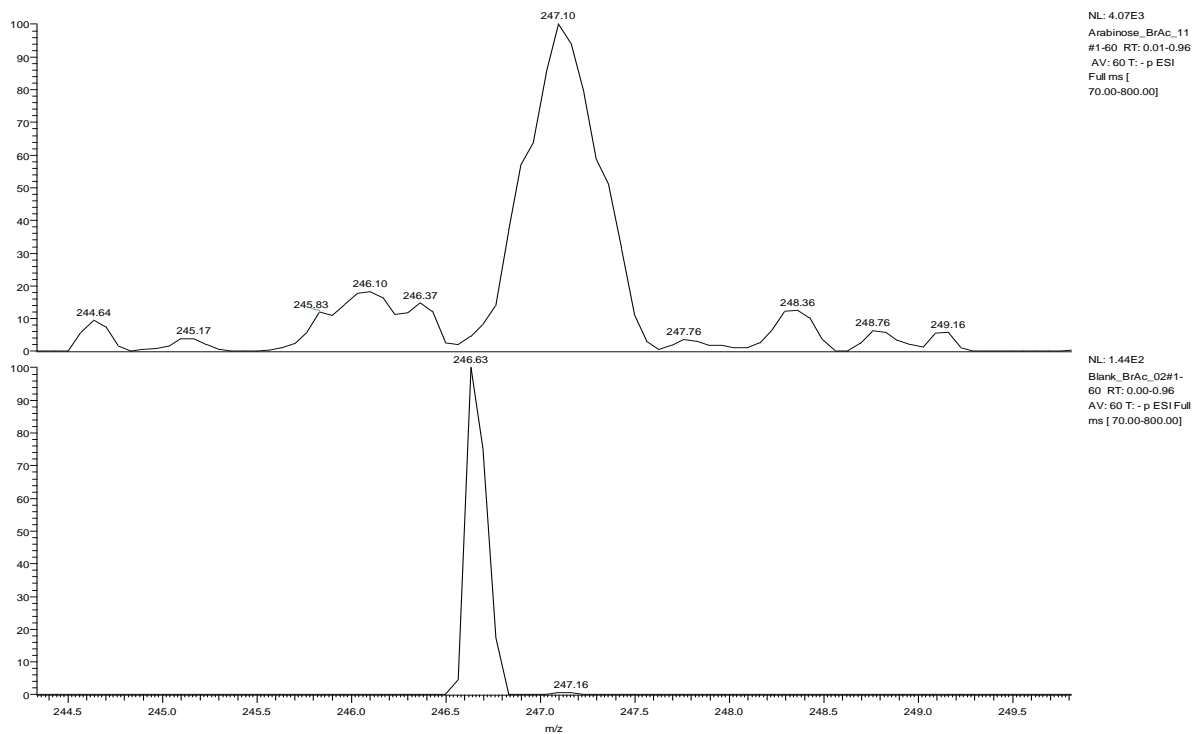
Příloha 5. ribosa - detail spektra pro m/z 194,9.



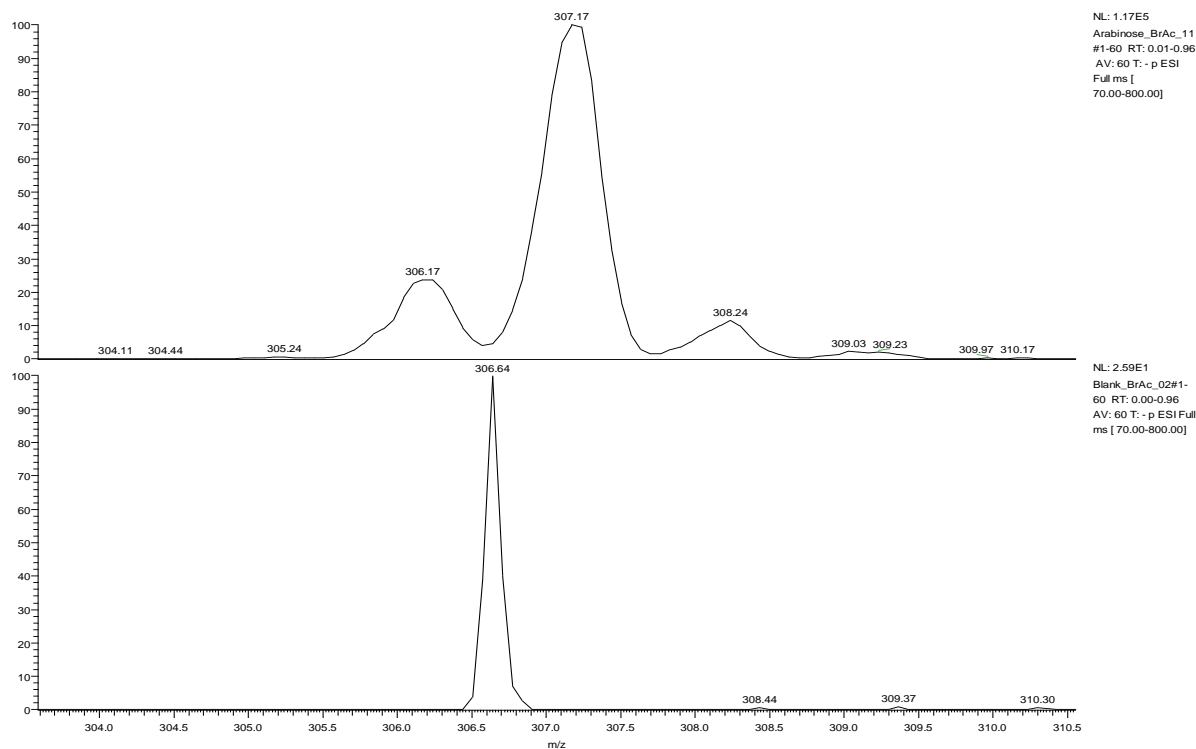
Příloha 6. ribosa - detail spektra pro m/z 307,1. Signál při m/z 306 naznačuje možnou přítomnost izotopu boru ^{10}B .



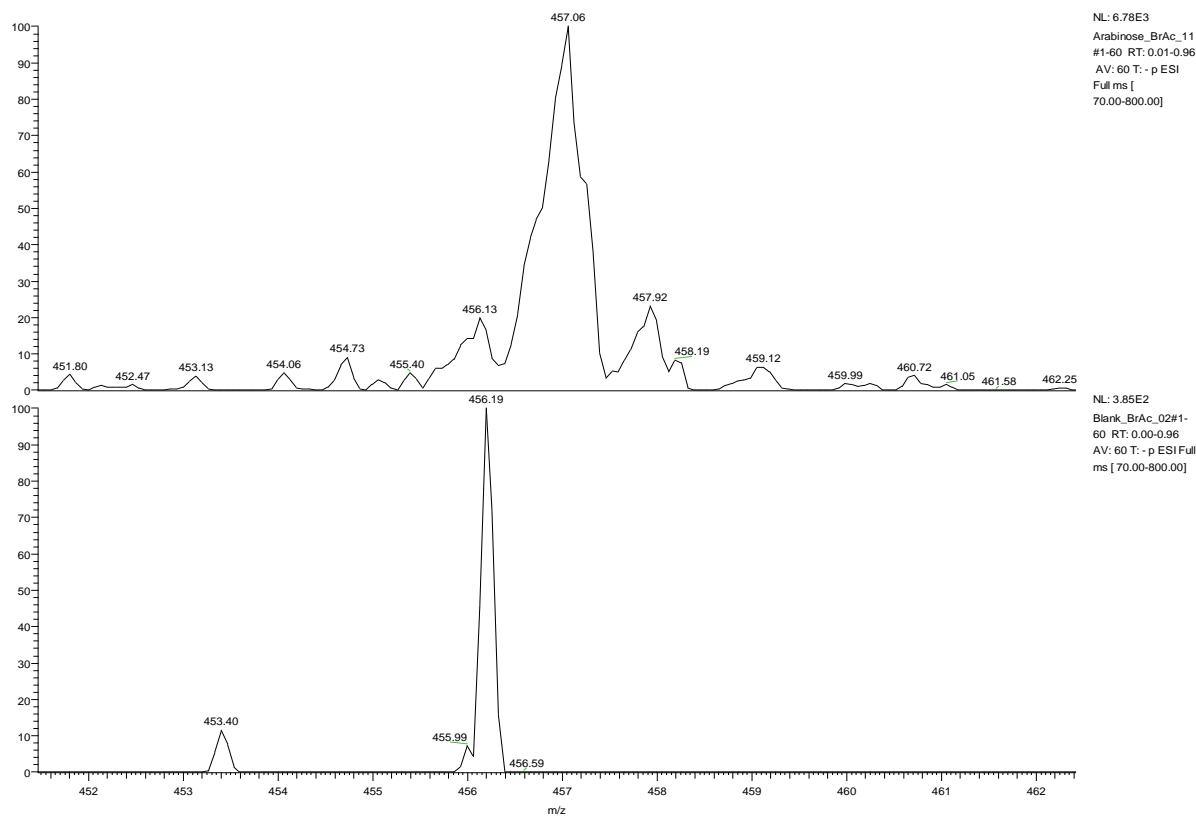
Příloha 7. ribosa - detail spektra pro m/z 456,9. Signál při m/z 455,9 naznačuje možnou přítomnost izotopu boru ^{10}B .



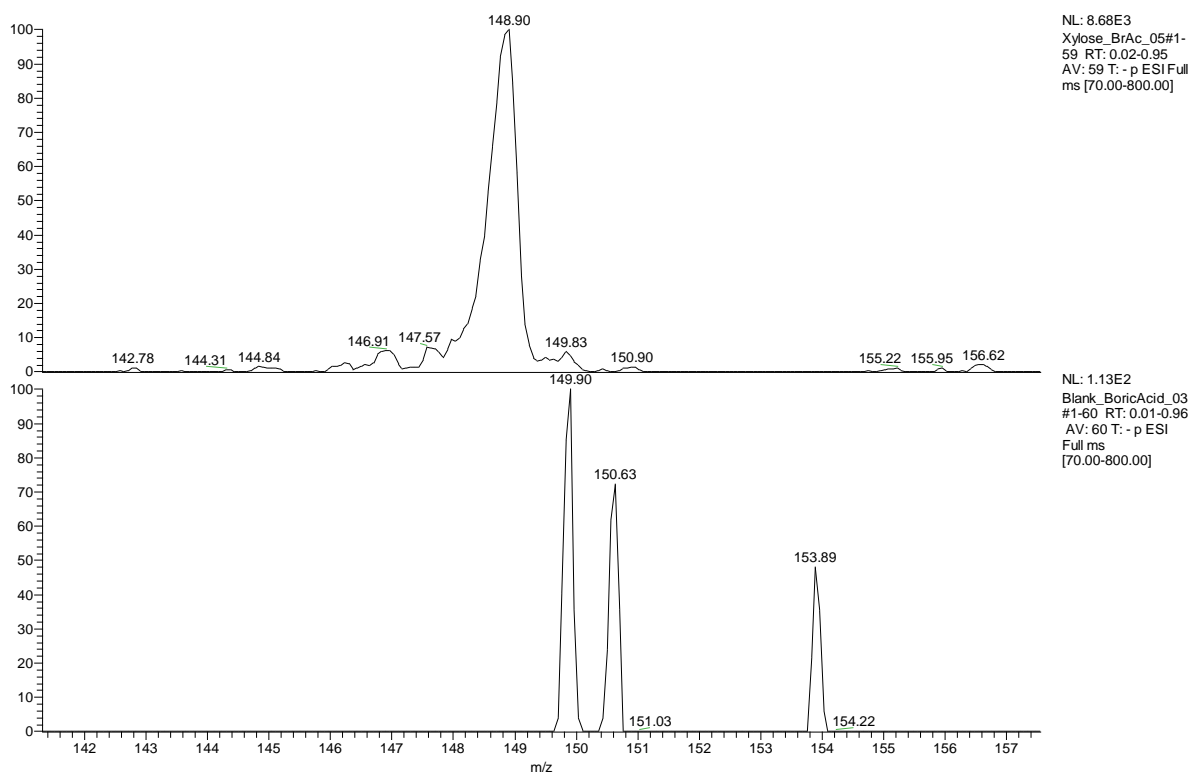
Příloha 8. arabinosa - detail spektra pro m/z 247,1. Signál při m/z 246 naznačuje možnou přítomnost izotopu boru ^{10}B .



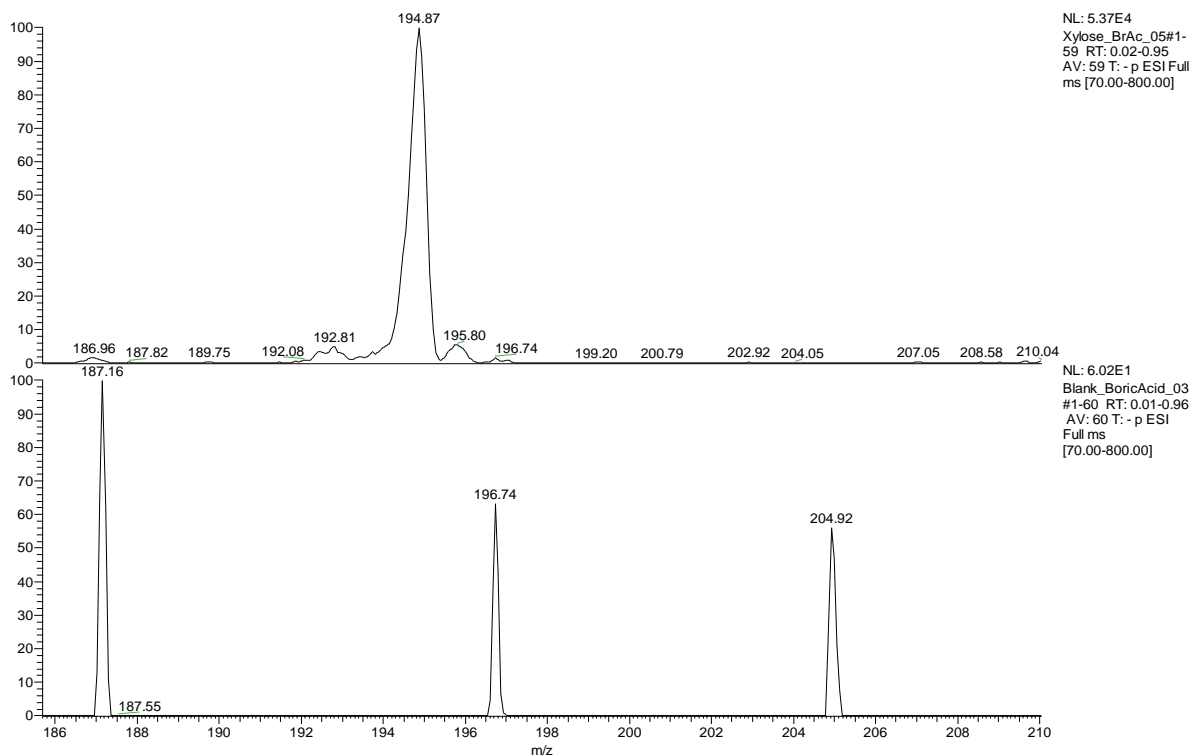
Příloha 9. arabinosa - detail spektra pro m/z 307,1. Signál při m/z 306 odpovídá iontům $s^{10}B$



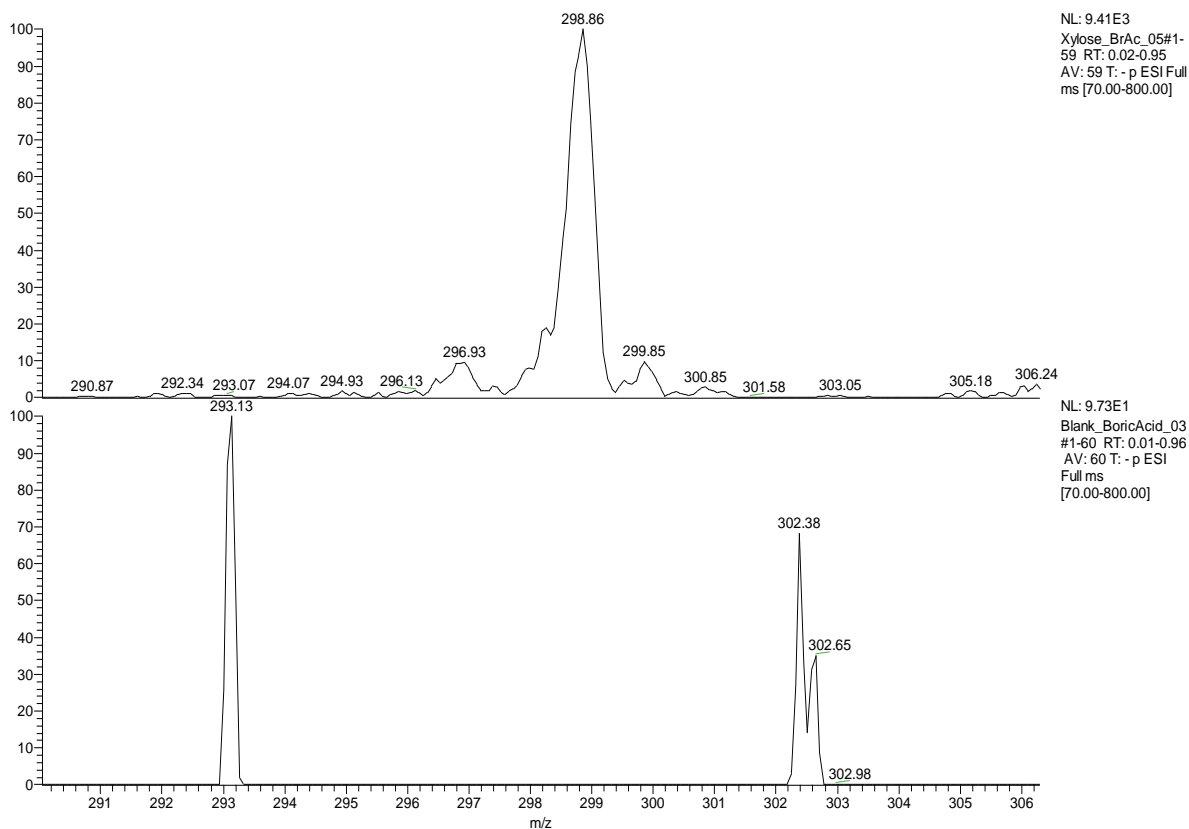
Příloha 10. arabinosa - detail spektra pro m/z 457,1.



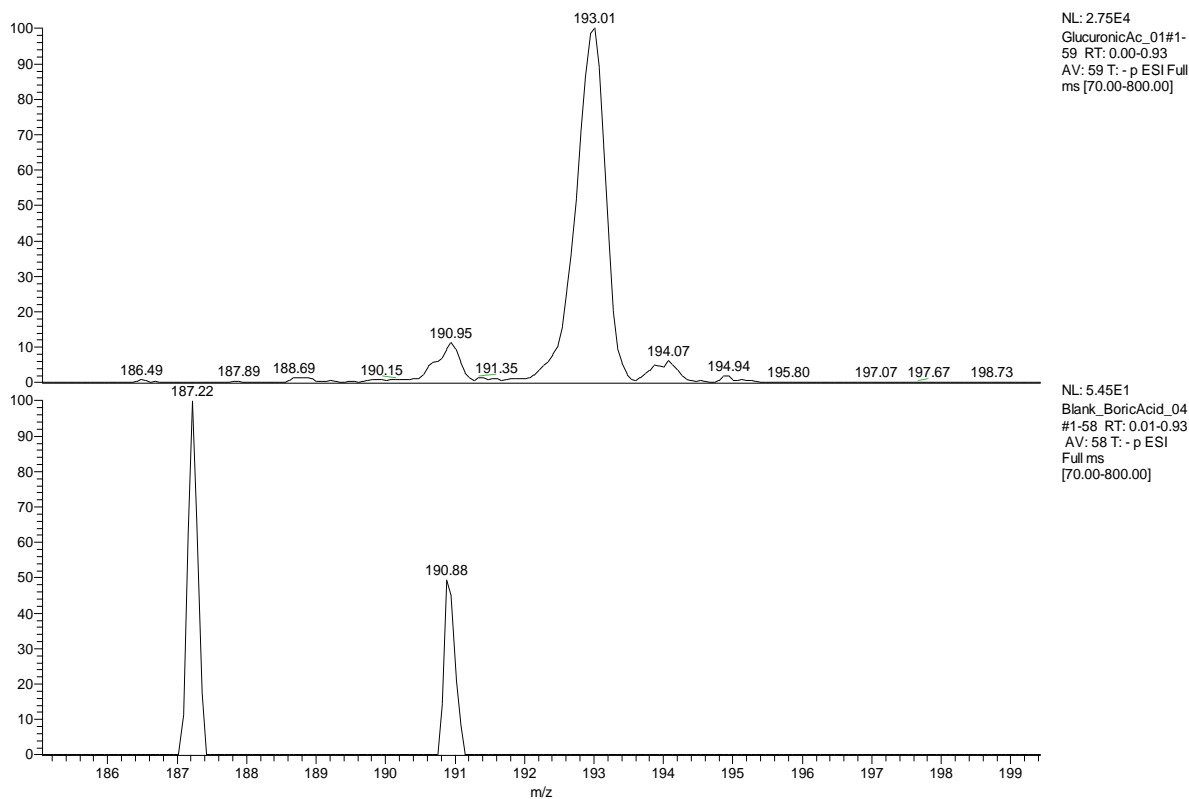
Příloha 11. xylosa - detail spektra pro m/z 148,9.



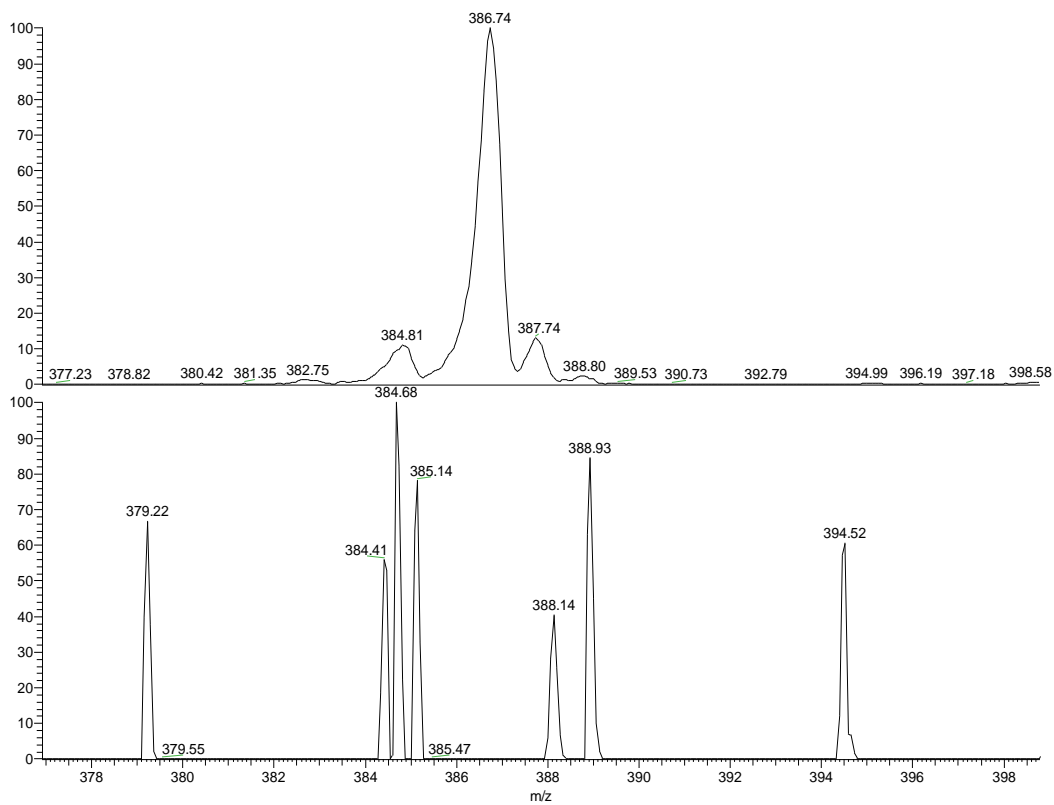
Příloha 12. xylosa - detail spektra pro m/z 194,9.



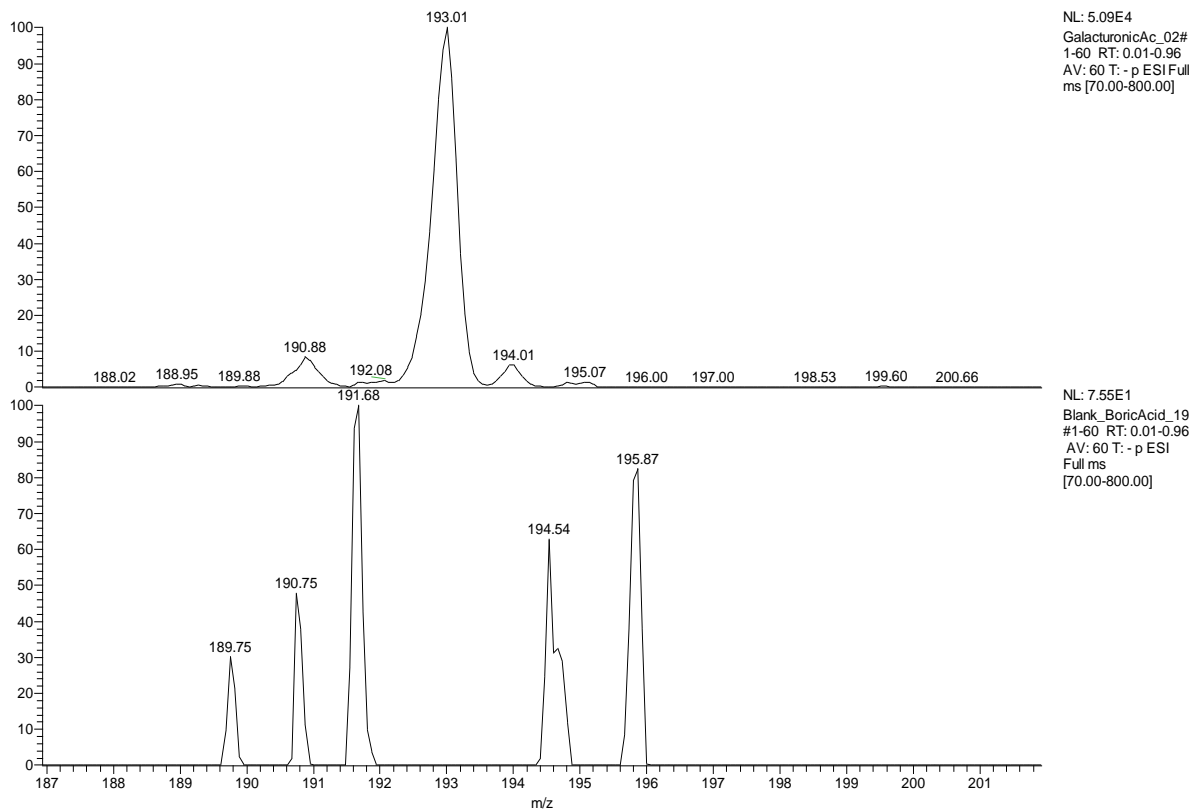
Příloha 13. xyloza - detail spektra pro m/z 298,9.



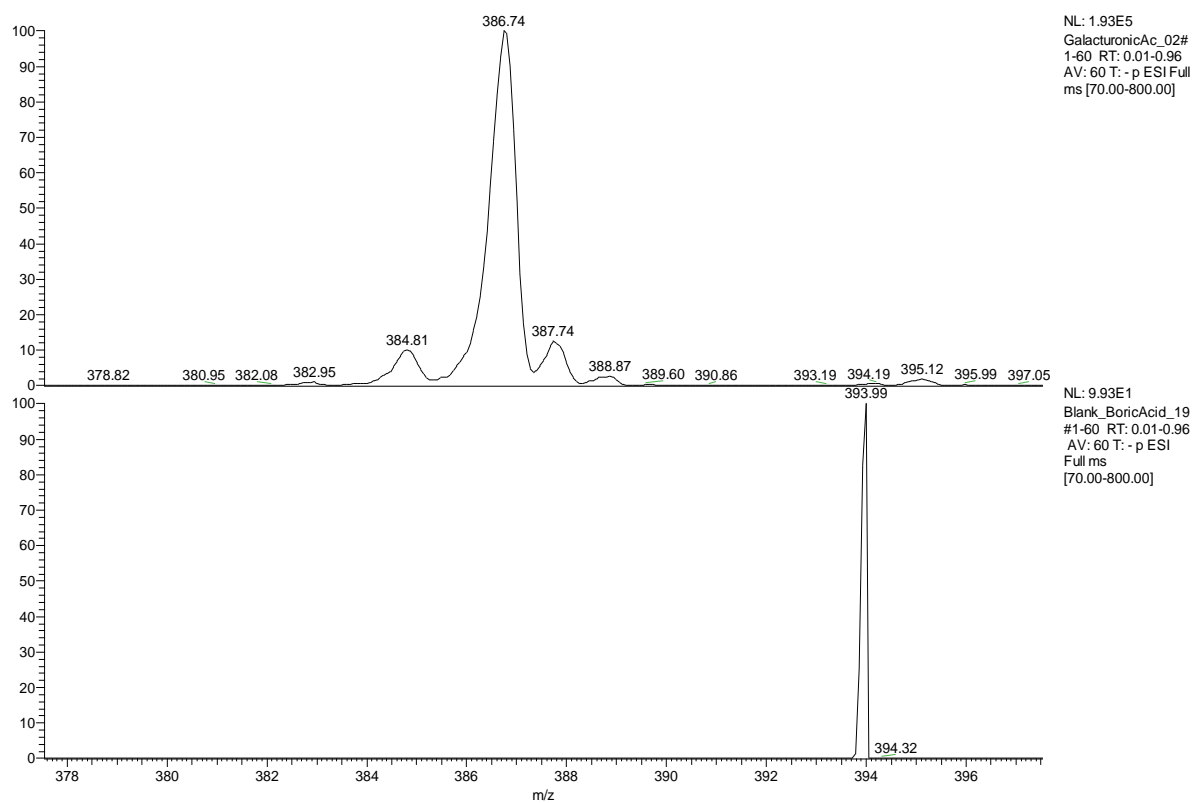
Příloha 14. glukuronová kys. - detail spektra pro m/z 193,0.



Příloha 15. glukuronová kys., detail spektra pro m/z 386,7.



Příloha 16. galakturonová kys. - detail spektra pro m/z 193,0.



Příloha 17. galakturonová kys. - detail spektra pro m/z 386,7.