

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Analýza organických poživ v uměleckých dílech

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Zdena Holubová

Studijní obor:

Chemie-Biologie

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

2021 Olomouc

Prohlášení:

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci

podpis

Tímto děkuji vedoucímu mé práce prof. RNDr. Karlu Lemrovi Ph.D. za vstřícný přístup, cenné rady a za čas, který mi během zpracování teoretické i experimentální části věnoval. Také bych chtěla bych poděkovat paní Haně Staškové za laskavý přístup, obětavost a pomoc při práci v laboratoři. Dále děkuji Mgr. Štěpánu Dostálovi a Mgr. Zbyňku Žingorovi za pomoc a užitečné rady při měření vzorků v experimentální části. Poděkování také patří mé rodině za velkou podporu během celého studia.

Poděkování za finanční podporu výzkumu patří projektu ERDF OA ITI - ARTECA (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378) Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a projektu IGA_PrF_2021_021 Univerzity Palackého v Olomouci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Zdena Holubová

Název práce: Analýza organických pojiv v uměleckých dílech

Typ práce: *bakalářská*

Pracoviště: *Katedra analytické chemie*

Vedoucí práce: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2021

Anotace:

V teoretické části práce je zpracován přehled organických pojiv používaných v uměleckých dílech. Přírodní pojiva se dělí podle chemického složení na sacharidová (med, rostlinné gummy, dextriny a škrob), proteinová (živočišné kůže, vaječný bílek, vaječný žloutek a kasein) a lipidová (oleje, vosky a pryskyřice). Dále je podán přehled mikrochemických reakcí, které lze použít na orientační důkaz pojiv různých skupin. V experimentální části se ověřovaly mikrochemické reakce pro všechny typy přírodních pojiv. Z možných reakcí byly vybrány a testovány důkazové reakce proteinů, a to reakce pyrrolových derivátů, důkaz dusíku a Biuretova reakce. U sacharidů se jednalo o Molishovu reakci, Bialovu reakci a důkaz škrobu. Lipidová pojiva se dokazovala reakcí na vysychavé oleje, vosky a Storch-Morawského reakcí. Reakce byly ověřeny na standardech pojiv, modelových vzorcích a na vzorcích, u kterých nebylo uvedeno složení a sloužily tak jako „neznámé“ (tempery, akvarely). Výsledky reakcí byly fotograficky zdokumentovány. Reakce modelových a „neznámých“ vzorků byly pro porovnání doplněny infračervenými spektry pořízenými technikou ATR. Mikrochemické reakce mohou v materiálové analýze uměleckých děl napomoci při volbě dalšího postupu analýzy, kdy vhodně zvolené instrumentální metody poskytují detailnější informace o složení pojiv. Reakce lze také použít ve středoškolské výuce.

Klíčová slova: analýza uměleckých děl, analýza pojiv, malba, mikrochemické reakce, chemická analýza, infračervená spektrometrie

Počet stran: 82

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Zdena Holubová

Title: Analysis of organic binders in works of art

Type of the thesis: *bachelor's*

Department: *Department of Analytical Chemistry*

Supervisor: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

The year of submission: 2021

Annotation:

The theoretical part of the bachelor's thesis offers an overview of organic binders used in works of art. Natural binders are classified according to their chemical composition into carbohydrates (honey, plant gums, dextrans, and starch), proteins (animal glues, egg white, egg yolk, and casein), and lipids (oils, waxes, and resins). Then, microchemical reactions that are used for the testing of binders of various groups are discussed. In the experimental part, microchemical reactions for all mentioned classes of natural binders were carried out. From applicable reactions, the following reactions were selected and tested, for proteins the reaction of pyrrole derivatives, the proof of nitrogen, and the Biuret reaction. For carbohydrates, Molisch's reaction, Bial's reaction, and starch proof were used. Lipid binders were detected by the reaction of drying oils, waxes, and Storch-Morawski reaction. These reactions were tested using binder standards, model samples, and "unknown" samples for which the composition was not provided (tempera, aquarelle). The results of the reactions were documented by photographs. ATR infrared spectra of model and "unknown" samples were acquired for comparison with the results of reactions. Microchemical reactions can be useful in material analysis works of art to support the selection of analytical procedures when the proper application of instrumental methods can provide detailed information about binder composition. The tested microchemical reactions can also be used in secondary school teaching.

Keywords: work of art analysis, painting, chemical analysis, binder analysis, microchemical reactions, infrared spectrometry

Number of pages: 82

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1	Umělecké dílo	11
2.2	Složení obrazu.....	11
2.3	Význam pojiv v malbě	12
2.4	Druhy organických pojiv.....	13
2.4.1	Sacharidová pojiva.....	13
2.4.2	Proteinová pojiva	18
2.4.3	Lipidová pojiva	20
2.5	Chemická analýza a odběr vzorku	27
2.6	Selektivní mikrochemické reakce	28
2.6.1	Důkazové reakce sacharidů	29
2.6.2	Důkazové reakce proteinů	30
2.6.3	Důkazové reakce lipidů	31
2.7	Instrumentální metody v analýze organických pojiv	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
3.1	Použité chemikálie	34
3.2	Použité analytické přístroje a metody	34
3.3	Pracovní postup.....	35
3.3.1	Příprava standardů sacharidových pojiv	35
3.3.2	Reakce sacharidových pojiv	35
3.3.3	Příprava standardů proteinových pojiv	36
3.3.4	Reakce proteinových pojiv	36
3.3.5	Příprava standardů lipidových pojiv	37
3.3.6	Reakce lipidových pojiv	37
3.3.7	Ověření reakcí na modelových vzorcích	38
3.3.8	Testování mikrochemických reakcí na vzorcích temper a akvarel.....	39
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
4.1	Reakce standardů sacharidových pojiv	41
4.2	Reakce standardů proteinových pojiv	43
4.3	Reakce standardů lipidových pojiv	48
4.4	Důkazové reakce na modelových vzorcích.....	50

4.5	Důkazové reakce při analýze neznámých vzorků	55
4.6	Analýza modelových vzorků pomocí FTIR spektrometrie	65
4.7	Analýza neznámých vzorků pomocí FTIR spektrometrie	70
5	ZÁVĚR.....	73
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75
7	SEZNAM ZKRATEK	82

1. ÚVOD

Při průzkumu uměleckých děl je důležitá jejich chemická analýza. Při této analýze se zjišťuje přesné složení díla. Díky tomu se může vybrat vhodný způsob jeho restaurování a konzervace. Neméně důležitý důvod průzkumu děl a jejich analýzy je poznání práce autorů a jejich osobitého stylu, a tím i schopnost ověření pravosti děl a odhalení falsifikátů. Při analýze pojiv se využívají instrumentální metody, které dokážou podat přesné informace o složení díla. Tyto metody ale často vyžadují úpravu vzorku podle toho, jaký typ pojiva se v díle nachází. Ke správnému rozhodnutí o postupu analýzy mohou přispět mikrochemické reakce, které potvrdí, nebo vyvrátí přítomnost určitého druhu pojiva.

Cílem této práce je ověření důkazových reakcí organických pojiv v kontextu materiálové analýzy historických a kulturních předmětů, která je prováděna na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Mikrochemické reakce byly testovány na standardech pojiv, modelových a neznámých vzorcích. Následně byly zaznamenány výsledky reakcí a pořízena fotografická dokumentace jako vodítko pro budoucí využití reakcí v analýze reálných vzorků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Umělecké dílo

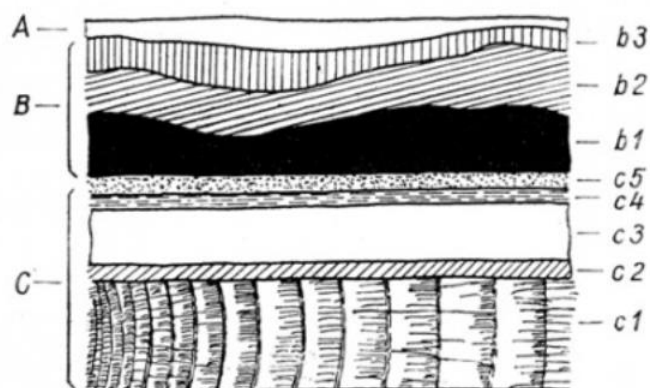
Existuje mnoho definic uměleckého díla a názorů na to, co lze za umělecké dílo považovat. [1] Podle Cambridge Dictionary je umělecké dílo: „Objekt vytvořený umělcem s uměleckým nadáním. Jedná se obzvláště o obraz, kresbu nebo sochu“. [2]

2.2 Složení obrazu

Obraz je většinou dvourozměrné umělecké dílo, které se skládá z malby a laku na pevném podkladu. Ten bývá nejčastěji obdélníkový nebo čtvercový. [3] Podklad obrazu tvoří podložka, spojovací mezivrstva, podkladové nátěry, izolace a imprimitura.

Podložka bývá tvořena nejčastěji plátnem, dřevem nebo kovem (měď, hliník). Může být hladká nebo zrnitá. Pokrytá je spojovací mezivrstvou, která je tvořena většinou kličem nebo želatinou, ale mohou se použít i pryskyřičné laky. Slouží ke zmírnění savosti podložky a zároveň zvyšuje přilnavost podkladových nátěrů. Podkladové nátěry (pigmenty smíchané s různými pojivy) upravují strukturu povrchu, ovlivňují savost, zajišťují trvanlivost malby, mohou ovlivňovat výsledný barevný dojem díla. Nad nimi se nachází izolace. Je to tenká vrstvička na povrchu podkladových nátěrů. Její funkce spočívá v oddělení např. olejových pojiv od podkladu. Je tvořena pryskyřičným lakem nebo želatinou. Imprimitura je poloprůhledná barevná vrstva a často slouží k utlumení svítivosti bílých podkladových nátěrů. Může se nanášet na zaschlou izolaci nebo ji lze do izolace přímo přimíchat. Jako pojivo zde slouží klič nebo oleje. [4]

Malba je nejpodstatnější část obrazu. Tvoří ji vlastní barevný nátěr skládající se ze směsi nerozpustného pigmentu s pojivem nebo z organického barviva, které je v pojivu rozpustné. Je-li vícevrstvá, pak je nejspodnější vrstvou podmalba. Podmalba může sloužit jako jednobarevný nátěr podporující výslednou barevnost malby. Může se vrstvit a vytvářet plastický dojem díla. Lazura je průzračný povrchový nátěr, který je krytý průhledným lakem s ochrannou funkcí. [4, 5]



Obr 1: Složení obrazu. A – lak, B – malba, C – podklad, b1 – podmalba, b2 – malba, b3 – lazura, c1 – podložka, c2 – spojovací mezivrstva, c3 – podkladové nátěry, c4 – izolace, c5 – imprimitura. Převzato z cit. [4]

2.3 Význam pojiv v malbě

Pojiva udržují pigment pohromadě a umožňují mu přilnout k podkladu. Jako pojivo se mohou použít např. oleje, vaječný žloutek, klihy nebo syntetické polymery. Jakmile pojiva uschnou, vytvoří na nátěru stabilní film. Pojiva se vybírají podle malířských technik a podle povrchu díla. Organická pojiva můžeme rozdělit podle rozpustnosti ve vodě nebo podle složení. V této práci bude použito rozdělení podle chemického složení. [3,4]

Tab. 1: Rozdělení ve vodě rozpustných pojiv, převzato z cit. [3], upraveno

Pojiva ve vodě rozpustná					
vaječný bílek	vaječný žloutek	med	kasein*	živočišné klihy	rostlinné gummy**
lehce rozpustný po vyschnutí	nerozpustný po vysušení	rozpustný po vysušení	může, nebo nemusí být rozpustný po vysušení	rozpustné v horké vodě po vysušení	rozpustné po vysušení

* rozpustný ve vodě po zvýšení pH [6]

** některé rozpustné částečně (např. třešňová a švestková guma) [7,8]

Tab. 2: Rozdělení ve vodě nerozpustných pojiv, převzato z cit. [3]

Pojiva ve vodě nerozpustná		
vysychavé oleje	vosky	pryskyřice
čerstvé jsou rozpustné v organických rozpouštědlech, po vyschnutí nerozpustné	rozpustné v organických rozpouštědlech, tavitelné	většina je rozpustných v organických rozpouštědlech, se stářím klesá rozpustnost

Tab. 3: Rozdělení organických pojiv podle chemického složení [3, 9] (upraveno)

	Organická pojiva	Hlavní složky
sacharidová pojiva	med	monosacharidy
	rostlinné gumy, dextrin, škrob	polysacharidy
proteinová pojiva	živočišné klihy	kolagen
	vaječný bílek	ovalbumin
	vaječný žloutek*	lipoproteiny [9]
	kasein	proteiny
lipidová pojiva	vysychavé oleje	triacylglyceroly
	vosky	estery
	pryskyřice	terpeny

* obsahuje velké množství lipidů

2.4 Druhy organických pojiv

2.4.1 Sacharidová pojiva

Med

Hlavními složkami medu jsou glukosa, fruktosa a maltosa. Obsahuje také malé množství oligosacharidů, proteiny a vodu. [9] Jako pojivo se používal převážně ve středověku při iluminaci rukopisů, také se používá spolu s glycerolem v akvarelových barvách proti popraskání při vysychání. [3,6]

Tab. 4: Základní složení medu (v %) [9]

Složka	Průměrný obsah	Rozmezí
voda	17,2	13,4-22,9
fruktosa	38,2	27,3-44,3
glukosa	31,3	22,0-40,8
sacharosa	1,3	0,3-7,6
maltosa	7,3	2,7-16,0
vyšší cukry	1,5	0,1-8,5
proteiny (enzymy)	0,4	0,1-0,6
minerální látky	0,17	0,02-1,03

Polysacharidy

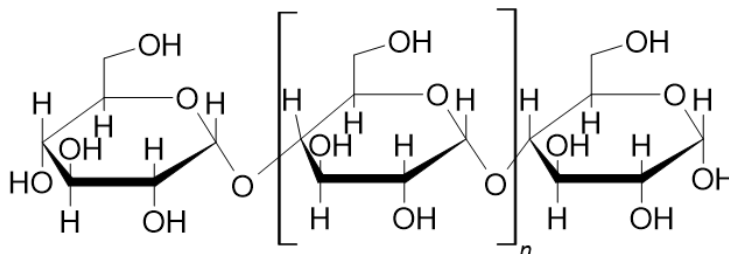
Mnoho monosacharidových jednotek se může vázat glykosidovými vazbami do velkých molekul, které se označují jako polysacharidy. Většinou bývají nerozpustné ve studené vodě, některé tvoří koloidní roztoky nebo gely. [10]

Škrob

Škrob je zásobní polysacharid rostlin. Slouží jako rychlá zásoba energie. Vyskytuje se v rostlinách ve formě škrobových zrn v buňkách listů, semen a hlíz, konkrétně v plastidech, kde probíhá i jeho biosyntéza. Přes den vzniká v pletivech, kde dochází k fotosyntéze, tzv. přechodný škrob, který slouží jako zdroj sacharosy, ze které se v noci v amyloplastech kořenů, hlíz, semen a plodů syntetizuje a skladuje rezervní škrob v podobě škrobových zrn. [9]

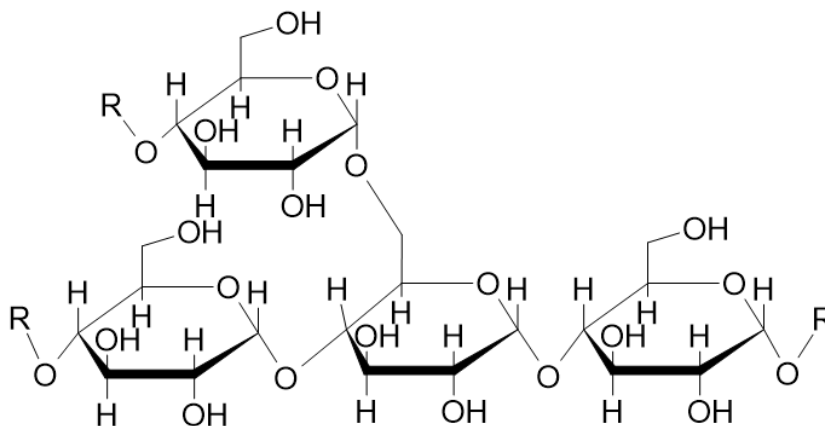
Skládá se ze směsi biopolymerů amylosy a amylopektinu, které jsou tvořeny glukosou. Amylosa obvykle představuje asi 20 % škrobového zrna, v závislosti na druhu rostliny. Skládá se z minimálně rozvětveného řetězce, obsahujícího glukosové jednotky, které jsou spojeny O-glykosidovou vazbou α -(1→4). Řetězec je částečně esterifikovaný kyselinou fosforečnou. U obilných škrobů dochází k tvorbě komplexů s lipidy. [10, 11]

Amylosa se ve vodě a neutrálním prostředí formuje v levotočivou šroubovici, v bazickém prostředí převažují globulární struktury. [9] Ve vodě je rozpustná, při reakci s jódem poskytuje modré zbarvení. [12]



Obr. 2. Struktura amylosy

Amylopektin je hlavní složkou škrobu, většinou tvoří asi 80 % škrobového zrna. Má mnohem větší molekuly než amylosa. Od amylosy se liší rozvětveným řetězcem každých 20-30 glukosových jednotek. Větvení probíhá vazbou α (1 \rightarrow 6). Výjimečně mohou vznikat také vazby α (1 \rightarrow 3). Zhruba na 400 glukosových zbytků připadá jeden zbytek esterifikovaný kyselinou fosforečnou. [9]



Obr. 3. Struktura amylopektinu

Ve studené vodě je škrob nerozpustný, ale v horké vodě bobtná a tvoří tzv. škrobový maz. Ten je nestálý a po několika dnech se začínají zpět vytvářet bílé krystalky škrobu a maz začíná ztrácet lepivost, proto se připravuje vždy těsně před použitím. Škrobový maz pojí pigmenty jen slabě, ale barvy jsou opticky stálé, trvanlivé a ve vodě

nerozpustné. Škrobové nátěry postupem času ztrácí pružnost a křehnou, proto se do nich přidávají zvlhčující látky, např. glycerol. [6]

Dextriny

Dextrin vzniká opatrným pražením nebo kyselou hydrolyzou škrobu. Má stejný sumární vzorec, ale kratší polysacharidové řetězce. Podle teploty pražení škrobu vznikají různé typy dextrinů. Přidávají se jako pojivo do barev na keramiku, tato barva ale po vypálení praská. [13] Adhezní schopnosti dextrinů nejsou moc velké, navíc jsou po zaschnutí velmi křehké.

Bílý dextrin vzniká pražením škrobu při teplotě 79-120 °C. S horkou vodou vytváří bílý maz, který se po ochladnutí kvůli své tuhosti jako pojivo v obrazech nepoužívá. Žlutý dextrin vzniká pražením škrobu při vyšší teplotě nad 150 °C. Je úplně rozpustný v horké vodě a jeho roztok je tekutý i při ochlazení směsi. [6, 14, 15]

Rostlinné gummy

Rostlinné gummy (klovatiny) jsou zpravidla lepivé šťávy vytékající samovolně z pletiv rostlin v důsledku působení vnějších vlivů, například poranění nebo napadení mikroorganismy. Jsou tvořeny převážně různými polysacharidy. Jsou hydrofilní, ve vodě rozpustné z části nebo úplně. Disperze nebo roztoky jsou viskózní. [9] Pro malíře mají význam hlavně arabská guma a gummy z ovocných stromů, hlavně třešně ptačí (*Prunus avium*) a švestky (*Prunus domestica*). [6, 9]

Arabská guma je klovatina z rostlin rodu Akácie (*Acacia*). Kromě akácie arabské (*Acacia nilotica*) se v malbách využívá klovatin z akácie senegalské (*Acacia senegal*) a akácie egyptské (*Acacia seyal*). Arabská guma je jedna z nejdéle známých rostlinných gum. Používala se už ve 3. tisíciletí př. n. l. ve starověkém Egyptě jako pigmentové pojivo v barvách použitých k tvorbě hieroglyfů nebo jako pomocná látka při balzamování mumií. Ve vodě je plně rozpustná. [6, 16, 17]

Arabská guma je substituovaný kyselý arabinogalaktan. Za základní stavební jednotku se dá považovat D-galaktosa, L-arabinosa a α -L-rhamnosa. V různých druzích akácií je obsah těchto sacharidů různý. Hlavní řetězec tvoří jednotky β -D-

galaktopyranosy spojené glykosidovými vazbami (1→3). Postranní řetězce se často mnohonásobně větví jako u amylopektinu. Relativní molekulová hmotnost se pohybuje přibližně od 260 do 1200 kDa, ale vyskytují se i polymery s molekulovou hmotností až do 2300 kDa. [9]

Tenká vrstva arabské gummy po vysušení ztvrdne a získá skleněný lesk. Kvůli její velké křehkosti se do ní přidávají hygroskopické látky jako například glycerol. [6]

Třešňová a švestková guma mají velmi podobné vlastnosti, protože obě pocházejí ze stejného rodu rostlin (*Prunus sp.*). Obě se používaly jako pojivo v uměleckých dílech ve středověku v Evropě, hlavně kvůli jejich lokálnímu výskytu. Často nahrazovaly dražší a méně dostupnější arabskou gumu. Jejich nevýhoda je pouze částečná rozpustnost. Třešňová guma se ve vodě rozpouští z 60 %, švestková ze 73 %. Třešňová guma se nachází ve stromech rodu třešeň, nejčastěji se využívalo klovatín z třešně ptačí (*Prunus avium*). Po zaschnutí je dokonale průhledná a rozjasňuje barvy. Švestková guma se používala ze stromů slivoně švestky (*Prunus domestica*). Její nevýhodou je tmavnutí při schnutí. Tomu se dá předejít povařením s ethanolem. [7, 8]

Třešňová klovatina obsahuje D-glukuronovou kyselinu, D-xylosu, L-arabinosu, D-galaktosu a D-mannosu v molárním poměru 1 : 6,3 : 3 : 0,5 a stopy L-rhamnosy. Polysacharid se skládá z jednotek D-galaktopyranosy vázaných většinou vazbami $\beta(1\rightarrow6)$ větvenými na pozici 3 D-xylopyranosovými jednotkami nebo až čtyřčlennými řetězci L-arabinosy. Na pozici 6 galaktospyranosy jsou vázány D-glukuronové kyseliny. [18]

Struktura švestkové gummy je velmi podobná té třešňové. Hlavní řetězec se skládá z vázaných $\beta(1\rightarrow6)$ D-galaktopyranosových jednotek. Guma z *Prunus domestica* L. *subsp. domestica* se skládá z kyseliny D-glukuronové, kyseliny 4-O-methyl-D-glukuronové, D-galaktosy, D-mannosy, L-arabinosy a D-xylosy v molárním poměru 4 : 6 : 32 : 10 : 34 : 10. Obsahuje také stopy L-rhamnosy. Guma z *Prunus domestica* L. *subsp. Insitia* obsahuje D-galaktosu, D-mannosu a L-arabinosu v molárním poměru 2 : 1 : 3 a 3 % D-xylosy. [19]

Zdrojem **tragantu** jsou rostliny rodu kozinec (*Astragalus*) rostoucí převážně v Asii a Řecku. Patří mezi ně například kozinec slizodárný (*Astragalus gummifer*).

Tragant ve vodě bobtná a rosolovává. Před použitím je potřeba jej zahřát a protlačit plátnem, aby se zvýšila jeho tekutost. V pozdním středověku se míchal s barvami určenými pro miniaturu. Nejčastěji slouží jako zahušťovadlo emulzí a disperzí, zřídka se používá jako aditivum k temperám. [6]

Tragant se skládá ze dvou frakcí. První je bassorin, který je ve vodě nerozpustný, ve vodě bobtná a tvoří gel. Druhou frakcí je tragacanthin, který je ve vodě rozpustný. Poměr rozpustné složky je různý u různých druhů rostlin rodu *Astragalus* a pohybuje se od 35 % - 75 %. Kyselou hydrolyzou vzniká D-galakturonová kyselina, D-galaktosa, L-fukosa (6-deoxy-L-galaktosa), D-xylosa, L-arabinosa, L-rhamnosa. Přesný poměr sacharidů se liší dle druhu a lokality rostliny. [20, 21]

2.4.2 Proteinová pojiva

Proteiny jsou makromolekuly tvořené aminokyselinami spojenými peptidovými vazbami. Minimální molární hmotnost bílkovin je 10 000 Da; menší oligomery aminokyselin řadíme mezi peptidy. [22]

Živočišné klihy

Klihy jsou považovány za důležitá pojiva v různých kulturách. V Indii se připravovaly klihy z buvolí kůže, v Tibetu z jačí kůže. V čínských a japonských obrazech se používaly jako nejčastější pojivo. [3] Klihy vznikají hydrolytickou degradací kolagenních vláken a jsou ve vodě rozpustné. Jsou tvořeny kolagenem, hlavní složkou kůže a šlach zvířat. Kromě kolagenu obsahují také kreatin, elastin, mucin, chondrin a anorganické soli. [6, 23]

Vaječné proteiny

Vysušený vaječný bílek obsahuje zhruba 90 % proteinů. [3] Z největší části obsahuje ovalbumin, dále ovotransferrin, ovomukoid, globuliny a další proteiny. [9] Vaječný bílek nebyl pravděpodobně široce využíván jako pojivo. Jako příklad jeho využití se může uvést lepení zlata, ale najdeme ho také ve středověkých evropských rukopisných iluminacích. Po zaschnutí vaječného bílku je i nadále rozpustný ve studené vodě. [3, 24]

Tab. 5: Proteiny obsažené ve vaječném bílku [9, 25, 26]

Proteiny bílku	Podíl v %	Pozn.
ovalbumin	54	hlavní vaječný alergen [25]
ovotransferrin	12	multifunkční protein, antimikrobiální [25]
ovomukoid	11	inhibuje proteasy, alergen
ovomucin	1,5-3,5	zodpovědný za viskozitu a pění bílku [25]
lysozym (globulin G ₁)	3,5	antibakteriální látka proti bakteriím obsahující murein
globuliny G2, G3	8	pění bílku
flavoprotein	0,8	podporuje výživu embrya [25]
ovoglykoprotein	0,5	biologický význam je nejasný [26]
ovomakroglobulin	0,5	antimikrobiální vlastnosti [25]
ovoinhibor	1,0-1,5	inhibitor proteas
avidin	0,05	antibakteriální, váže na sebe biotin, inhibitor proteas [25]
cystatin	0,05	antimikrobiální vlastnosti [25]

Vaječný žloutek obsahuje 16,6 % proteinů, 32,6 % tuků, 1,0 % sacharidů, 1,1 % minerálních látek a 48,7 % vody. Proteiny se vyskytují ve formě lipoproteinů, glykoproteinů, glykofosfoproteinů a glykofosfolipoproteinů. Hlavními proteiny žloutku jsou lipovitellin a fosvitin. Jako emulgační činidlo slouží lecitin. Jako pojivo se užívá lehce rozředěný vaječný žloutek vodou. Jakmile uschne, není už rozpustný ve vodě, což ho odlišuje od ostatních ve vodě rozpustných pojiv. Jeho použití je prokázáno u mnoha kultur, nejznámější použití je ve středověké a renesanční Evropě, hlavně v Itálii [3,9]

Kasein

Kasein je hlavní mléčná bílkovina, tvoří 50-80 % celkového množství proteinů. V mléce se vyskytují 4 druhy fosfoproteinů řazených do skupiny kaseinu: α _S-kasein (42 %), β -kasein (25 %), γ -kasein (4 %) a κ -kasein (4 %). Nevyskytují se v monomerní formě, ale agregují do kaseinových komplexů a micel. Sráží se okyselením mléka nebo

syřidlem. Suchý kasein je ve vodě nerozpustný. Od antiky se používal jako pojivo barev a jako lepidlo. [6, 9, 27, 28]

2.4.3 Lipidová pojiva

Lipidy jsou velmi heterogenní skupina organických látek. Jsou omezeně rozpustné ve vodě, ale velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Mezi tzv. jednoduché lipidy patří triacylglyceroly, vosky a terpeny. [29] Živočišné triacylglyceroly se označují jako tuky. Většina tuků je za pokojové teploty tuhá. [30]

Oleje

Nejstarší malba s obsahem olejů se našla v Afghánistánu a je datovaná do sedmého století n. l. Jedná se o nástěnnou malbu jeskyně s vyobrazením Buddha obsahující lněný a ořechový olej. [31] V Japonsku se používal v 8. století n. l. perilový a konopný olej. [32] S oleji v obrazech se setkáváme hlavně na konci třináctého století na oltářních malbách v Norsku. Nejvíce se používal lněný a ořechový olej. Během devatenáctého století získal na popularitě makový olej. [3] Během 20. století se ve velkém množství používal tungový olej. [32]

Oleje jsou estery glycerolu a vyšších mastných kyselin rostlinného původu. Jsou kapalné, lehčí než voda, na dotyk mastné a zanechávají skvrny. Ve vodě jsou nerozpustné, ale dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech. Reagují s hydroxidy za vzniku glycerolu a mýdla. Jako pojivo se používají v olejomalbě. Získávají se lisováním nebo extrakcí semen. Lepší vlastnosti mají oleje lisované za studena. Některé oleje v důsledku oxidace vzduchem tvoří tuhý film a nazývají se oleje vysychavé (lněný, makový, ořechový, konopný, perilový a tungový). Oproti tomu nevysychavé oleje na vzduchu netuhnou, jen houstnou (olivový, mandlový). Problematické zařazení je u polovysychavých olejů, které na vzduchu houstnou, ale mohou vytvořit i tuhou tenkou vrstvičku (slunečnicový, bavlníkový). Tyto oleje nemají ustálené zařazení. [6]

Lněný olej se získává ze semen lnu setého (*Linum usitatissimum*). Tato rostlina je pěstována lidmi od doby kamenné. Mimo olej používaný v malířství našel len využití v tvorbě vláken a provazů. Lněná semena obsahují 32-43 % oleje. Z mastných kyselin je v něm zastoupena především linolová kyselina, linolenová [33] a olejová kyselina. [32]

Olejový film je stabilní vůči vodě, ale není stabilní vůči světlu a má tendence žloutnout. [33]

Makový olej je obsažen v semínkách máku setého (*Papaver somniferum*). Mák se pěstuje ve střední a východní Evropě, Holandsku, Indii a Malé Asii. Olej je téměř bezbarvý. Při lisování za horka je načervenalý. Jeho hlavní mastné kyseliny jsou linolová kyselina a olejová kyselina. Díky malému množství linolenové kyseliny méně žloutne a rychleji schne než olej lněný. Nevýhoda makového oleje je rychlé žluknutí a následné žloutnutí. Tomu se dá předejít přidáním 5 % práškového vápna nebo bezvodé sody. Makový olej je drahý, a tak bývá často falšován olejem řepkovým, konopným, lněným nebo slunečnicovým. [6]

Ořechový olej se získává z rostlin ořešniku královského (*Juglans regia*). Největší produkce vlašských ořechů je v Číně, následuje Irán, USA, Turecko a Ukrajina. Jádra vlašských ořechů obsahují až 71 % oleje. [34] Ten má světlou žlutozelenou barvu. Jeho výhodné vlastnosti jsou rychlé tuhnutí a nízká viskozita. Díky nízké viskozitě pojme ořechový olej více pigmentů než ostatní oleje. Jeho nevýhodou je rychlé žluknutí. [6]

Konopný olej se získává ze semen konopí setého (*Cannabis sativa*), které se pěstuje převážně v západní Evropě, Indii, Severní Americe, Japonsku a Turecku. Má nazelenalou barvu a velmi nízkou viskozitu. Schne velmi dobře, příliš nežloutne, ale je náchylný k vrásnění. [6]

Perilový olej se získává ze semen rostliny *Perilla frutescens*. Tato rostlina roste převážně v Indii a Indočíně. Její semena obsahují 30-51 % oleje. Jeho složení je podobné složení lněného oleje. Význam perilového oleje je hlavně lokální.

Tungový olej se izoluje z jader ořechů rodu *Aleurites*, hlavně *Aleurites fordii* v Číně a Japonsku. Semena obsahují 25-45 % oleje. Jeho hlavní složkou je α -eleostearová kyselina. Tungový olej je po ztuhnutí více elastický než lněný olej a také méně žloutne. [4] Často se tyto dva oleje míchají a výsledná směs rychleji schne, protože tungový olej působí jako sušidlo a také způsobí větší ztvrdnutí výsledného filmu. [6]

Tab. 6: Procentuální obsah mastných kyselin v různých druzích olejů používaných v malířství, převzato z cit. [34] a upraveno

	Makový	Ořechový	Lněný	Konopný	Perilový	Tungový
zdroje oleje [6]	ze semen máku setého	jádra vlašských ořechů	semena lnu setého	semena konopí setého	semena rostlin rodu <i>Perilla</i>	jádra plodů rostlin rodu <i>Aleurites</i>
palmitová (C16)	10	3-7	6-7	6-7	7	3
stearová (C18)	2	0,5-3	3-6	2-3	2	2
olejová (C18:1)	11	9-30	14-24	12-17	13	11
linolová (C18:2)	72	57-76	14-19	55-65	14	15
α -linolenová (C18:3)	5	2-16	48-60	14-20	64	3
α -eleostearová (C18:3)	0	0	0	0	0	59

Tuhnutí olejů

Vysychavé oleje obsahují větší množství esterů nenasycených mastných kyselin než oleje netuhnoucí. Při tuhnutí dochází k oxidační polymeraci, během které olej postupně houstne, až nakonec ztuhne. Čím více nenasycených mastných kyselin olej obsahuje, tím rychleji tuhne. Rychlost tuhnutí olejů lze zhodnotit pomocí tzv. jodového čísla. To udává, kolik gramů jódu se může adovat na 100 g oleje za stanovených podmínek. Se zvyšujícím jodovým číslem se zvyšuje rychlost tuhnutí oleje. U nevysychavých olejů se toto číslo pohybuje od 80-100, u polovysychavých 100-130 a u vysychavých olejů 130-200. [6, 35, 36]

Oxidace olejů vzdušným kyslíkem je radikálová reakce. Po iniciaci teplem nebo fotochemicky vzniká homolytickým štěpením R-H vazby lipidový radikál $R\cdot$. Dalším krokem je reakce radikálu se vzdušným kyslíkem za tvorby peroxidového radikálu $ROO\cdot$. Peroxidový radikál může reagovat s další mastnou kyselinou za vzniku hydroperoxidu $ROOH$ a dalšího lipidového radikálu $R\cdot$. Peroxidový radikál může také reagovat s dvojnou vazbou molekul mastných kyselin za vzniku dialkylperoxidu $ROOR$. Peroxidové sloučeniny nejsou stabilní a působením světla, tepla nebo kationtů přechodných kovů se z nich stávají peroxidové, alkoxylové nebo hydroxylové radikály. Alkoxylové radikály mohou vedlejšími reakcemi tvořit alkoholy, aldehydy, ketony nebo dialkylethery. V důsledku uvedených procesů dochází k zesílení oleje. [37-39]

Stárnutí vzniklého filmu se projevuje změnou fyzikálně chemických vlastností. Jedná se o žloutnutí, kroucení, ztrátu pružnosti, snížení adheze, praskání až rozpad. Oleje obsahující větší množství kyseliny linolenové, jako například lněný olej, žloutnou více.[37] Jako možné příčiny žloutnutí vysychavých olejů se udává tvorba konjugovaných sloučenin vzniklých z rozkladu hydroperoxidů, tvorba 1,3-ketonů a sloučenin obsahujících karbonylové skupiny konjugované s dvojnou vazbou. Ke žloutnutí také přispívá oxidace nečistot v oleji. Přечиštění olejů může žloutnutí snižovat. [38, 40]

Vosky

Podobnou skupinou látek jsou vosky, což jsou směsi esterů vyšších mastných kyselin (cerotové, melissové, karnaubové) a vyšších alkoholů (myricyl-, ceryl-, cetyl- a karnaubylalkohol). Obsahují také volné mastné kyseliny, uhlovodíky a alkoholy. Existují vosky živočišného, rostlinného a minerálního původu. Malířská technika, která používá roztavené vosky jako pojivo, se nazývá enkaustika. Tato technika byla používána ve starověkém Řecku, Římě a Byzantské říši. Enkaustikou se malovalo na zdi, dřevo, keramiku nebo plátno. Nejstarší dochované malby jsou Fajjúmské mumiové portréty z druhého století př. n. l. nalezené v Egyptě. Vosky se také využívají v retuši barev na obrazech a nástěnných malbách. Na rozdíl od olejů jsou pevné a chemicky stálější. Nežloutnou ani nežluknou. Ve vodě jsou nerozpustné. [3, 6, 42]

Mezi živočišné vosky patří **včelí vosk**, který se v malbách vyskytuje nejvíce. [3] Využívá se vosku od včel medonosných (*Apis mellifera*) a včel východních (*Apis cerana*).

Čerstvý včelí vosk je téměř bílý a časem tmavne. Má antimikrobiální vlastnosti, a i proto se spolu s měkkými pryskyřicemi používá jako součást laků a temper. [6, 42] Včelí vosk obsahuje alkany, alkeny, mastné kyseliny, mastné alkoholy, monoestery, hydroxymonoestery, diestery a další látky. Jeho složení se u různých druhů včel liší. [43]

Tab. 7: Složení včelího vosku (*Apis mellifera*) [43]

Složky	Počet uhlíků	Obsah v %
alkany	liché 23-31	12,8
alkeny	liché 27-39:1	2,9
mastné kyseliny	sudé 20-36	18,0
mastné alkoholy	33, 35	0,6
monoestery	38-52*, 46-54**	40,8
hydroxymonoestery	40-54	9,2
diestery	54-64	7,4
nedefinované látky	-	8,3

*estery kyseliny palmitové, **estery kyseliny olejové

Mezi další živočišné vosky patří lanolin, vorvaňovina a čínský vosk. Lanolin je vylučovaný mazovými žlázami ovcí. Obsahuje cholesterol a pravděpodobně díky tomu je schopný vytvářet emulze s vodou. [38] Vorvaňovina se získává ochlazením tekutiny z lebeční dutiny vorvaně obrovského (*Physeter macrocephalus*). Kvůli nedostatku přírodní vorvaňoviny se vyrábí synteticky. [38] Čínský vosk je produkován hmyzem *Coccus ceriferus*, který se kvůli vosku v Číně chová. [44]

Řada druhů rostlin také produkuje vosky. Karnaubský vosk vylučuje palma *Copernicia cerifera*, která se vyskytuje v Brazílii. Z běžných vosků má nejvyšší teplotu tání. Je křehký a tvrdý. Míchá se s jinými vosky, pokud je potřeba zvýšit jejich teplotu tání nebo tvrdost. [38] Espartový vosk se získává z trávy *Lygeum spartum* vyskytující se v oblastech severní Afriky a Španělska. Používali ho Féničané, Řekové i Římané pro enkaustické malby. Také se používá pro zvýšení teploty tání a tvrdosti jiných vosků. [38]

Fosilní vosky se nachází hluboko pod zemským povrchem a musí se těžit. Ozokerit je přírodní bituminózní vosk, který se většinou nachází u nalezišť ropy. Jeho rafinací vzniká ceresin, který obsahuje rozvětvené a cyklické uhlovodíky. Ceresin bobtná

v olejích za tvorby voskových past. Má podobné vlastnosti jako včelí vosk, a proto často slouží jako jeho náhrada. [38] Parafín se získává frakční destilací ropy. Obsahuje téměř jen nasycené sloučeniny. Na rozdíl od živočišných a rostlinných vosků je odolný vůči silným kyselinám a bázím.

Balzámy a pryskyřice

Většina balzámů a pryskyřic je tvořena převážně terpeny. Terpeny jsou složené ze dvou a více molekul isoprenu a podle počtu isoprenových jednotek se dělí na monoterpeny (2 jednotky), seskviterpeny (3 jednotky), diterpeny (4 jednotky), sesterterpeny (5 jednotek), triterpeny (6 jednotek) až polyterpeny. Mono- a seskviterpeny jsou kapalné látky a využívají se jako rozpouštědla pro di- a triterpeny, které jsou tuhé. [38, 45]

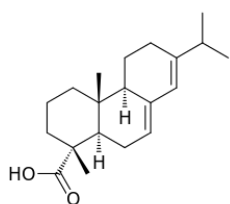
Balzámy jsou viskózní, lepivé tekutiny. Jsou produkovány některými stromy při poranění. Tvoří je těkavé silice spolu s netěkavými složkami. Chemicky se jedná o směs monoterpenů nebo seskviterpenů s diterpeny nebo triterpeny. Nejlevnější a nejdostupnější je balzám z borovice (*Pinus spp.*). Borovice produkuje více balzámu oproti ostatním jehličnanům rostoucím v Evropě a také je hojně rozšířená. Borovicové balzámy mají šedožlutou barvu, jsou kalné a časem hnědnou, takže nejsou příliš vhodné pro použití v malířství. Z jejich balzámů nebo pryskyřic se destiluje terpentýn, který slouží jako rozpouštědlo. Balzámy vhodné pro malířství jsou opticky stálé a čiré, například balzámy z modřínu opadavého (*Larix decidua*) nebo jedlí (*Abies spp.*) V 17. století se přidávalo minimální množství modřínového balzámu do ztuhlého oleje spodních vrstev malby, kde zadržoval vlhkost. Kvůli zadržení vlhkosti ale docházelo k nežádoucímu praskání některých svrchnějších barevných vrstev. [6, 45]

Na vzduchu silice z balzámu odtěkají a následnou oxidací a polymerací vznikne pryskyřice. Mezi **diterpenoidní pryskyřice** patří pryskyřice z jehličnatých stromů a některých bobovitých rostlin. Největší význam má pryskyřice z borovice (*Pinus spp.*) neboli *kalafuna*. Hlavními složkami jsou karboxylové kyseliny, estery a alkoholy odvozené od pimaradienu a abietadienu. Jedná se například o kyseliny abietovou a pimarovou. Nevýhodou kalafuny je její velká křehkost a malá odolnost proti vlhkému prostředí. Z jehličnatých stromů sandarakovníku článkovaného (*Callitris quadrivalvis*) vytéká sandarak. Tyto stromy rostou v oblasti Středozemního moře, v severní Africe

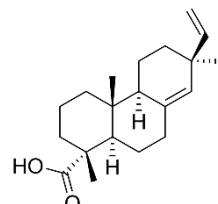
a v Austrálii. *Sandarak* je křehký, dává silně lesklý a křehký film, ale stářím červená. Považením sandaraku s olejem se získají olejové laky, které ale mají sklony k oranžovění a hnědnutí. [6,45]

Triterpenoidní pryskyřice jsou obsažené většinou v tropických stromech. Nepolymerizují, ale jsou snadno oxidovatelné. Obsahují tetracyklické a pentacyklické sloučeniny. Mezi malířsky významné patří *damara* a *mastix*. *Damara* vytéká zhruba z 500 druhů stromů čeledi *Dipterocarpaceae*, která se vyskytuje nejvíce v Malajsii a Indonésii. Je bezbarvá, ale může být i mírně nažloutlá. Obsahuje kyselinu oleanovou, ursonovou a dammarenolovou a od nich odvozené látky. Stářím vůbec nežloutne, a proto je nejvyhledávanější pryskyřicí pro tvorbu laků. *Mastix* produkuje rostlina řečík lentišek (*Pistacia lentiscus*), který roste okolo Středozemního moře. Na rozdíl od damary je úplně rozpustný v alkoholech, uhlovodících a ketonech. Pryskyřice je elastická a má nažloutlou až nazelenalou barvu. Není ale tak trvanlivý jako *damara*, a proto není moc používaný. [6, 46, 47]

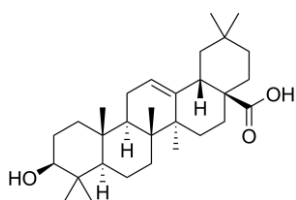
Šelak je pryskyřice živočišného původu. Produkuje jej hmyz črvec lakový (*Lacifer lacca*). Neobsahuje terpenové kyseliny ani fenolické sloučeniny. Obsahuje hlavně laktony a laktidy vyšších alifatických polyhydroxykyselin, hlavně kyseliny aleuritové. Nejlépe se rozpouští v alkoholech a glykolech, ale ve vodě není rozpustný. Roztoky rozpuštěného šelaku v alkalických vodných roztocích se používaly jako pojivo čínských tuší. [37]



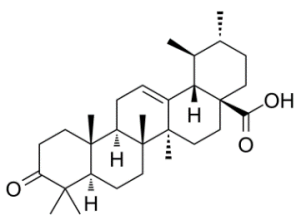
Obr. 4 kyselina abietová



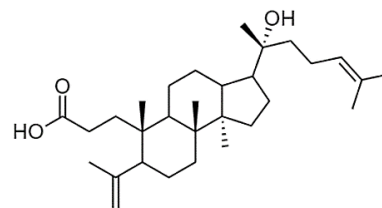
Obr. 5 kyselina pimarová



Obr. 6 kys. oleanová



Obr. 7 kys. ursonová



Obr. 8. kys. dammarenolová

V historických malbách se většinou nachází pojiva přírodního původu. Jedná se o pojiva sacharidová, proteinová a lipidová. Autoři většinou používali dostupné suroviny, převážně lokální. Existují také syntetická pojiva, která se začala využívat hlavně ve 20. století. Jedná se např. o polyvinylacetát, polymethylmethakrylát, cyklohexanonové pryskyřice, alkydy a deriváty celulosy. Používají se ve formě vodných disperzí. Výsledné barvy méně praskají a zůstávají stálé, kvůli čemu se používají při retuši obrazů. Většinou jsou odolné vůči mikrobiálnímu působení. [4, 37, 48]

Analýza pojiv umožňuje určit celkový stav malby, přesné složení jednotlivých vrstev malby, rozsah dřívějších úprav malby nebo případný rozsah jejího poškození. Následně se může zvolit optimální postup restaurátorského zásahu. Kromě stavu malby může analýza pomoci při dataci a určení autora. Především známá umělecká díla bývají často falsifikována, hlavně kvůli finančnímu zisku. Padělatel se co nejvíce snaží napodobit osobitý styl umělce, stejně tak jako materiály, které používá. Není ale vždy úplně jednoduché napodobit přesné složení barev, čehož se při odhalování padělků využívá. [49, 50]

2.5 Chemická analýza a odběr vzorku

Chemická analýza organických pojiv se provádí často mikroinvazivním zásahem do díla, kdy je odebrán mikrovzorek. K dispozici jsou ale také postupy neinvazivní, např. Ramanova a FTIR spektrometrie, které lze využít v uspořádání neinvazivním i invazivním. I přes rychlý rozvoj neinvazivních metod mohou invazivní metody poskytnout důležité kvalitativní a kvantitativní informace o materiálu daných předmětů a po pečlivém zvážení je pak potřeba odebrat vzorek. [49, 51]

Velikost vzorku většinou nepřesahuje jeden milimetr. Množství a velikost vzorku jsou ovlivněny stavem předmětu, cílem průzkumu a výsledky neinvazivní analýzy, díky které lze vybrat efektivněji místo odběru a minimalizovat také počet a velikost odběrů. I přes snahu o minimální zásah do díla je vhodné zvážit množství odebíraného vzorku, aby analýza byla spolehlivá a výsledků průzkumu reprezentativní. [3, 49]

K odběru vzorků se používají místa, která nejsou příliš viditelná. Nejčastěji k odběru dochází v rozích malby, které nejsou příliš na očích, nebo v místě poškození

malby, kde bude docházet k restaurování. Je důležité, aby byl vzorek pokud možno odebrán před jakýmkoliv restaurátorským zásahem. Ten totiž může vzorek kontaminovat a může docházet ke zkreslení nebo dokonce ke znemožnění následné analýzy. Zároveň se musí dbát na to, aby byl vzorek z vybraného místa z hlediska rozložení a rozvrstvení všech látek reprezentativní. [3, 51]

Odběr vzorku se provádí jehlami nebo skalpelem. Neméně důležité je uschování vzorku, aby nedošlo k jeho kontaminaci. [49, 51]

2.6 Selektivní mikrochemické reakce

Mikrochemické reakce se využívají ke kvalitativní analýze zejména organických pojiv, ale i pigmentů. Identifikace probíhá na základě charakteristických reakcí, které se vyznačují určitým projevem pro danou skupinu podobných látek. Sledují se změny zbarvení, zkoušky rozpustnosti nebo teploty tání. Stanovení teploty tání se využívá hlavně při orientačním důkazu vosků a pryskyřic. Při vybarvovacích (histologických) reakcí se dá pozorovat i distribuce pojiv v jednotlivých vrstvách. Používané reakce nejsou specifické pro jednu konkrétní látku, ale jsou charakteristické pro určitou skupinu látek (oleje, proteiny apod.) a používají se pouze jako orientační důkaz. [51]

Tab. 8: Teploty tání vosků, převzato z cit. [38], čínský vosk z cit. [52] a upraveno

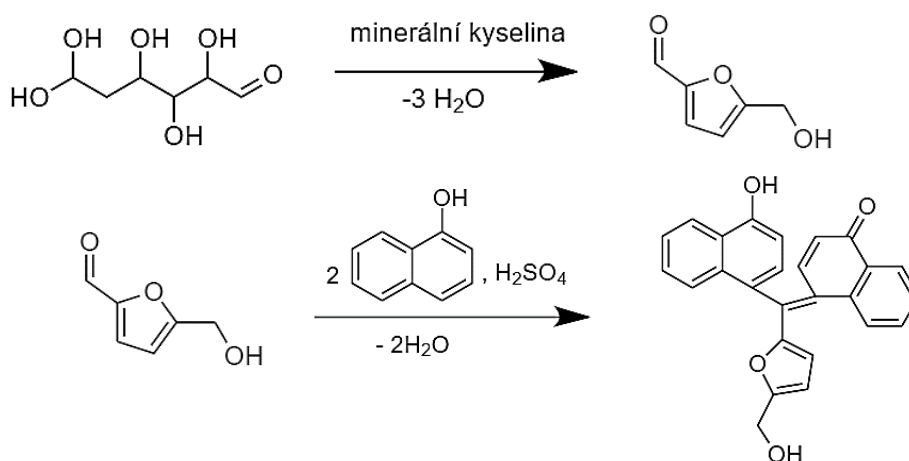
Vosk	Teplota tání [°C]
včelí vosk	61-70
lanolin	36-41
vorvaňovina	42-52
čínský vosk	80-81
karnaubský vosk	81-86
espartový vosk	70-78
ceresin	55-80
parafin	55-58

Tab. 9: Teploty tání pryskyřic, převzato z cit. [7]

Pryskyřice	Bod měknutí [°C]	Teplota tání [°C]
kalafuna	80	110
damara	55	85
mastix	80	95
šelak	65	80-120
sandarak	100	150

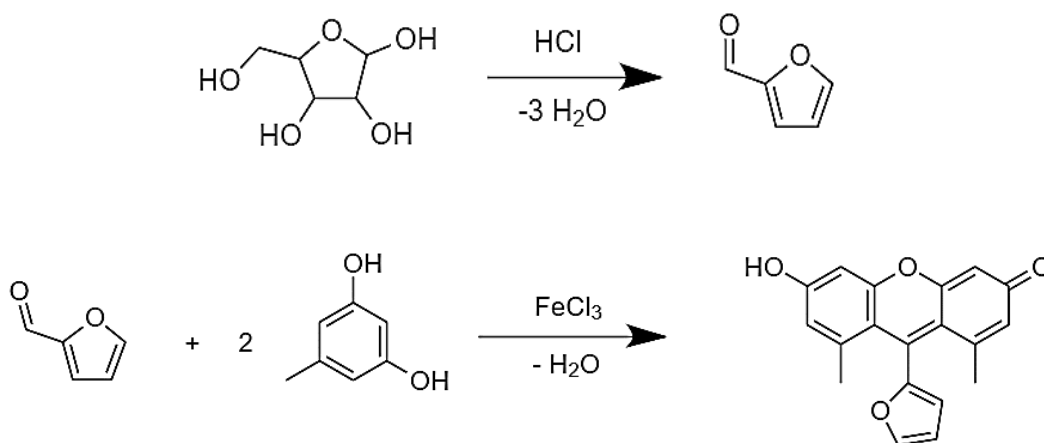
2.6.1 Důkazové reakce sacharidů

Na **Molischovu zkoušku** dávají pozitivní reakci všechny monosacharidy, oligosacharidy i polysacharidy. Oligo- a polysacharidy se kyselé hydrolyzují na monosacharidy a teprve ty reagují s koncentrovanou minerální kyselinou (např. H_2SO_4). Z pentos vzniká furfural, z hexos 5-hydroxymethylfurfural. V dalším kroku furfural nebo jeho deriváty reagují se dvěma molekulami 1-naftolu a vytvoří se fialově zbarvený produkt. [53]



Obr. 9: Molischova reakce

Bialova reakce se používá při důkazu rostlinných gum, které obsahují pentosové cukry. Při zahřátí s kyselinou chlorovodíkovou se uvolňuje furfural, který při reakci s orcinolem a chloridem železitým tvoří modrozeleně zbarvený produkt. U hexos už při dehydrataci vzniká 5-hydroxymethylfurfural, který při kondenzaci s orcinolem vytváří hnědý produkt. [47]



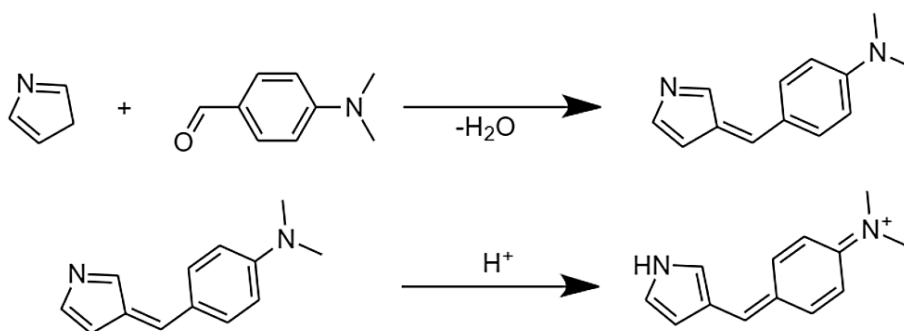
Obr. 10: Bialova reakce

Důkazová reakce škrobu se provádí Lugolovým činidlem (I_2 v KI). Polyjodidové ionty se zachytávají uvnitř šroubovice amylosy a tvoří tmavě modře zbarvený komplex. Amylopektin tvoří s Lugolovým roztokem červenohnědé až červené zbarvení, které ale přes tmavě modré zbarvení amylosy není příliš pozorovatelné. [53]

2.6.2 Důkazové reakce proteinů

Biuretova reakce dokazuje látky obsahující peptidové vazby (-CO-NH-). Při obsahu proteinů vznikne reakcí s Biuretovým činidlem ($NaOH + CuSO_4 +$ tetrahydrát vinanu sodno-draselného) fialové zbarvení v důsledku vzniku komplexní sloučeniny mezi měďnatými kationty a amidovými skupinami v peptidech a proteinech. [53, 54]

Při důkazu proteinových pojiv se může využít detekce **pyrrolových derivátů**. Reakce není narušena jinými pojivy. Při termickém štěpení proteinů se uvolňuje pyrrol a jeho deriváty, které jsou většinou těkavé. Reagují s 4-(dimethylamino)benzaldehydem v kyselém prostředí za vzniku červenofialového zbarvení. [55]



Obr. 11: Důkazová reakce pyrrolových derivátů

Důkazová reakce dusíku je další reakce na přítomnost proteinů. Při pozitivní reakci se z proteinu pomocí oxidu vápenatého uvolní dusík ve formě amoniaku. Amoniak následně obarví na modro indikátorový pH papírek. Tuto reakci mohou ovlivnit některé pigmenty jako např. pruská modř nebo indigo. [55]

2.6.3 Důkazové reakce lipidů

Vysychavé oleje se dají dokázat kyselou hydrolyzou, při níž vzniká glycerol. Ten dále reaguje s hydrogensíranem draselným za vzniku akroleinu. Akrolein se dá dokázat reakcí s fuchsinovým barvivem, které se předem odbarví hydrogensířičitanem sodným. Při pozitivní reakci se z akroleinu vytvoří adiční sloučenina se siřičitanem a vzorek se zbarví. [55]

Při **důkazové reakci vosku** v malbě se využívá 1% fuchsinového barviva. Tím se nasákne filtrační papír, který se poté vysuší. Na takto upravený filtrační papír se nanese vzorek a začne se zahřívat. Když obsahuje vosk, tak se roztaví a vsákne se do filtračního papíru. Nakonec se přidá 10%ní roztok siřičitanu sodného, který odbarví fuchsinové barvivo, ale skvrna po vosku zůstane načervenalá. [55]

Storch-Morawského reakce slouží k důkazu pryskyřic. Probíhá pomocí koncentrované kyseliny sírové a anhydridu kyseliny octové. Aby nedošlo k zuhelnatění vzorku vlivem případného výskytu sacharidů, rozpustí se vzorek nejdříve v chloroformu a přenesení se do kapiláry. Odděleně vzduchovou bublinou se přidá stejné množství anhydridu kyseliny octové a za další vzduchovou bublinou stejné množství kyseliny sírové. Dále se zataví konec kapiláry směřující ke vzorku a činidla se centrifugují k roztoku pryskyřice. Pokud

je přítomná kalafuna, má chloroformová vrstva fialovou barvu, ostatní pryskyřice barví hnědo-červeně. [55]

2.7 Instrumentální metody v analýze organických pojiv

Spolehlivější identifikaci dostaneme pomocí instrumentálních metod. Tyto metody poskytují kvalitativní i kvantitativní výsledky pro různé vrstvy malby. Kvalitativní analýza je neméně důležitá, protože může napomoci vodnému výběru analytické metody. K analýze organických pojiv se využívají spektrální, elektroforetické a chromatografické metody. [49]

Mezi spektrální metody patří IR spektrometrie často v kombinaci s Fourierovou transformací (FTIR). Většinou není potřeba před analýzou vzorek upravit. Lze také odlišit tenké vrstvy vzorku, které jsou mimo možnosti jiných metod. Mnoho organických látek má podobná IR spektra a na spektrální měření pak musí navazovat další metody, aby bylo možné rozhodnout konkrétněji o jaké pojivo (např. jaký olej) se jedná. Pomocí IR spektrometrie se dají identifikovat proteiny, triacylglyceridy, mastné kyseliny i pryskyřičné kyseliny a produkty jejich degradace. [3, 49, 56, 57]

V posledních dekesetiletí se při analýze organických látek v historických artefaktech uplatňuje nukleární magnetická rezonance (NMR). Dokáže charakterizovat molekulové struktury, ale má omezené použití u komplexních směsí pojiv, které se běžně vyskytují ve vzorcích barev. Je vhodná pro analýzu polymerních pojiv, ale může se použít také např. pro analýzu lněného oleje nebo vaječných proteinů. [58, 59]

K detailní analýze proteinových, případně pryskyřičných pojiv se využívá technika hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Hmotnostně spektrometrická detekce s jinými iontovými zdroji (elektronová ionizace, elektrosprej atd.) se často kombinuje s různými separačními metodami, např. plynovou nebo kapalinovou chromatografií. [60]

Různé druhy klišu bylo možné odlišit kapilární elektroforézou [58], ale mnohem častěji se v analýze pojiv využívá chromatografie. Orientační důkaz zajistí tenkovrstvá chromatografie. Je to jednoduchá a levná metoda, která se využívá pro orientační důkaz bílkovin, cukrů, vosků nebo terpenových pryskyřic. Vyžaduje odběr a rozpuštění vzorku, znalost typu látky, což určuje výběr stacionární a mobilní fáze, a znalost retenčních

faktorů nebo možnost jejich porovnání se standardy. Před použitím této metody se musí vzorek upravit a odstranit látky, které by mohly analýzu rušit. [58]

Velkou výhodou chromatografických metod je schopnost separace jednotlivých organických látek ze směsi jednotlivých vrstev. Většinou se používá kombinace plynové chromatografie (GC) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií (MS). Analýza pomocí GC-MS se zatím používá častěji než HPLC při analýze poživ, ať již sacharidových, proteinových nebo lipidových. [3, 58, 61, 62]

Před použitím chromatografických metod je potřeba provést vhodnou úpravu vzorku. Před separací monomerů je nutné provést hydrolyzu polymerních struktur. Kyselá hydrolyza je nejrozšířenější. Proteinová pojiva se mohou hydrolyzovat roztokem kyseliny chlorovodíkové. K hydrolyze polysacharidů se používá kyselina trifluoroctová, protože má oproti minerálním kyselinám výhodu, že je dostatečně těkavá a může být odstraněna lyofilizací. Lipidová pojiva podléhají alkalické hydrolyze. K tomu se používá hydroxid draselný v methanolu. Terpenoidy není třeba hydrolyzovat. [58]

Uvedený stručný přehled instrumentálních metod využívaných v materiálové analýze uměleckých děl pouze naznačuje jejich možnosti. Instrumentální metody dnes v této oblasti analytické chemie dominují, přesto je výhodné ověřovat a využívat mikrochemické reakce. Mnohdy to totiž dovolí následně zvolit vhodný postup instrumentální analýzy. Například informace o přítomném pojivu umožní vhodnou volbu přípravy vzorku pro plynovou chromatografii. Není třeba odebírat větší množství vzorku pro testování různých poživ přímo plynovou chromatografií. Na druhou stranu výsledky reakcí je třeba vnímat jako orientační a uvědomovat si jejich omezení.

Cíl práce

Cílem práce je ověření mikrochemických reakcí a zavedení postupů pro jejich provedení, což je umožní začlenit do systému analýzy uměleckých a historických předmětů na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Reakce však bude také možné využít pro didaktické účely, např. jako demonstrační experimenty či v laboratorním cvičení středoškolských studentů zaměřeném na analýzu maleb.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

V experimentech popisovaných v této práci byly použity následující chemikálie:

- 1-naftol p. a. (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- ethanol 96% p. a. kyselina sírová 96% p. a., kyselina chlorovodíková 35% p. a., chlorid železitý čistý, glycerin p. a., jod p. a. ACS, jodid draselný p. a., vinan sodno-draselný tetrahydrát p. a., 4-(dimethylamino)benzaldehyd p. a., kyselina octová 99% p. a., chloroform p. a., anhydrid kyseliny octové p. a. (vše PENTA Chemicals Unlimited, Praha, Česká republika)
- orcinol (zásoby – Katedra analytické chemie)
- síran měďnatý pentahydrát p. a., hydrogensíran draselný čistý, hydroxid sodný p. a., siřičitan sodný p. a., fuchsin basický indikátor (vše Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)

3.2 Použité analytické přístroje a metody

K vážení byly použity analytické váhy značky Mettler Toledo, model AB204 Analytical Balance (Mettler Toledo, Columbus, USA). Vysoušení některých vzorků a tání vosku probíhalo v sušárně Memmert UN260 (Memmert, Švabach, Německo). K přípravě roztoků ze špatně rozpustných látek byla použita čistička ultrazvuková Bandelin Sonorex Digitec DT100H (Bandelin electronic, Berlín, Německo). K měření byl použit spektrometr Thermo scientific Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fisher Scientific, Basilel, Švýcarsko). Měření bylo provedeno při rozsahu 4000-350 cm^{-1} technikou ATR (diamantový krystal). Počet skenů každého měření byl 25.

Ke všem reakcím bylo použito běžné laboratorní sklo z laboratoře pro kvalitativní analýzu. K reakcím v kapilárách byla použita mikropinzeta, preparační jehla a injekční stříkačky.

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Příprava standardů sacharidových pojiv

Nejprve byl na standardech ověřen průběh reakce. Standardy byly připraveny podle knihy Technika malby I, ve které jsou popsány obvykle používané poměry složek v barvách, které se běžně v malbách vyskytují. Jelikož v knize nebylo specifikováno, zda se jedná o poměry hmotnostní, objemové nebo smíšené, proto byly připraveny ve smíšených procentech (w/v). K reakcím byl z obvyklých rozmezí použit poměr odpovídající menšímu zastoupení pojiva.

Klovatiny se rozpouštěly pomalu, proto bylo rozpouštění prováděno v ultrazvukové lázni vyhřáté na teplotu 40°C. Škrob byl zahříván k varu a po povaření se rozpustil.

Tab. 10: Příprava sacharidových standardů s vodou (w/v)

Pojivo	Množství pojiva	Poměr pojivo : voda
arabská guma	0,0645 g	1:10
tragant	0,0796 g	1:40
škrob	0,0701 g	1:30

3.3.2 Reakce sacharidových pojiv

Molishova reakce

Odebral se 0,5 ml standardu a přikápl se k němu několik kapek 10% (w/v) 1-naftolu v 96% ethanolu. Následně byl po stěnách zkumavky přidán 1 ml koncentrované kyseliny sírové.

Bialova reakce

Bialovo činidlo bylo připraveno smícháním 0,005 g chloridu železitého s 0,5 ml destilované vody a tento roztok se smíchal s 0,5 g orcinolu v 200 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Následně se vzala tenčí kapilára se zúženým koncem, kvůli potřebě zatavení. Do kapiláry se umístil vzorek (standard) spolu s Bialovým činidlem a zúžený konec se nad plamenem zatavil. Kapilára se vložila do glycerolové lázně (glycerol ve zkumavce), ve které se nad plamenem asi minutu opatrně zahřívala.

Důkazová reakce škrobu

Lugolův roztok byl namíchan z 5 g jodu a 10 g jodidu draselného přidaných do 100 ml destilované vody. Na filtrační papír byl nanesen škrob a po zaschnutí na něj bylo nanášeno Lugolovo činidlo. Po zaschnutí činidla se pozorovaly výsledky. Reakce byla také provedena na kapkovací destičce.

3.3.3 Příprava standardů proteinových pojiv

Standardy proteinových pojiv (kožní kliš, kasein, vaječný bílek a vaječný žloutek) byly smíchány s vodou. Ke kaseinu se přidalo kvůli rozpustnosti 0,004 g hydroxidu sodného. Literatura uvádí kvůli rozpustnosti přidat amoniak, čemuž se bylo nutné vyhnout kvůli ovlivnění důkazové reakce dusíku. Klišové pojivo se rozpouštělo ve vodě velmi pomalu. Klišové a kaseinové pojivo se rozpouštěly v ultrazvukové lázni vyhřáté na 35° C. Standardy vaječných pojiv byly připravovány z čerstvých vajec. Potřebné množství žloutku nebo bílku se naředilo vodou a dalo do mikrozkušavky.

Tab. 11: Příprava proteinových standardů s vodou (w/v)

Pojivo	Množství pojiva	Poměr pojivo : voda
kasein	0,1 g	1:15
kožní kliš	0,1 g	1:25
vaječný bílek	0,33 ml	1:10
vaječný žloutek	0,5 ml	2:1

3.3.4 Reakce proteinových pojiv

Základní důkaz proteinů **Biuretovou reakcí** byl testován na kapkovací destičce. Biuretovo činidlo bylo připraveno rozpuštěním 0,15 g pentahydrátu síranu měďnatého a 0,6 g tetrahydrátu vlnanu sodno-draselného v 50 ml destilované vody. Po přidání 30 ml 10 % (m/m) hydroxidu sodného byl roztok doplněn vodou do 100 ml. Na destičku byly dány pomocí Pasteurovy pipety kapky pojiv. Roztoky se nechaly 30 minut zaschnout pod proudem vzduchu a poté k nim byly přidány dvě kapky Biuretova činidla. Při pozitivní reakci Biuretovo činidlo zčernalo.

Při zkoušce na přítomnost dusíku se suchý vzorek smíchal se stejným množstvím oxidu vápenatého a vložil do kapiláry. Z druhé strany kapiláry se vložil acidobazický indikátorový papírek navlhčený destilovanou vodou. Vzorek se žíhal nad kahanem. Když vzorek obsahoval proteiny, zbarvil se indikátorový papírek modře.

Detekce pyrrolových derivátů probíhala podobně. Vzorky poživ (připravené standardy i neznámé vzorky) se samotné vložily do kapiláry. Z druhé strany se vložil filtrační papír namočený v nasyceném roztoku 4-(dimethylamino)benzaldehydu v koncentrované kyselině octové. Vzorek se 3 minuty žíhal. Při detekci bílkovin se filtrační papírek zbarvil do růžovo-fialova.

3.3.5 Příprava standardů lipidových poživ

Jako standardy lipidových poživ byly zvoleny lněný olej lisovaný za studena, včelí vosk a z pryskyřic kalafuna a damar. Zatímco se olej a vosk použily jako standardy samostatně, pryskyřice se nechaly rozpustit v chloroformu (3 mg pryskyřice ve 3 ml chloroformu).

3.3.6 Reakce lipidových poživ

Důkaz vysychavých olejů

Do jednoho konce kapiláry se vložila směs vzorku a hydrogensíranu draselného, do druhého klín filtračního papíru, který se nejprve obarví 1% (w/v) roztokem fuchsinu ve vodě a poté se odbarví několika kapkami 1% (w/v) roztoku hydrogensířičitanu sodného. Vzorek se opatrně zahříval ve vrchní části plamene. Pokud obsahuje vysychavé oleje, při zahřívání se uvolní akrolein, který obnoví růžovou barvu na filtračním papíru.

Důkaz vosků

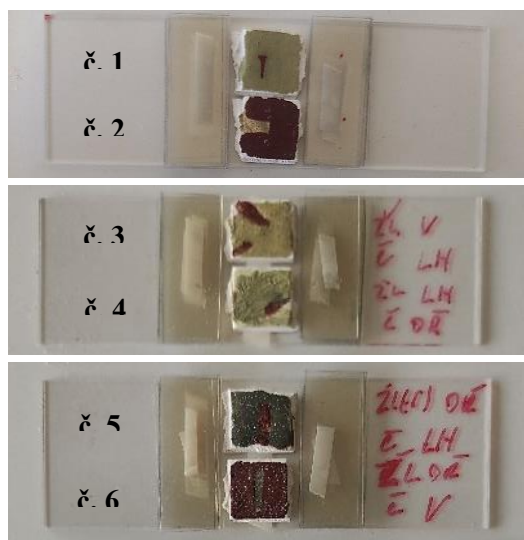
Nejdříve se nachystal filtrační papír, který se namočil v 1% (w/v) roztoku fuchsinu a umístil se na hodinové sklíčko. Na něj se položil vosk a dal se do sušárny nastavené na 70 °C na 7 minut. Po této době se vzorek vyjmul a nakápnul se na něj 10% (w/v) roztok siřičitanu sodného. V případě přítomnosti vosků nedošlo k odbarvení filtračního papíru siřičitanem v místě, kde se vzorek nacházel.

Storch-Morawkého reakce

Injekční stříkačkou se naplnila kapilára (v půlce) přibližně 0,3 ml koncentrované kyseliny sírové. Asi ve vzdálenosti 1 cm od kyseliny sírové se aplikoval stejný objem anhydridu kyseliny octové. Ze stejné strany se opět asi 1 cm od anhydridu aplikoval stejný objem pryskyřice rozpuštěné v chloroformu. Nelze použít pevný vzorek. Jeho rozpuštěním ve chloroformu se eliminuje přítomnost sacharidů, které ruší reakci.

3.3.7 Ověření reakcí na modelových vzorcích

Dostupné modelové vzorky sloužily jako další krok pro ověření ověřovaných reakcí. Tyto vzorky pocházely z Katedry analytické chemie. Každý vzorek obsahoval dvě barvy (červený pigment (Fe_2O_3) Bolo Armeno (Zecchi, Florencie, Itálie); žlutý pigment (PbO) Massicot (Kremer Pigmente, Aichstetten, Německo)) s rozdílným pojivem (viz tab. 12). Jednalo se o vaječný žloutek, lněný a ořechový olej. Podklad malby tvořila omítka.



Obr. 12: Modelové vzorky č. 1-6

Tab. 12: Obsažená pojiva v jednotlivých modelových vzorcích

Vzorek	Barva	Pojivo	Barva	Pojivo
č. 1	žlutá	vaječný žloutek	červená	ořechový olej
č. 2	červená	vaječný žloutek	žlutá	lněný olej
č. 3	žlutá	vaječný žloutek	červená	lněný olej
č. 4	žluto-zelená	lněný olej	červená	ořechový olej
č. 5	šedo-zelená	ořechový olej	červená	lněný olej
č. 6	červená	vaječný žloutek	šedo-zelená	ořechový olej

3.3.8 Testování mikrochemických reakcí na vzorcích temper a akvarel

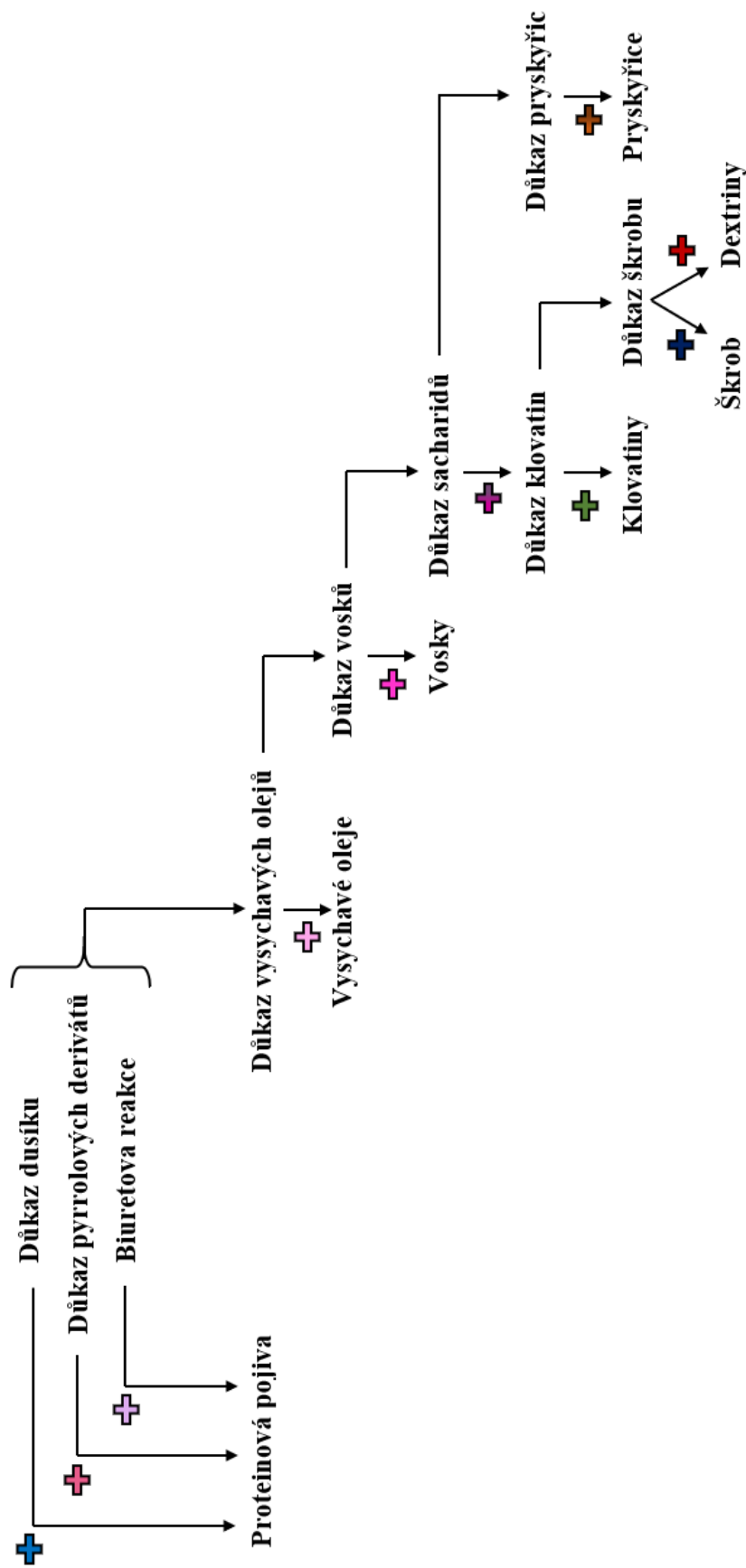
Vzorky dvou temper a dvou akvarel sloužily jako „neznámé“ vzorky. Nebylo u nich uvedeno, která pojiva obsahují, proto byly otestovány na všechny typy pojiv. Dvě tempery značky KOH-I-NOOR HARDTMUTH, odstíny Zelená tmavá a Rumělka červená, a dvě barvy akvarelové od výrobce Winsor & Newton, Cotman Watercolours odstíny Prussian blue a Burnt umber byly zakoupeny v běžném obchodě s výtvarnými potřebami.



Obr. 13.: Barvy použité k testování reakcí jako neznámé vzorky

Neznámé vzorky byly testovány jednotlivými reakcemi (viz Schéma I). Pro každou reakci byla použita nová navážka vzorku.

Schéma I: Pořadí prováděných mikrochemických reakcí na neznámém vzorku



+ pozitivní reakce (barvy symbolu odpovídají barevné změně při pozitivní reakci)

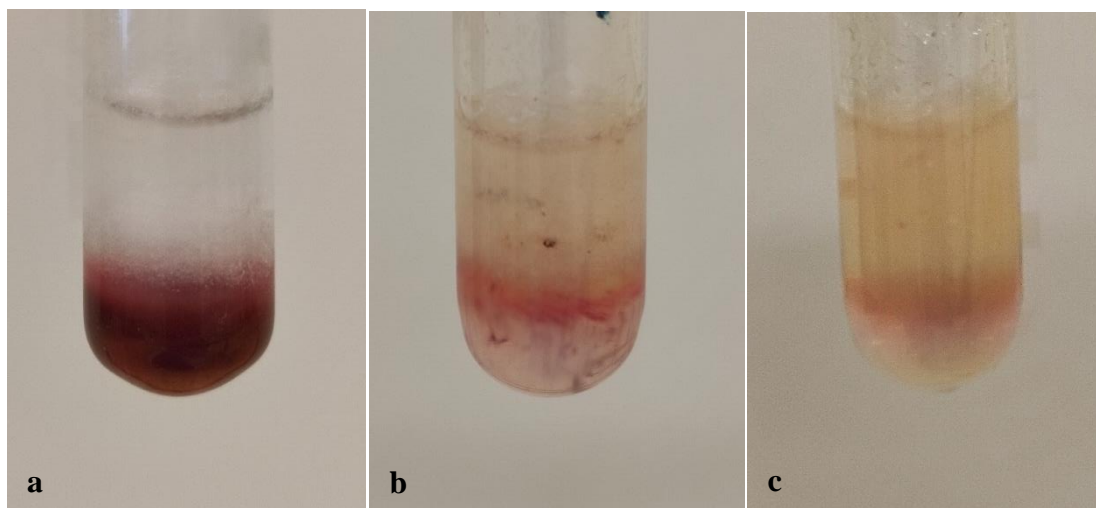
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Při většině reakcí prováděných v kapiláře se pracuje v uspořádání s jedním zataveným koncem. Kvůli silné tloušťce skla používaných kapilár konce nebyly zatavovány. Z tohoto důvodu byla kapilára nad plamenem držena ze začátku vodorovně. S postupným přitavením vzorku ke kapiláře se mohla kapilára naklonit, aby došlo k vývinu plynu směrem k požadovanému konci kapiláry.

4.1 Reakce standardů sacharidových pojiv

Molishova reakce

Nejrychlejší a nejintenzivnější reakce byla pozorována u arabské gumy, vybarvení proběhlo do 1 minuty. Následoval tragant, který poskytoval méně intenzivní zbarvení a vybarvení proběhlo do 3 minut. Zbarvení vzniklé reakcí škrobu bylo nejméně intenzivní a projevilo se za 5 minut.



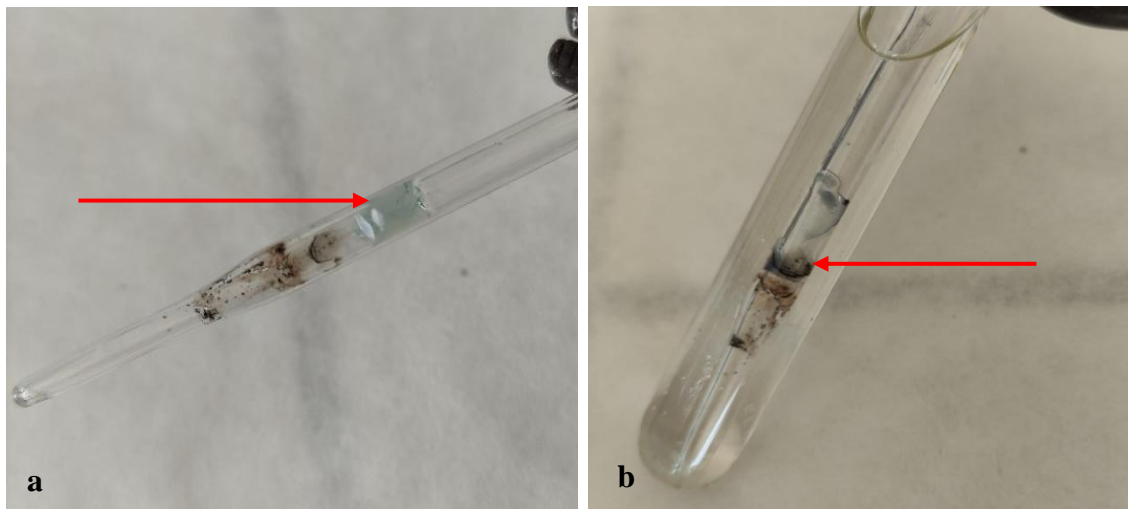
Obr 14: Výsledky Molishovy reakce s arabskou gumou (a), tragantem (b) a škrobem (c)

Bialova reakce

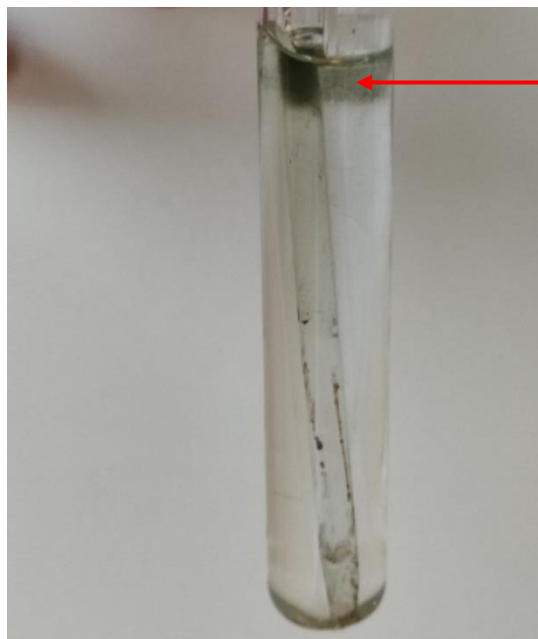
Při zahřívání kapilár se vzorek a Bialovým činidlem docházelo k bouřlivé reakci a reakční směs unikala z kapiláry. Bylo potřeba držet kapiláru spíše výš nad plamenem,

kde je menší teplota. I tak ale docházelo k úniku látek ještě před tím, než stačily reagovat. Pomocí preparační jehly bylo nutné zajistit, aby stekly zpět dolů do kapiláry.

Tragant se zbarvil zeleně už během zatavování kapiláry, i přes to byla kapilára vložena do glycerolové lázně a zahřívána nad plamenem. Vzorek asi po minutě zmodral. Arabská guma během tavení kapiláry nereagovala, změna barvy proběhla až při zahřívání v glycerolové lázni. Pozitivní výsledek reakce je na obrázcích označen šipkou.



Obr. 15: Výsledek Bialovy reakce s tragantem (a) a jeho další zahřívání v glycerolové lázni (b)



Obr. 16: Výsledek Bialovy reakce s arabskou gumou

Důkazová reakce škrobu

Lugolovo činidlo reagovalo okamžitě se škrobovým mazem za tvorby tmavě modrého zbarvení. Reakce byla provedena na kapkovací destičce i na filtračním papíře. Výsledek reakce se zaschlým škrobem na filtračním papíře byl viditelný až po zaschnutí Lugolova činidla. Pro porovnání bylo činidlo smícháno i s tragantem.



Obr. 17: Důkazová reakce škrobu na kapkovací destičce



Obr. 18: Důkazová reakce zaschlého škrobu na filtračním papíře

4.2 Reakce standardů proteinových pojiv

Biuretova reakce

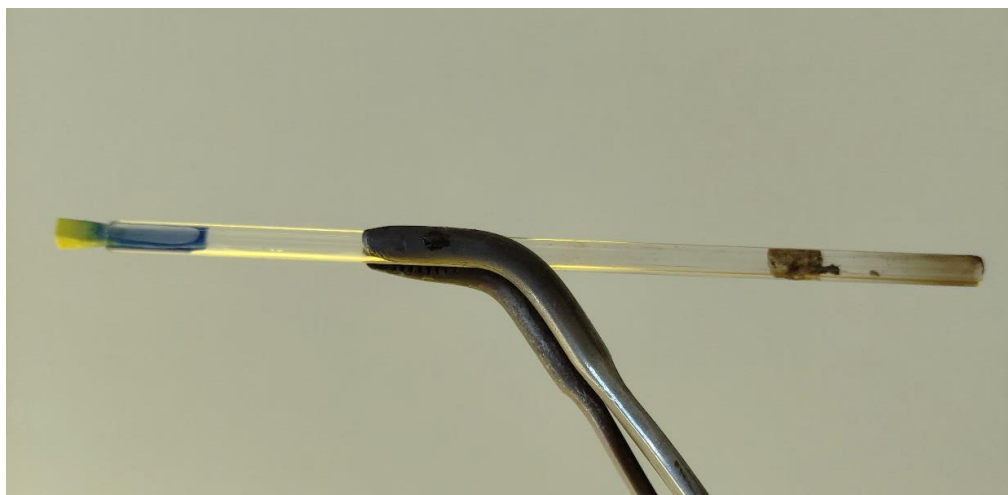
Téměř okamžitě se fialově zbarvil vaječný bílek následovaný kaseinem a kožním kličem. Vaječný žloutek se zbarvil až za 4 minuty. To mohl způsobit fakt, že je žloutek po vyschnutí ve vodě nerozpustný, což mohlo ovlivnit průběh reakce s Biuretovým činidlem.



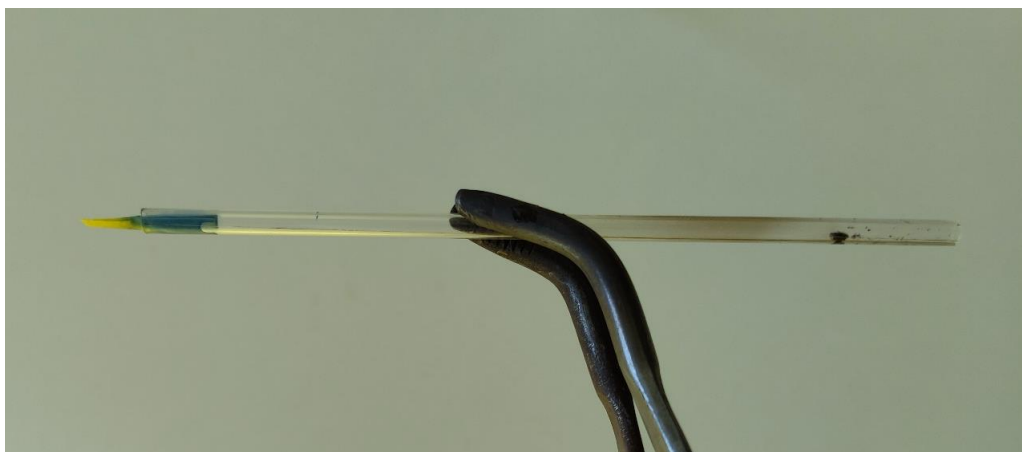
Obr. 19: Výsledek Biuretovy reakce s proteinovými standardy na kapkovací destičce

Důkaz dusíku

Vzorky se sušily 20 minut pod proudem vzduchu. Po 1–2 minutách tavení suchého vzorku byl vidět pozitivní výsledek reakce. pH indikátorový papírek se zbarvil intenzivně modře. Rychlost reakce u všech standardů byla téměř stejná. Žloutku bylo odebráno větší množství, a proto se zbarvilo více papírku.



Obr. 20: Pozitivní důkazová reakce na dusík u žloutku



Obr 21: Pozitivní důkazová reakce na dusík u kaseinu



Obr. 22: Pozitivní důkazová reakce na dusík u vaječného bílku



Obr. 23: Pozitivní důkazová reakce na dusík u kožního klišu

Důkaz pyrrolových derivátů

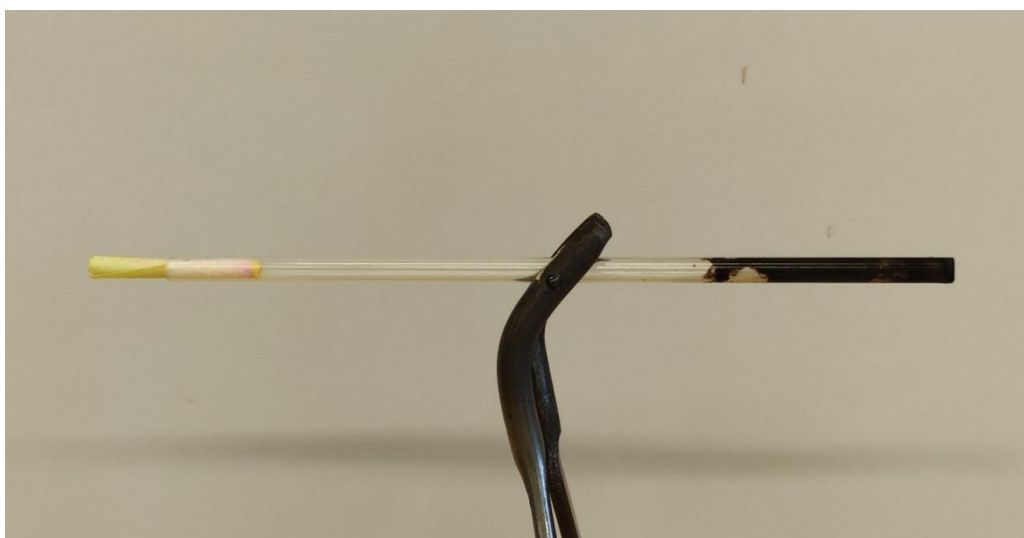
Po zhruba 2 minutách žihání se začal filtrační papír obarvovat na růžovo-fialovo. Nejvýraznější reakce byla pozorována u vaječného bílku a kožního klišu a nejméně výrazná u vaječného žloutku.



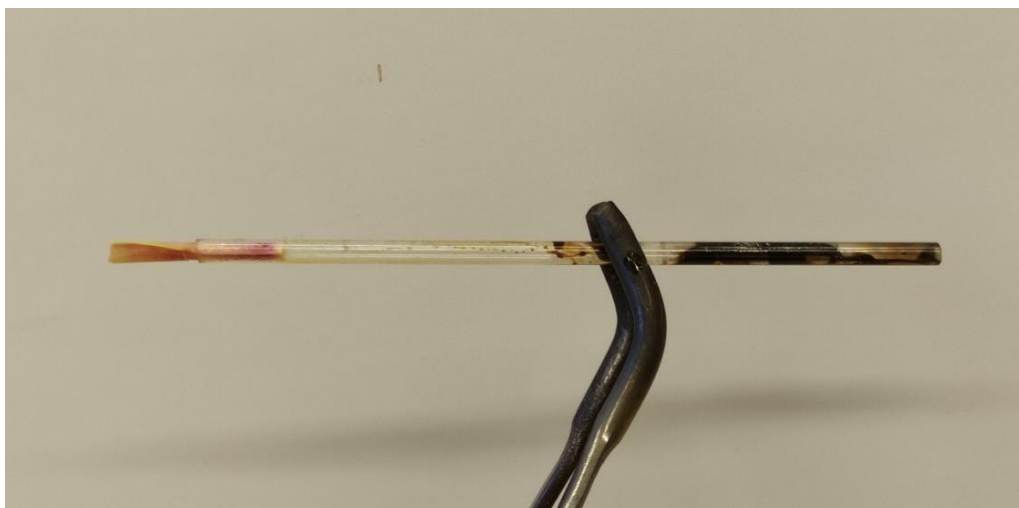
Obr. 24: Pozitivní reakce na pyrrolové deriváty u kaseinu



Obr. 25.: Pozitivní reakce na pyrrolové deriváty u kožního klišu



Obr. 26: Pozitivní reakce na pyrrolové deriváty u vaječného žloutku



Obr. 27: Pozitivní reakce na pyrrolové deriváty u vaječného bílku

4.3 Reakce standardů lipidových pojiv

Důkaz vysychavých olejů

Kvůli nedostupnosti hydrogensířičitanu sodného se k odbarvení fuchsinového barviva použil nejprve 1% (w/v) roztok sířičitanu sodného, který ale fuchsin neodbarvil. Proto byl připraven 10% (w/v) roztok sířičitanu sodného. Jelikož znovu nedošlo k odbarvení 1% (w/v) fuchsinu, byl připraven 0,01% (w/v) roztok fuchsinu. Ten se již 10% (w/v) roztokem sířičitanu odbarvoval. Oba roztoky se na filtrační papír nanášely Pasteurovou pipetou. V budoucnu by bylo rozhodně dobré otestovat odbarevní 1% fuchsinu roztokem hydrogensířičitanu sodného. Roztok sířičitanu musí být čerstvý, zhruba po 4-5 hodinách přestává fuchsin odbarvovat.

Filtrační papír se začal zbarvovat růžovo-fialově po pár minutách žihání.

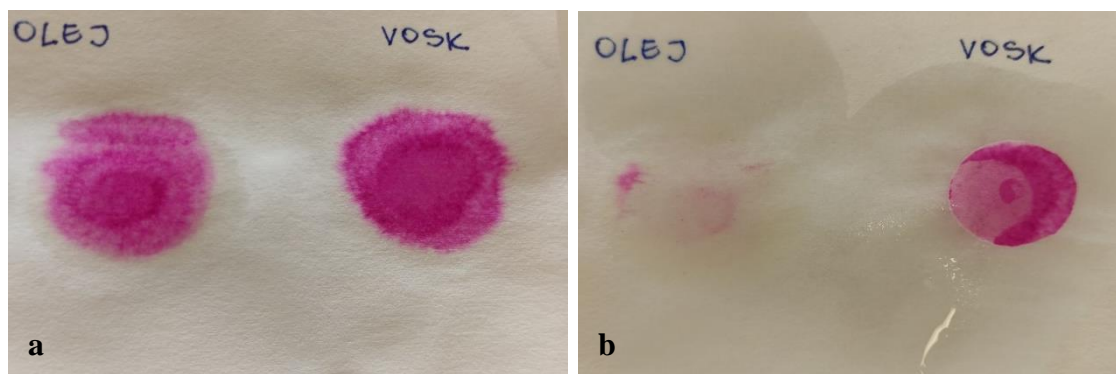


Obr. 28: Pozitivní reakce lněného oleje (znovuzbarvení filtračního papírku s fuchsinem)

Důkaz vosku

10% (w/v) siřičitan sodný neodbarvil 1% (w/v) roztok fuchsinu, byl použit 0,01% (w/v) roztok fuchsinu, který se siřičitanem odbarvil.

Roztátý vosk přilnul na filtrační papír. Roztok siřičitanu sodného se přes tuhou vrstvičku vosku nedostal k filtračnímu papíru, okamžitě se však odbarvilo okolí, kde vosk nebyl. Olej se až na drobné skvrnky úplně odbarvil.

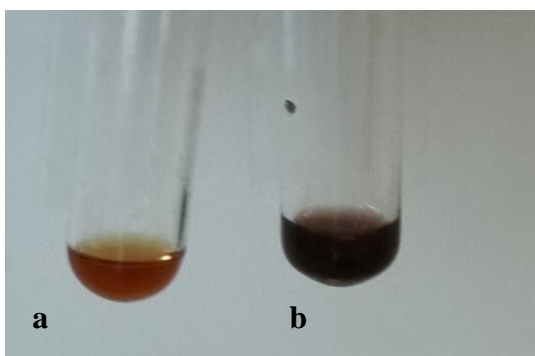


Obr. 29: Srovnání negativní a pozitivní reakce na důkaz vosků s olejem a voskem (a) před přidáním siřičitanu, (b) po přidavku syřičitanu

Storch-Morawského reakce

Při vnášení roztoku pryskyřice do kapiláry docházelo snadno k vystříknutí roztoku a promíchání všech složek v kapiláře ještě předtím, než mohlo dojít k zatavení jednoho konce. Reakce v takovém případě neproběhla.

Z tohoto důvodu byl postup upraven tak, že se ve zkumavce smíchaly 2 kapky roztoku pryskyřic s 1 ml anhydridu kyseliny octové. Tato směs se zahřívala nad kahanem do doby, než začala vařit. Po povaření (1-2 minuty) vznikl světlý žluto-oranžový roztok. Ten se odstavil z plamene a asi 20 minut se nechal chladnout. Následně se po kapkách přidávala koncentrovaná kyselina sírová a došlo v případě pozitivní reakce ke zbarvení roztoku. Damaru zbarvila po pár kapkách do hnědo-červena, kalafuna vytvořila po pár kapkách tmavé fialovo-hnědé zbarvení, které se zesílilo s přidáním většího množství kyseliny sírové.



Obr. 30: Pozitivní reakce na důkaz pryskyřic se standardy damarou (a) a kalafunou (b)

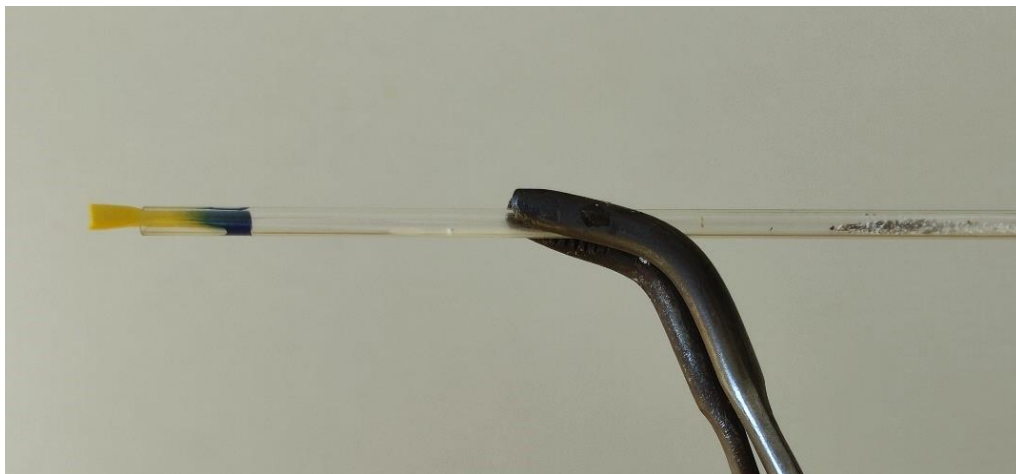
4.4 Důkazové reakce na modelových vzorcích

Odebírání vzorků z povrchu omítek a následné vložení do kapilár bylo problematické. Barevná vrstva nešla odloupnout, musela být seškrábnuta po malých částech, které se špatně nabíraly i mikropinzetou. V odebraných vzorcích se nacházely i větší části omítky.

Ověřovací chemické reakce byly prováděny se vzorky z „velkých“ ploch modelových vzorků. U „malých“ ploch vzorků č. 1 a 2 byly reakce negativní pravděpodobně kvůli malému množství malby, které mohlo být odebráno. Z tohoto důvodu nebyly na dalších modelových vzorcích „malé“ plochy analyzovány.

Vzorek č. 1 obsahoval plochu „malby“ s vaječným žloutkem a plochu s ořechovým olejem. Ze žloutkové části byl odebrán 1 mg barevné vrstvy, přidáno stejné množství oxidu vápenatého a byla provedena důkazová reakce na dusík, která byla pozitivní. Z olejové části bylo možné odebrat ~ 0,3 mg a byla provedena důkazová reakce

na oleje. Tato reakce byla negativní, protože množství pojiva bylo pravděpodobně pod limitem detekce.



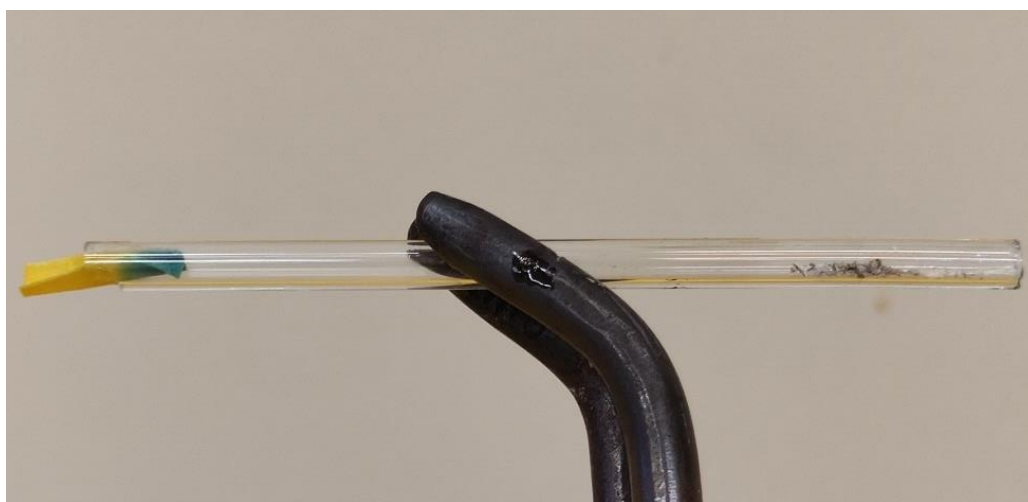
Obr 31: Pozitivní důkazová reakce na dusík ze žloutkového pojiva vzorku č. 1 ~ 1 mg

Vzorek č. 2 obsahoval plochu s vaječným žloutkem a plochu se lněným olejem. Ze žloutkové části byl odebrán 1 mg a byla provedena důkazová reakce dusíku, které byla pozitivní. Z olejové části vzorku bylo odebráno 0,4 mg vzorku. Důkazová reakce olejů byla negativní nejspíše opět kvůli malému množství vzorku.



Obr. 32: Pozitivní důkazová reakce na dusík ze žloutkového pojiva vzorku č. 2 ~ 1 mg

Vzorek č. 3 obsahoval vaječný žloutek a lněný olej. Protože nebylo možné z olejové části odebrat potřebné množství vzorku k důkazové reakci, začaly se odebírat vzorky pro reakce pouze ze žloutkové části, která měla větší plochu. Ze žloutkové části se podařilo odebrat 8,8 mg a vzorek byl podroben důkazové reakci na dusík, která byla pozitivní.



Obr. 33: Pozitivní důkazová reakce na dusík ze žloutkového pojiva vzorku č. 3 ~ 9 mg

Část se lněným olejem vzorku č. 4 byla podrobena důkazové reakci vysychavých olejů. Bylo odebráno 3,1 mg. Filtrační papír se nepatrně zbarvil do světle růžova. Okem bylo zbarvení vidět lépe než na fotografii. Důkazová reakce vysychavých olejů nebyla u části s ořechovým olejem kvůli malému množství vzorku prováděna.



Obr. 34: Pozitivní důkazová reakce na vysychavé oleje ze vzorku č. 4 ~ 3 mg

Z části vzorku č. 5 s ořechovým olejem bylo odebráno 4,4 mg a byla provedena důkazová reakce na přítomnost vysychavých olejů. Filtrační papír se zbarvil o trošku více, než u vzorku č. 4, ale zbarvení bylo nejvíce patrné uprostřed zamotaného filtračního papíru. Reakce části vzorku se lněným olejem se kvůli malému povrchu malby neprováděla.



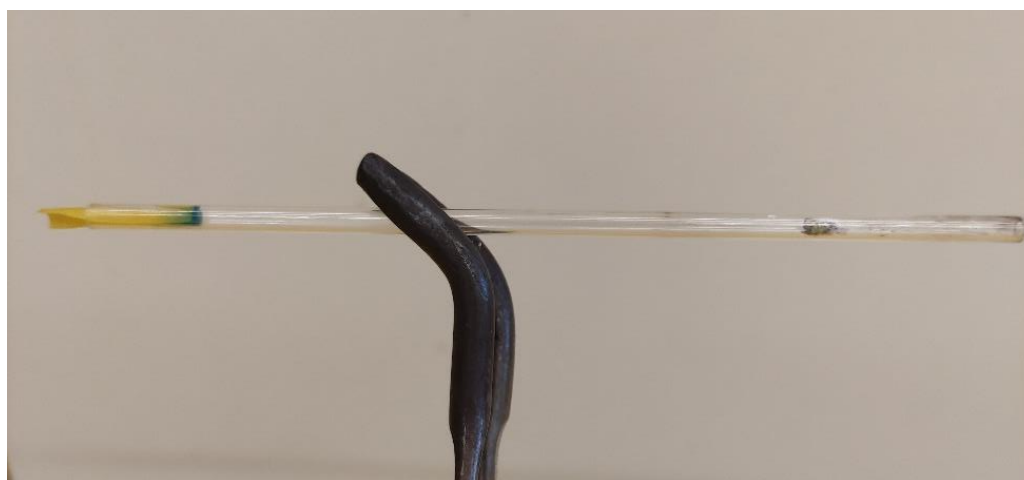
Obr. 35: Detail výsledku důkazové reakce vysychavých olejů vzorku č. 5 ~ 4 mg

Žlutková část vzorku č. 6 se odebírala lépe, protože byla mnohem méně křehčí než barevné vrstvy předcházejících vzorků. Nejprve bylo odebráno 4,8 mg vzorku a toto množství bylo podrobena důkazové reakci na dusík. Indikátorový papírek se zbarvil zeleně, což naznačovalo vznik malého množství produktu, tedy bylo k dispozici malé množství vzorku. Reakce byla zopakována s 10 mg. S tímto množstvím vzorku se zbarvil

začátek indikátorového pH papírku modře, dále byla barva zelená. K vybarvení indikátorového papírku do modra bylo potřeba větší množství vzorku než u předcházejících reakcí. To by mohlo být dáno např. menším množstvím pojiva v barvě a popř. obsahem jiných látek ovlivňujících výsledek reakce.



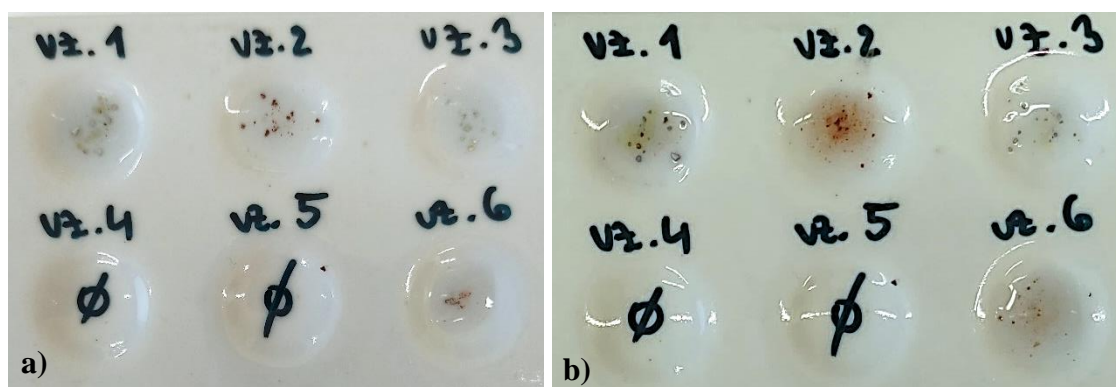
Obr. 36: Výsledek důkazové reakce na dusík u vzorku č. 6 z 5 mg vzorku



Obr. 37: Výsledek důkazové reakce na dusík u vzorku č. 6 z 10 mg vzorku

Modelové vzorky obsahující žlutek byly podrobeny Biuretové reakci. Hmotnost odebraných vzorků se pohybovala okolo desetiny miligramu. S touto navázkou reakce probíhala velmi pomalu a změna zbarvení nebyla příliš intenzivní. U vzorku č. 1 bylo

zbarvení pozorovatelné za 30 minut. Za další 3 minuty se zbarvil vzorek č. 3. Zbarvení vzorků č. 2 a č. 6 bylo nevýrazné pravděpodobně kvůli interferujícímu zbarvení pigmentů (vzorek č. 6 poskytl o něco výraznější zbarvení).



Obr. 38 Biuretova reakce modelových vzorků obsahujících žloutek (a) před přidáním Biuretova činidla, (b) po zreagování Biuretova činidla se vzorky

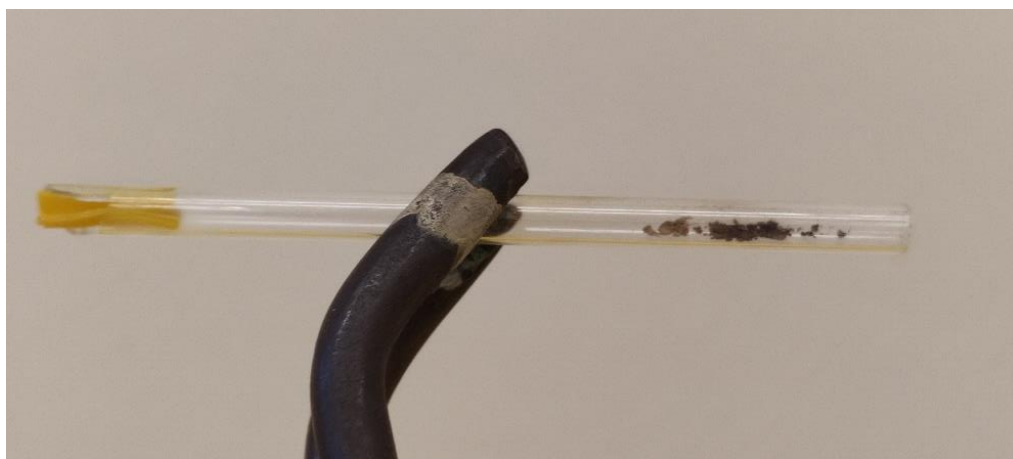
4.5 Důkazové reakce při analýze neznámých vzorků

Důkazové reakce na neznámých vzorcích byly provedeny podle schématu na straně 37.

Mikrochemické reakce temperových barev

Temperové barvy se po vysušení snadno odebíraly. Nejdříve byla provedena zkouška na dusík, která byla negativní, stejně jako důkaz pyrrolových derivátů a Biuretova reakce. Nebyla tak prokázána přítomnost proteinů. Zkouška vysychavých olejů byla pozitivní, i když výsledné zbarvení filtračního papíru nebylo moc výrazné. Reakce na důkaz vosků byla negativní. Následoval důkaz sacharidů. Molishova reakce byla pozitivní, výsledné fialové zbarvení bylo intenzivní. Důkaz rostlinných gum byl pozitivní, ale i tady se špatně pozoroval výsledek u zelené tempery, protože zelený pigment překrýval barvu reakční směsi. Reakce byly nejdříve prováděny ve větších kapilárách bez zatavení, ale kvůli velmi bouřlivé reakci vzorků s Bialovým činidlem musely být prováděny v malé kapiláře se zataveným koncem. Přes to byla reakce bouřlivá a reakční směs unikala z kapiláry. Bylo potřeba ji držet výš nad plamenem několik minut

a poté kapiláru zahřívát v glycerolové lázni. Důkazová reakce škrobu byla negativní při 2,2 mg zelené tempéry a při 1,9 mg červené tempéry smíchaných vždy se 100 μ l vody. Negativní byla rovněž důkazová reakce na pryskyřice, při které po přidání kyseliny sírové roztok změnil barvu z oranžové na růžovou, ale to bylo způsobené nejspíše interakcí ostatních látek v barvě.



Obr. 39: Negativní reakce červené tempéry při důkazu dusíku při ~ 10 mg vzorku



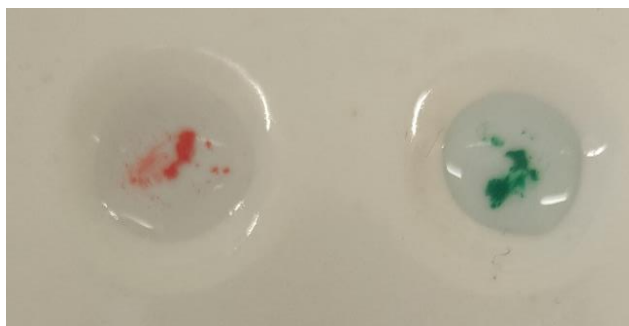
Obr. 40: Negativní reakce zelené tempéry při důkazu dusíku při ~ 10 mg vzorku



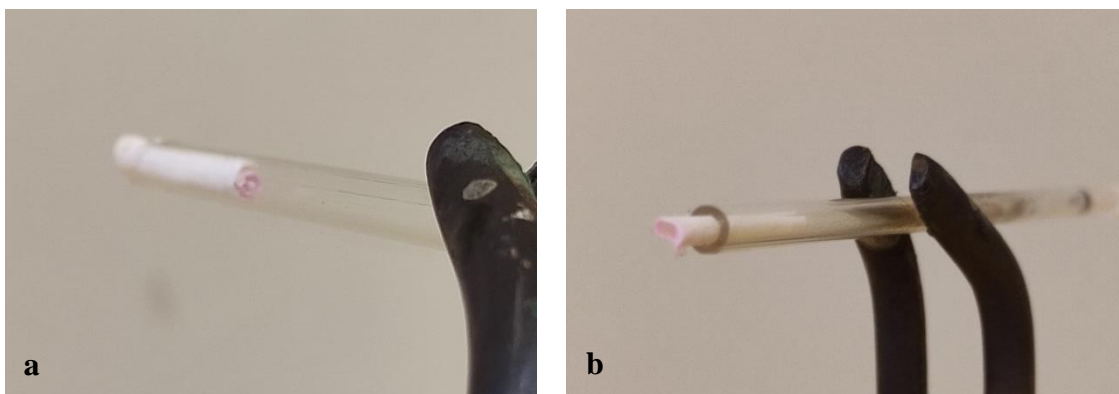
Obr. 41: Negativní důkaz červené tempéry na pyrrolové deriváty při ~ 7 mg vzorku



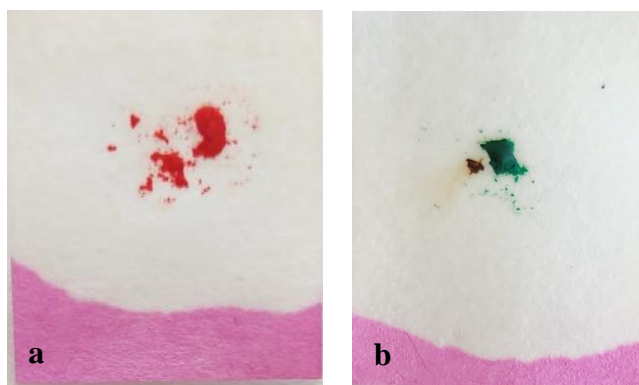
Obr. 42: Negativní důkaz zelené tempéry na pyrrolové deriváty při ~ 9 mg vzorku



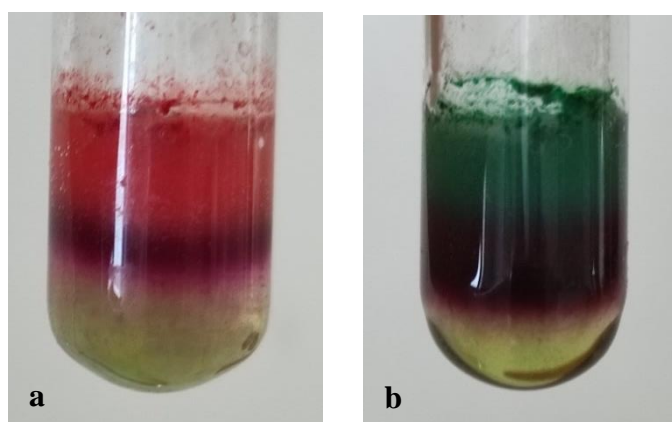
Obr. 43: Negativní Biuretova reakce červené (~ 21,1 mg) a zelené tempéry (~ 28,6 mg)



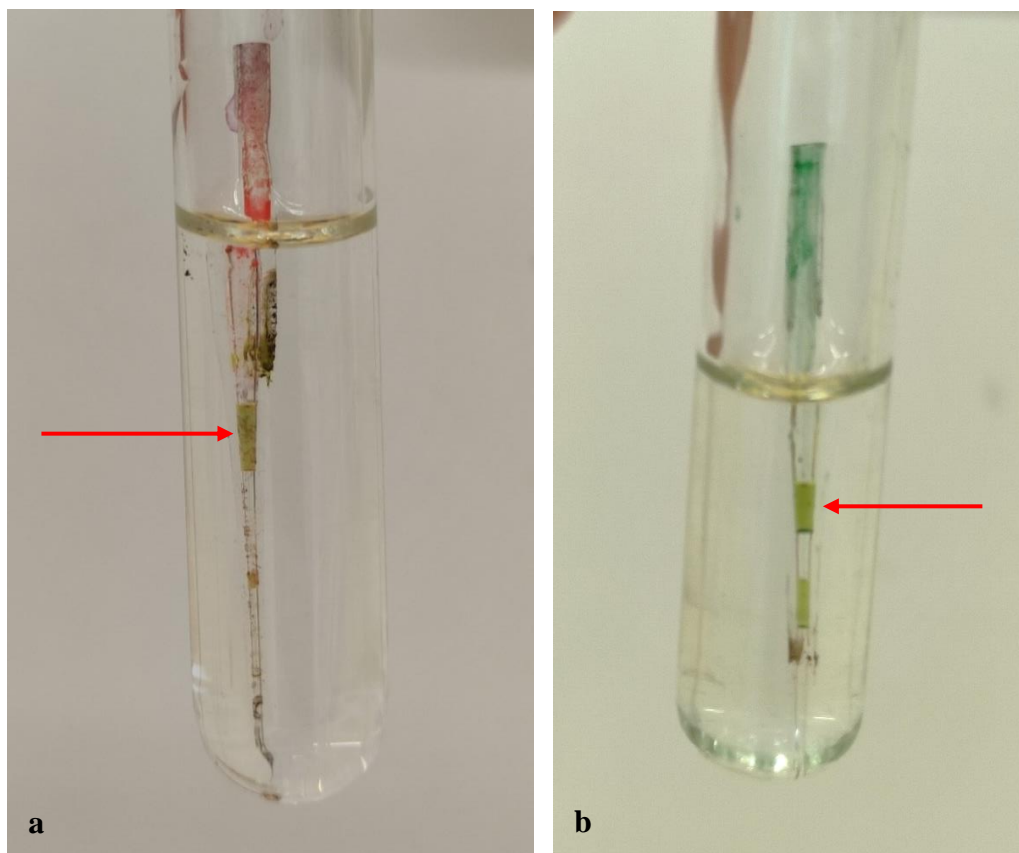
Obr. 44: Pozitivní reakce temper na vysychavé oleje (a) červené tempery ~ 28 mg vzorku, (b) zelené tempery ~ 13 mg vzorku



Obr. 45: Negativní reakce na přítomnost vosků (a) u červené tempery ~ 0,5 g, (b) u zelené tempery ~ 0,4 g



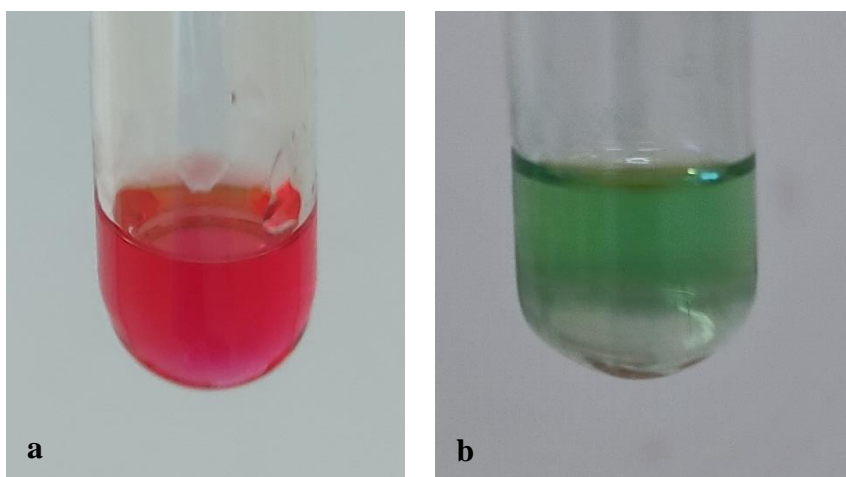
Obr. 46: Pozitivní Molishova reakce (a) červené tempery při 22,3 mg (b) zelené tempery při 43,1 mg



Obr. 47: Pozitivní Bialova reakce u (a) červené temperry při ~ 0,8 mg, (b) zelené temperry při ~ 2,2 mg, pozitivní výsledek je označen šipkou



Obr. 48: Negativní reakce důkazu škrobu u zelené temperry při ~ 2,2 mg a červené temperry při ~ 01,9 mg



Obr. 49: Negativní reakce (a) červené tempery při 51,1 mg, (b) zelené tempery při 64,4 mg na přítomnost pryskyřic

V temperových barvách byla mikrochemickými reakcemi prokázána přítomnost vysychavých olejů a rostlinných gum. Další druhy pojiv nebyly detekovány.

Mikrochemické reakce akvarelových barev

Akvarelové barvy vykazovaly negativní reakce na přítomnost bílkovin. Modrá akvarela dávala ale pozitivní zkoušku na dusík. Obsahuje jako pigment hexakynoželeznatan železitý, o kterém je známo, že ruší reakci. Na rozdíl od barev temperových byly suché vzorky při odebrání velmi tvrdé. Již to naznačuje, že barvy neobsahují oleje. Zkouška na vosky byla negativní. Tomu rovněž odpovídala velmi dobrá rozpustnost barvy ve vodě a následné odbarvení filtračního papíru při důkazu vosků. Důkaz sacharidů byl pozitivní, stejně tak i Bialova reakce, která ale probíhala velmi bouřlivě a barvy při některých pokusech vystříkly z kapiláry. Důkaz škrobu byl negativní při 3,2 mg modré akvarely a 4,1 mg hnědé akvarely rozpuštěných ve 100 μ l vody. Důkaz pryskyřic neproběhl z důvodů nerozpustnosti vzorku v chloroformu, tím byla přítomnost pryskyřic vyloučena.



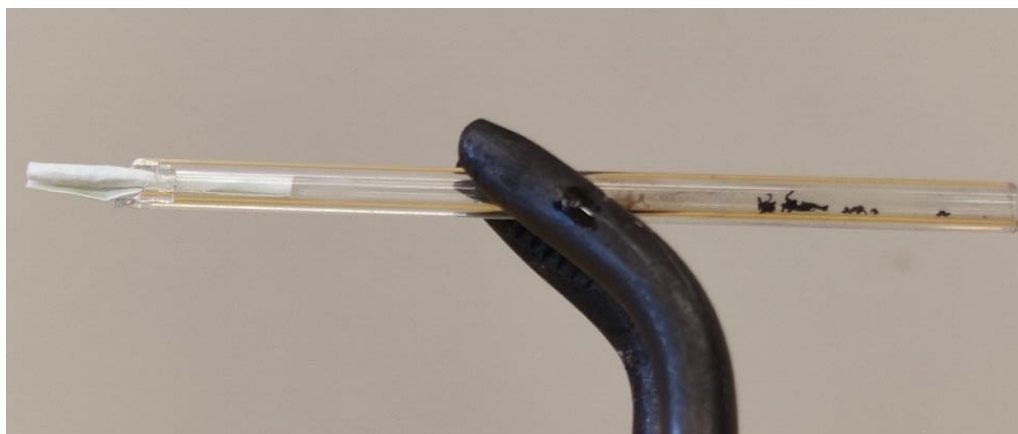
Obr. 50: Pozitivní důkazová reakce modré akvarely na dusík (při ~2,2 mg)



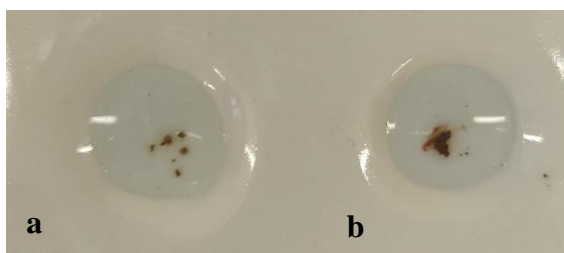
Obr. 51: Negativní důkazová reakce hnědé akvarely na dusík (při ~ 5,4 mg)



Obr. 52: Negativní důkazová reakce modré akvarely na pyrrolové deriváty (při ~ 30,1 mg)



Obr. 53: Negativní důkazová reakce hnědé akvarely na pyrrolové deriváty (při ~ 25,1 mg)



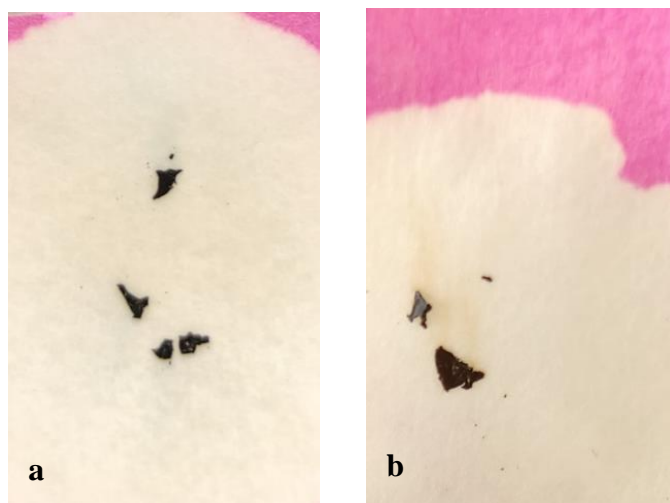
Obr. 54: Negativní Biuretova reakce s modrou akvarelou při 3,3 mg (a) a hnědou akvarelou při 8,7 mg (b)



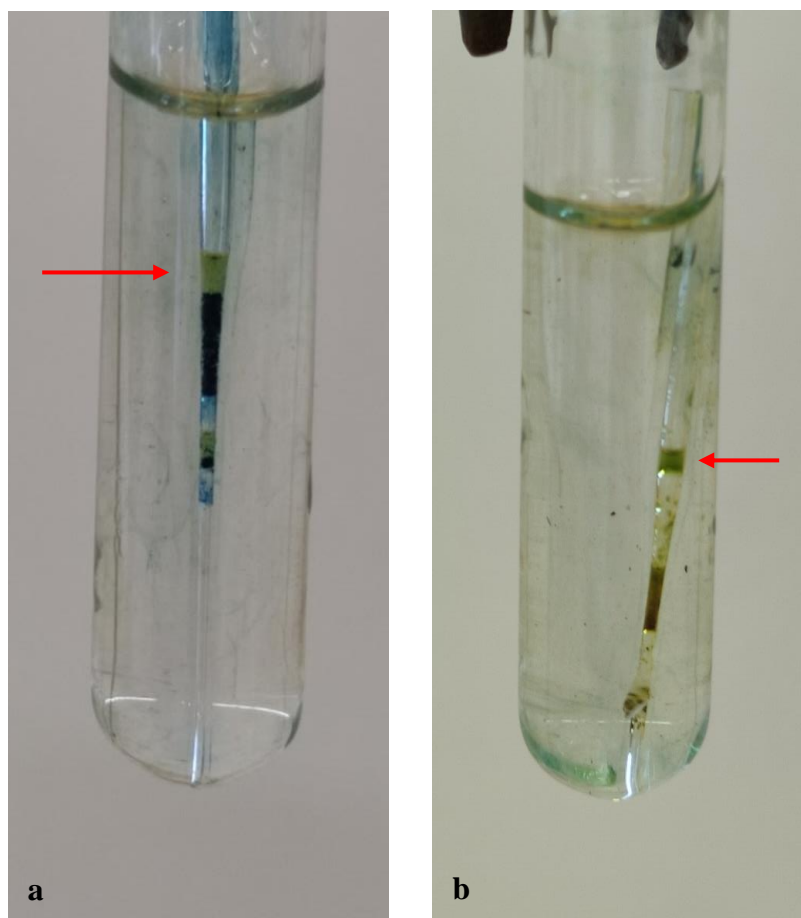
Obr. 55: Negativní důkazová reakce modré akvarely na vysychavé oleje (při ~ 34,1 mg)



Obr. 56: Negativní důkazová reakce hnědé akvarely na vysychavé oleje (při ~ 54,1 mg)



Obr. 57: Negativní důkazová reakce na vosky (a) v modré akvarele (při ~41,8 mg), (b) v hnědé akvarele (při ~ 53 mg)



Obr. 58: Pozitivní důkazová reakce na rostlinné gummy (a) v modré akvarele při ~ 3 mg, (b) v hnědé akvarele při 7 mg, pozitivní výsledek je označen šipkou



Obr. 59: Negativní reakce akvarelových barev při důkazu škrobu při ~3 mg u modré akvarely a ~4 mg u hnědé akvarely

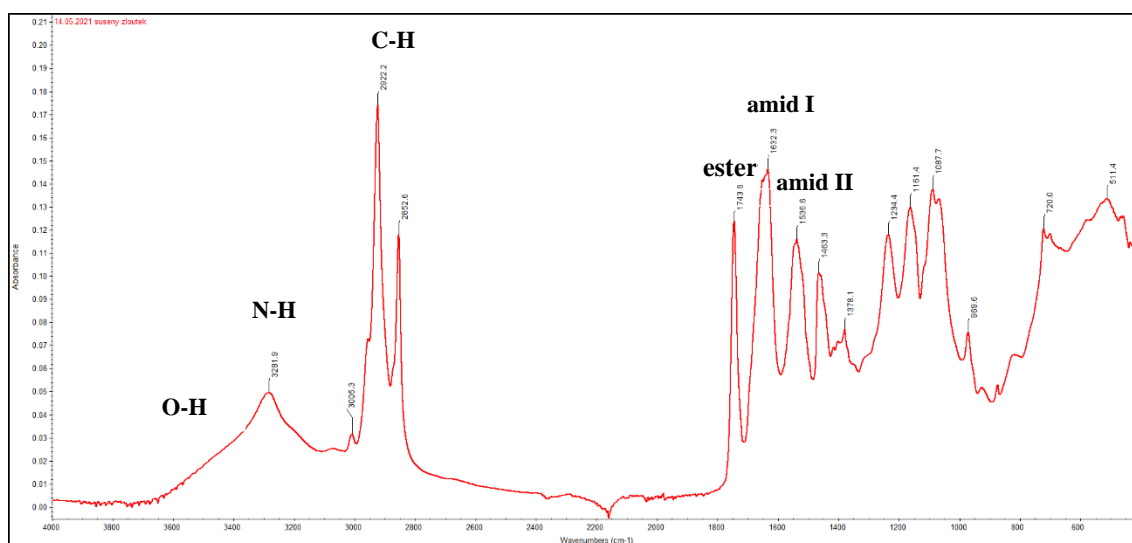
Akvarelové barvy byly podrobeny důkazovým reakcím na přítomnost přírodních pojiv. Byly v nich detekovány rostlinné gummy Bialovou reakcí. Ostatní důkazové reakce pojiv byly negativní. Výjimka nastala u modré akvarelové barvy při důkazové reakci dusíku. Kvůli přítomnosti pigmentu Pruské modři, ve které se dusík vyskytuje, dala pozitivní reakci.

4.6 Analýza modelových vzorků pomocí FTIR spektrometrie

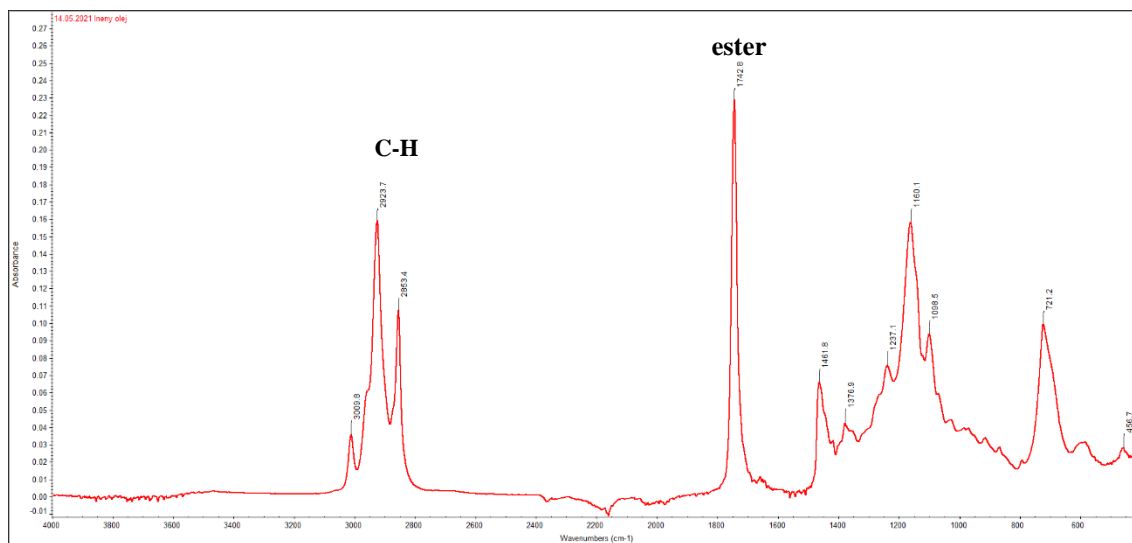
Mikrochemické reakce mohou být přínosné jako orientační zkoušky. Pro potvrzení přítomnosti pojiv se využívají instrumentální analytické metody, především spektrální a separační. Pro porovnání s výsledky důkazových reakcí byla v této práci využita FTIR analýza.

Bylo provedeno měření sušeného žloutku a surového lněného oleje, aby se mohlo porovnat spektrum samotného pojiva se spektry vzorků, které mimo pojiva obsahují i další látky. V ATR spektrech se nachází píky při vlnočtu $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, které odpovídají O-H a N-H vibracím. Píky při vlnočtu $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ odpovídají valenční vibraci vazby C-H. V rozmezí $1750\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ ukazují píky na přítomnost esterů. Signál v rozmezí $1650\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ resp. kolem 1540 cm^{-1} ukazuje na přítomnost amidů. U žloutkových pojiv se dají pozorovat výrazné signály C-H vazeb a esterů kvůli lipidům, které se ve žloutku vyskytují. Výrazný je signál amidů, které potvrzují přítomnost proteinů. Žloutkové pojivo obsahuje také na rozdíl od lněného oleje polární O-H skupiny

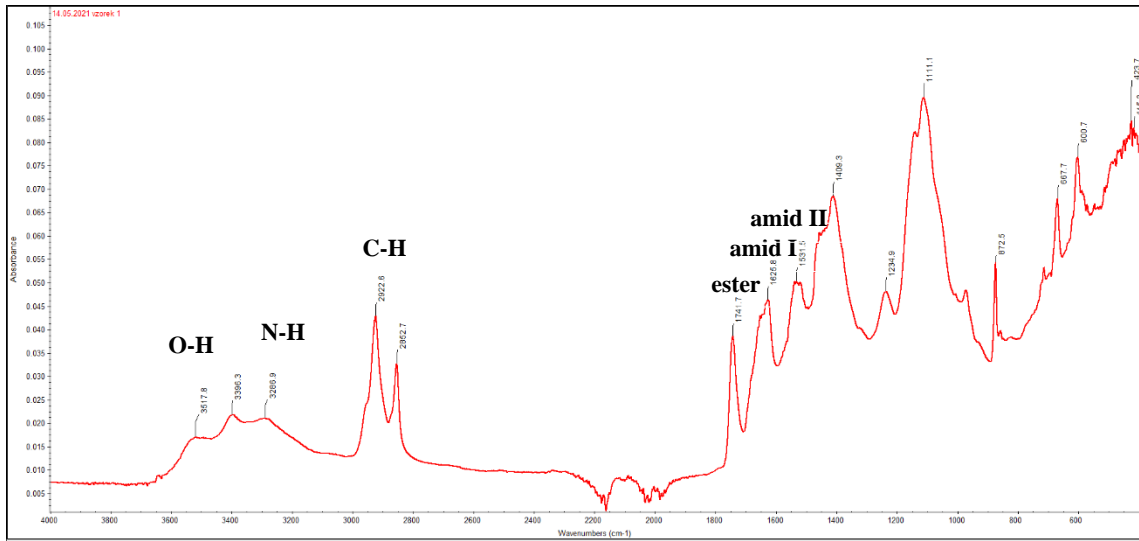
a N-H skupiny interagující vodíkovými můstky. Olejová pojiva mají vysoký signál odpovídající C-H vazbám a esterům. Amidy se u nich nevyskytují. Vzorčky obsahující oleje poskytovaly signál O-H a N-H skupin interagujících vodíkovými můstky. Jedná se pravděpodobně o signál jiných látek ve směsi barev.



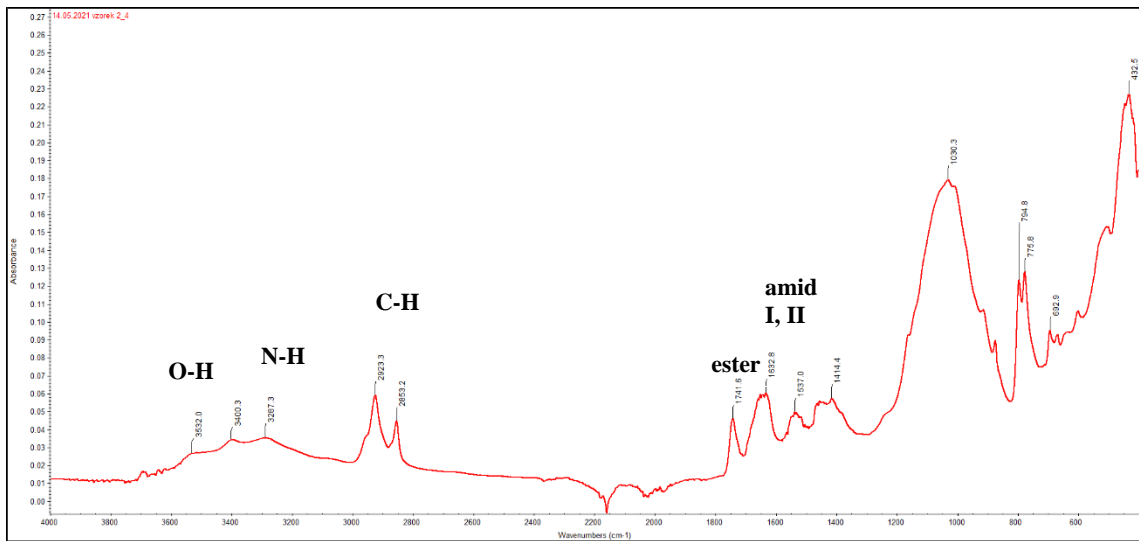
Obr. 60: ATR spektrum sušeného žlutku



Obr. 61: ATR spektrum lněného oleje

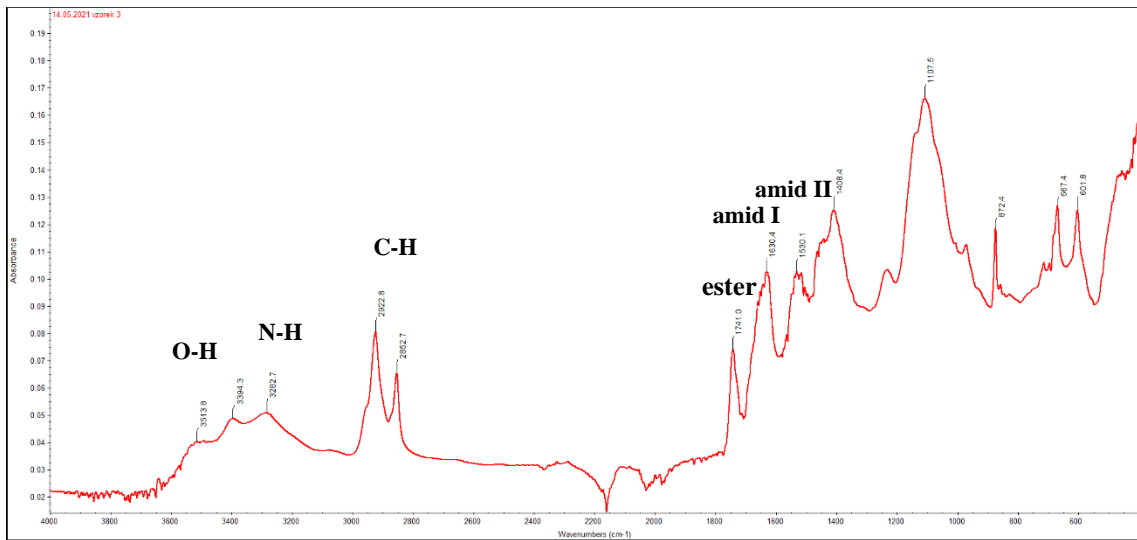


Obr. 62: ATR spektrum modelového vzorku č. 1 s obsahem vaječného žltku

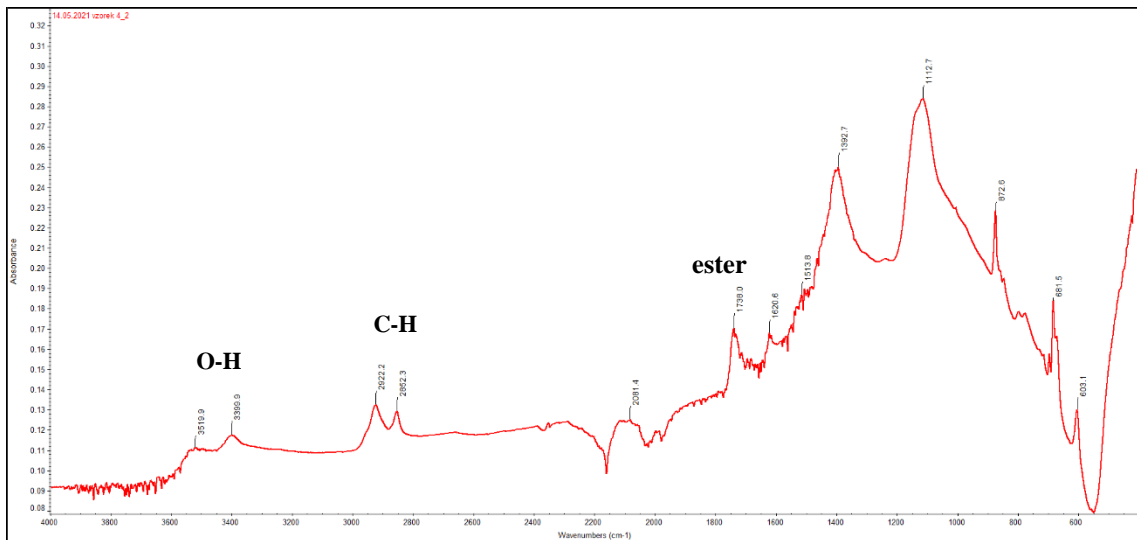


Obr. 63: ATR spektrum modelového vzorku č. 2 s obsahem vaječného žltku

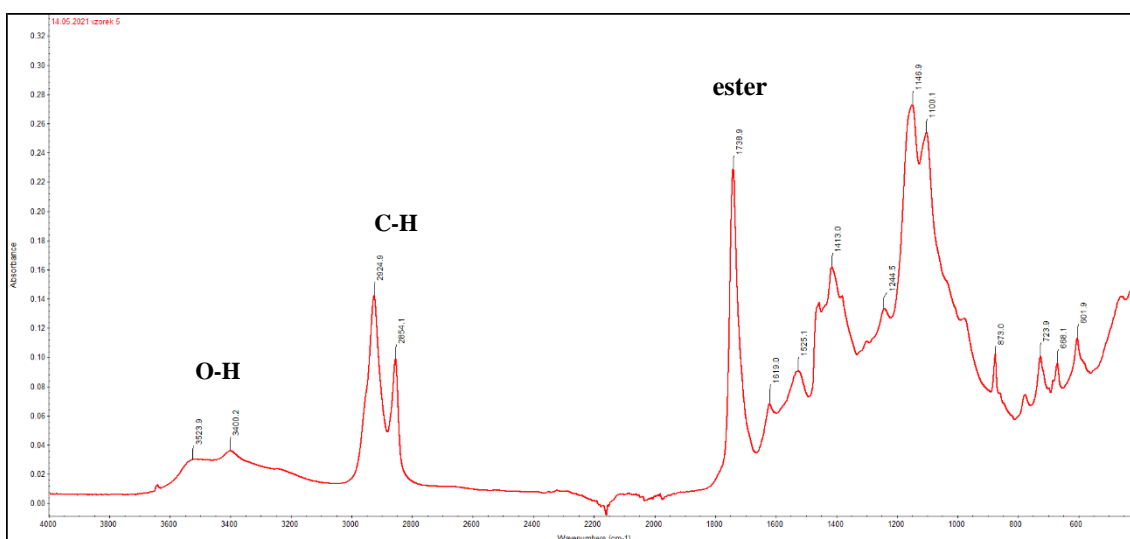
..



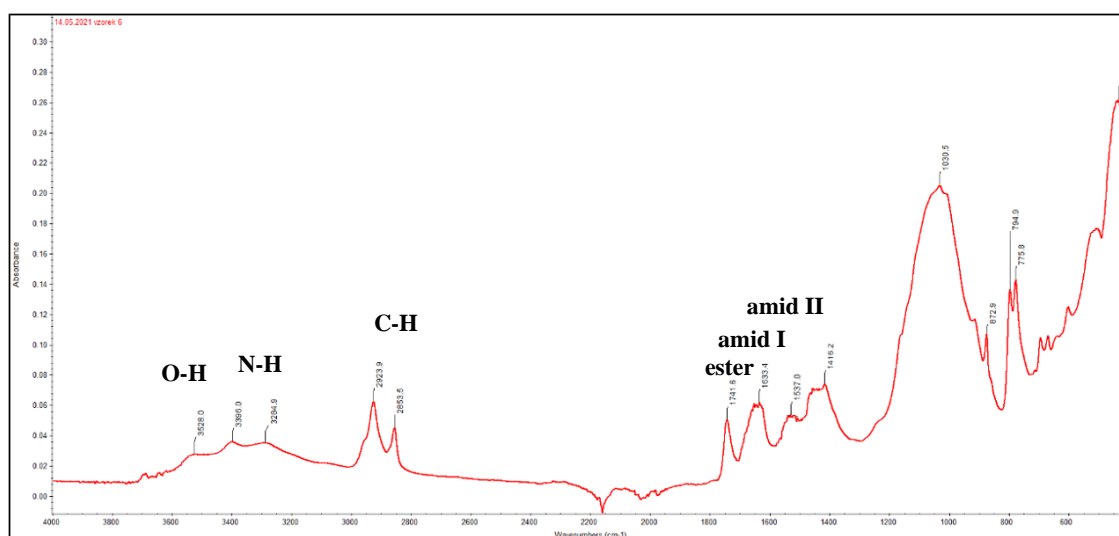
Obr. 64: ATR spektrum modelového vzorku č. 3 s obsahem vaječného žltoku



Obr. 65: ATR spektrum modelového vzorku č. 4 s obsahem lněného oleje



Obr. 66: ATR spektrum modelového vzorku č. 5 s obsahem ořechového oleje

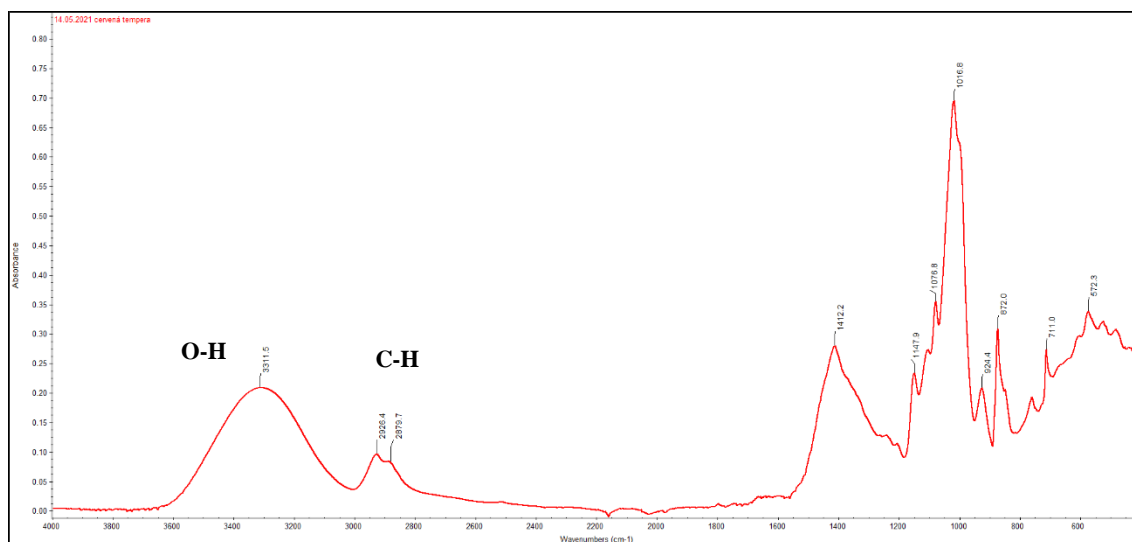


Obr. 67: ATR spektrum modelového vzorku č. 6 s obsahem vaječného žloutku

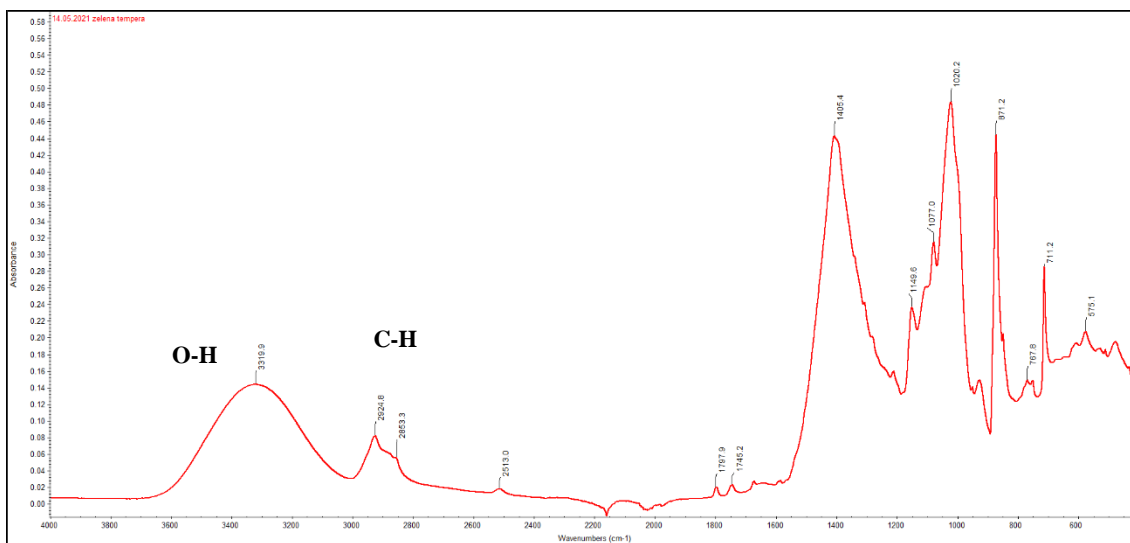
Ve spektrech modelových vzorků s obsahem proteinových nebo olejových pojiv lze pozorovat signály O-H a N-H vazeb zapojených do vodíkových interakcí a také signály C-H vazeb. Proteinová a olejová pojiva lze od sebe odlišit přítomností/nepřítomností signálů amidové skupiny.

4.7 Analýza neznámých vzorků pomocí FTIR spektrometrie

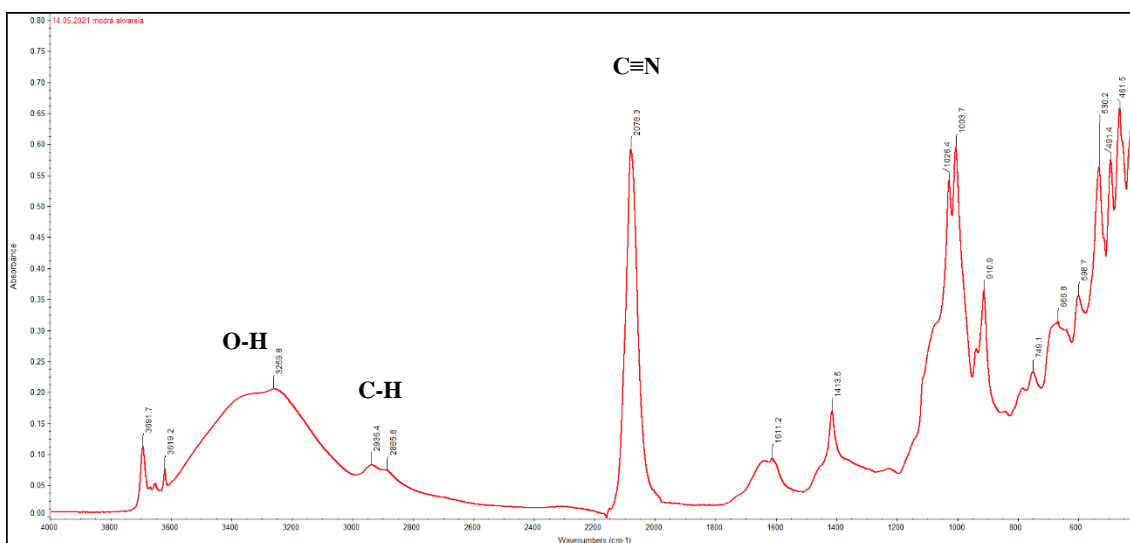
U neznámých vzorků byly pozorovány signály O-H nebo N-H vazeb při vlnočtu 3600-3000 cm^{-1} . Jedná se pravděpodobně o O-H skupiny, protože při mikrochemických reakcích vyšlo, že všechny neznámé vzorky obsahují rostlinnou gumu. Infračervená spektra všech neznámých vzorků ukázala vibrace C-H vazeb. Modrá akvarela obsahovala vysoký pík při 2078,3 cm^{-1} , který souvisí s přítomností CN^- jako součásti pigmentu, který se v barvě nachází – hexakynoželeznatan železitý.



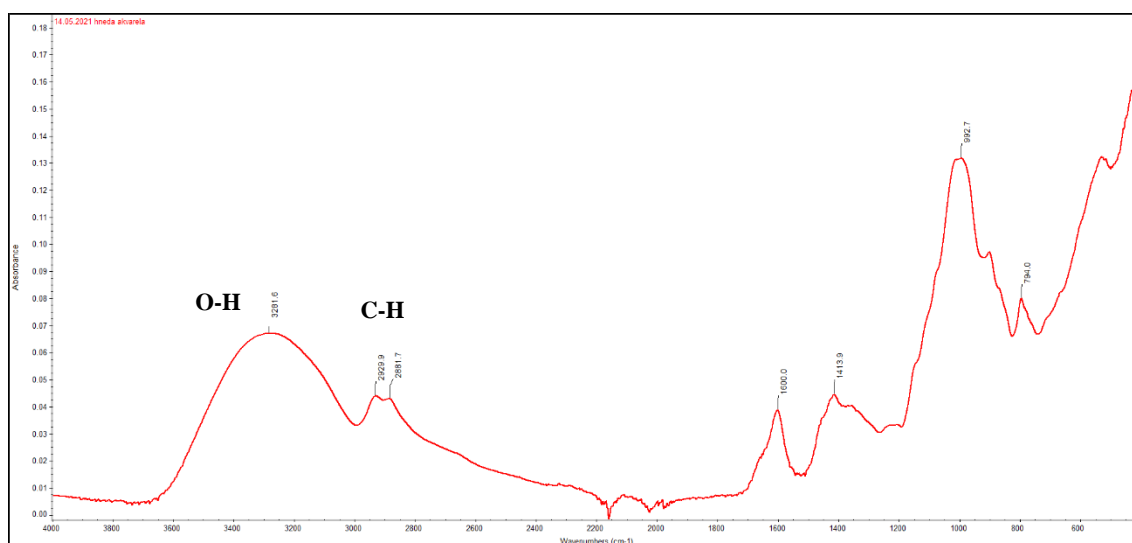
Obr. 68: ATR spektrum vzorku červené temperry



Obr. 69: ATR spektrum vzorku zelene tempery



Obr. 70: ATR spektrum vzorku modré akvarely



Obr. 71: ATR spektrum vzorku hnědé akvarely

ATR spektra neznámých vzorků zobrazují signály O-H vazeb zapojených do vodíkových interakcí. N-H vazby to pravděpodobně nebudou, protože byly vzorky negativní na přítomnost dusíku (kromě modré akvarely s Pruskou modří) a nebyly pozorovány ani amidové signály. Ve spektru modré akvarely je výrazný pík $C\equiv N$ vazby, který potvrzuje správnost pozitivní důkazové reakce na dusík. Spektra také obsahují signály C-H vazeb. Hnědá akvarela má podobné spektrum jako modrá akvarela, liší se barevnými pigmenty. Signály pojiv jsou téměř stejné.

Temperové barvy měly pozitivní reakci na přítomnost vysychavých olejů, ale ve spektrech nejsou přítomny vysoké signály esterů, což může souviset s tím, že výsledky mikrochemických reakcí na přítomnost vysychavých olejů neměly příliš intenzivní zbarvení. Problematické je především spektrum červené tempery, kde přítomnost esterů není patrná. Kromě olejů se v temperách nachází rostlinné gumy a nelze určit poměr mezi těmito pojivy. Oleje mohlo být v barvě mnohem méně, a proto mohly mít estery slabý signál.

Po analýze bylo na webových stránkách výrobce temperových barev nalezeno, že obsahují oleje. Obsah rostlinných gum nebyl výrobcem uveden, ale je známo, že tempery arabskou gumu mohou obsahovat. [6] Výrobcem akvarelových barev bylo potvrzeno, že se v barvách nachází arabská guma.

5. ZÁVĚR

V teoretické části práce byl podán přehled přírodních pojiv používaných v malbách a základní metody jejich průzkumu. Detailněji byly zpracovány mikrochemické reakce určené k důkazu jednotlivých typů pojiv. V experimentální části byly tyto reakce ověřeny na standardech, modelových vzorcích, a nakonec na neznámých vzorcích temperových a akvarelových barev. Výsledky reakcí byly fotograficky zdokumentovány. K doplnění mikrochemických reakcí sloužila ATR spektra, která pomohla ověřit správné výsledky reakcí.

Mikrochemické reakce nacházejí uplatnění díky poměrně rychlému průběhu a dobře pozorovatelnému pozitivnímu výsledku. Na základě toho mohou předcházet náročnějším instrumentálním metodám. Nevýhoda reakcí spočívá v potřebě většího množství vzorku v porovnání s instrumentální analýzou. Při malém množství vzorku není výsledek pozitivní reakce v některých případech příliš výrazný. Mikrochemické reakce nedokáží určit konkrétní pojivo (např. kasein versus vaječné proteiny), mohou však určit skupinu, do které pojivo patří.

Z testovaných reakcí byla nejméně průkazná Biuretova reakce. Na standardech byl pozitivní výsledek reakce vidět jasně a okamžitě, ale u modelových vzorků byla reakce pomalá a výsledek nebyl moc dobře viditelný. Hůře viditelná byla také pozitivní reakce vysychavých olejů, která byla zřetelná u standardů, ale na testovaných vzorcích už méně a v některých případech téměř vůbec. Naopak nejlépe viditelný důkaz proteinů na standardech poskytovala důkazová reakce dusíku, a proto byla použita při ověření přítomnosti proteinových pojiv v modelových vzorcích. Ostatní důkazové reakce (důkaz pyrrolových derivátů, Molishovu reakci, Bialovu reakci, důkaz škrobu, vosků a Storch-Morawského reakci) lze k analýze doporučit.

Doporučené reakce lze zařadit do systému analýzy uměleckých a historických předmětů na Katedře analytické chemie Přírodovědecké katedry Univerzity Palackého v Olomouci. Reakce by mohly najít také uplatnění při popularizaci chemie např. při demonstračních reakcích na dni otevřených dveří. Dále mohou být základem laboratorního cvičení, které by propojilo výtvarnou výchovu s chemií. Studenti středních

škol by mohli vytvořit „umělecké dílo“, které by následně bylo podrobeno analýze s cílem prokázat použitá pojiva.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] D. Ciporanov, Pojem umění a jeho definice, disertační práce, Karlova Univerzita, Praha 2009.

[2] Cambridge Dictionary, dostupné z: <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/work-of-art>, staženo 20. 4. 2020.

[3] W. S. Taft aj. W. Mayer, The science of paintings, Springer, New York 2000.

[4] B. Slánský, Technika v malířské tvorbě, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1976.

[5] L. Losos, Malba, Aventium, Praha 2010.

[6] B. Slánský, Technika malby díl I, malířský a konzervační materiál, Paseka, Praha 2003.

[7] S. Kroustallis, Binding media in medieval manuscript illumination: a source of research, Revista de História da Arte, No 1, série W. (2011) 113-125.

[8] A. Sharma, P. R. Bhushette, U. S. Annapure, Purification and physicochemical characterization of Prunus domestica exudate gum polysaccharide, Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 1 (2020) 100003.

[9] J. Velíšek, J. Hajšlová, Chemie potravin I., Osis, Tábor 2009.

[10] B. Matouš, et al., Základy lékařské chemie a biochemie, Galén, Praha, 2010.

[11] R. F. Tester, J. Karkalas, Q. Xin, Starch—composition, fine structure and architecture; J. Cereal Sci. 39 (2004) 151–165.

- [12] KODÍČEK, M. amylosa. From Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-05-26]. Available from [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=amylosa](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=amylosa).
- [13] N. S. Rusovich-Yugai, Effect of dextrin on properties of glazes and ceramic paints and on the reduction of cobalt oxide. *Glass Ceram.* 63 (2006) 89–91.
- [14] R. H. Walter, Saccharides in Fat Replacement, *J. Food Sci. Technol.* (1998) 181-188.
- [15] K. R. Terpstra, A. J. J. Woortman, J. C. P. Hopman, (2010). Yellow dextrans: Evaluating changes in structure and colour during processing. *Starch-Starke* 62 (2010) 449–457.
- [16] A. Lucas, *Acient egyptian materials and industries*, Edward Arnold, Londýn 2011.
- [17] C. Granzotto, K. Sutherland, J. Arslanoglu, and G. A. Ferguson, Discrimination of Acacia gums by MALDI-TOF MS: Applications to micro-samples from works of art, *Microchem J.* 144 (2018) 229-241.
- [18] J. Rosík, V. Zitko, Š. Bauer, J. Kubala, The structural features of cherry-tree gum (*Prunus avium* L. var. *juliana* L.), *Collect. Czech. Chem. Commun.* 31 (1966) 1072-1078.
- [19] J. Rosík, A. Kardošová, V. Zitko, J. Kubala: Structural features of the Polysaccharide from the plum-tree gum (*Prunus domestica* L. subsp. *domestica*), *Chem. Pap.* 21 (1967) 13-22.
- [20] Balaghi, S., Mohammadifar, M., & Zargaraan, A., Physicochemical and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian *Astragalus*, *Food Biophys.* 5 (2010) 59-71.

- [21] Hassan Ahmadi Gavlighi, Anne S. Meyer, Dayand N.A. Zaidel, Mohammad Amin Mohammadifar, J. Dalgaard Mikkelsen, Stabilization of emulsions by gum tragacanth (*Astragalus* spp.) correlates to the galacturonic acid content and methoylation degree of the gum, *Food Hydrocolloids* 31(2013) 5-14.
- [22] KODÍČEK, M. bílkoviny. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-05-26]. Available from [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=bilkoviny](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=bilkoviny).
- [23] R. L. Brandis, Animal Glue, v knize I. Skeist (ed.) *Handbook of Adhesives*, Springer, Boston, 1990, str. 129-134.
- [24] Miloslav Hégr: *Technika malířského umění, Výtvarný odbor umělecké besedy*, Praha 1941.
- [25] G. Snigdha, K. Majumder, & Y. Mine, Egg Proteins, v knize: P. Varelis, L. Melton, F. Shahidi (ed.) *Encyclopedia of Food Chemistry*, Elsevier (2018).
- [26] A. M. Abdou, M. Kim and K. Sato, Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin, v knize: B. Hernandez-Ledesma, C. Hsieh (ed.), *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, InTech, Chorvatsko, 2013, str. 115-144
- [27] KODÍČEK, M. kasein. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-05-26]. Available from [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=kasein](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=kasein).
- [28] Kadlec, P. et al.: *Technologie potravin II*. Praha, VŠCHT (2002)
- [29] KODÍČEK, M. lipidy. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-05-26]. Available from [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=lipidy](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=lipidy).

[30] KODÍČEK, M. tuky. From Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-05-26]. Available from www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=tuky.

[31] Nejstarší nalezená olejomalba: <https://www.world-archaeology.com/world/asia/afghanistan/worlds-oldest-use-of-oil-paint-found-in-afghanistan/>, staženo 7. listopadu 2020.

[32] J. S. Mills, R. White, Oils and fats, v knize J. S. Mills, R. White (ed.), The Organic Chemistry of Museum Objects, Elsevier, Amsterdam 1987, str. 26-40.

[33] U. Poth, Drying Oils and Related Products, v knize: F. Ullmann (ed.) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Weinheim 2001, str. 621-634.

[34] F. Anwar, R. Qadir, A. & Abbas,. Cold pressed walnut (*Juglans regia* L.) oil v knize: M. F. Ramadan (ed.), Cold Pressed Oils, Elsevier, Amsterdam 2020 str. 491-495.

[35] Lipidy: <https://web.vscht.cz/~koplikr/Lipidy2.pdf>, staženo 14. února 2021.

[36] N. J. Fox, & G. W. Stachowiak,. Vegetable oil-based lubricants—A review of oxidation. Tribol. Int 40 (2007) 1035–1046.

[37] N. A. Porter, S. E. Caldwell, & K. A. Mills, Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids, Lipids 30 (1995) 277-290.

[38] J. Zelinger, Chemie v práci konzervátora a restaurátora, Academia, Praha, 1987.

[39] M. Lazzari, O. Chiantore, Drying and oxidative degradation of linseed oil, Polym. Degrad. Stabil. 65 (1999) 303-313.

[40] J. Mallégol, J. Lemaire, & J. Gardette, Yellowing of Oil-Based Paints. Stud. Conserv. 46 (2001) 121-131.

- [41] J. Cuní, P. Cuní, B. Eisen, R. Savizky, & J. Bové, Characterization of the binding medium used in Roman encaustic paintings on wall and wood, *Anal. Methods* 4 (2012) 659-669.
- [42] F. Fratini, G. Cilia, B. Turchi, & A. Felicioli, Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9 (2016) 839–843.
- [43] R. Aichholz, & E. Lorbeer, Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography–chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 601–615.
- [44] J. S. Mills, R. White, Natural waxes, v knize: J. S. Mills, R. White (ed.), *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Elsevier, Amsterdam 1987, str. 41-47.
- [45] J. S. Mills, & R. White, Natural resins and lacquers, v knize: J. S. Mills, R. White (ed.), *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Elsevier, Amsterdam 1987, str. 83-110.
- [46] P. Dietemann, C. Higgitt, M. Kälin, M. J. Edelmann, R. Knochenmuss, & R. Zenobi, Aging and yellowing of triterpenoid resin varnishes – Influence of aging conditions and resin composition, *J. Cult. Herit.* 10 (2009) 30–40.
- [47] J. S. Mills, R. White, Natural Resins of Art and Archaeology Their Sources, Chemistry, and Identification. *Stud. Conserv.* 22 (1977) 12-31.
- [48] M. P. Colombini, F. Modungo, *Organic Materials in Art and Archeology*, v knize: M. P. Colombini, F. Modungo (ed.), John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 2009, str. 44-46.

- [49] P. Lesniaková, Vybrané metody průzkumu předmětů kulturního dědictví, v knize: P. Lesniaková, A. Samohýlová, Z. Holý (ed.), Metodika průzkumů vybraných skupin předmětů uměleckého řemesla, Národní památkový ústav, České Budějovice 2019, str. 8-59.
- [50] F. Arnau, Umění padělatelů: Padělatelské umění. Tři tisíce let podvodů se starožitnostmi, Orbis, Praha 1973.
- [51] I. Kopecká, E. Svobodová, Metody průzkumu historických materiálů, Grada, Praha 2019.
- [52] D. Titěra, F. Kamler, O. Procházka, P. Černoch, P. Hyršl, Vosk nad zlato, Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., 2017, certifikovaná metodika čj. 2188/2018 – MZE – 16232, Dostupné z: https://www.beedol.cz/wp-content/uploads/2019/05/Vosk-nad-zlato-2018_04_09.pdf, staženo 13. března 2021.
- [53] E. Sedlák, P. Danko, R. Varhač, H. Paulíková, D. Podhradský, Praktické cvičenia z biochémie, Košice, 2007.
- [54] Bílkoviny a aminokyseliny
<https://web.vscht.cz/~koplikr/B%C3%ADlkoviny%20a%20aminokyseliny.pdf>, staženo 15. března 2021.
- [55] H. Schramm, B. Hering, Historische Malmaterialien und ihre Identifizierung, Ravensburg, 2000.
- [56] E. Pięta, J. Olszewska-Świetlik, C. Paluszkiewicz, A. Zając, W. M. Kwiatek, Application of ATR-FTIR mapping to identification and distribution of pigments, binders and degradation products in a 17th century painting, Vib. Spectrosc. 103 (2019) 102928.

[57] S. Sotiropoulou, Z. E. Papiiaka, L. Vaccari, Micro FTIR imaging for the investigation of deteriorated organic binders in wall painting stratigraphies of different techniques and periods, *Microchem J.* 124 (2016) 559-567.

[58] M. T. Doménech-Carbó, Novel analytical methods for characterising binding media and protective coatings in artworks, *Anal. Chim. Acta* 621 (2008) 109-139.

[59] A. Spyros, D. Apostolos, Studies of organic paint binders by NMR spectroscopy. *Applied Physics A.* 83 (2006) 705-708.

[60] S. Kuckova, R. Hynek, M. Kodicek, Identification of proteinaceous binders used in artworks by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 201–206.

[61] A. Lluveras-Tenorio, J. Mazurek, A. Restivo, et al. Analysis of plant gums and saccharide materials in paint samples: comparison of GC-MS analytical procedures and databases. *Chem. Cent. J.* 6 115 (2012).

[62] M. P. Colombini, F. Modugno, E. Menicagli, R. Fuoco, A. Giacomelli, GC-MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artifacts, *Microchem. J.* 67 (2000) 291-300.

7. SEZNAM ZKRATEK

ATR – zeslabený úplný odraz, attenuated total reflection

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, Fourier-transform infrared spectroscopy

GC – plynová chromatografie, gas chromatography

GC-MS – plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie, gas chromatography-mass spectrometry

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie, high performance liquid chromatography

IR – infračervené, infrared

MALDI-TOF – desorpce/ionizace laserem za účasti matrice s průletovým analyzátozem, matrix-assisted laser desorption/ionization with time of flight detector

NMR – nukleární magnetická rezonance, nuclear magnetic resonance