

## **Metodika pro spektrální analýzu organických látek (organických pojiv, barviv a syntetických polymerů) ve vzorcích historických nebo uměleckých materiálů, které jsou tvořeny souvrstvím.**

Metodika vznikla v průběhu let 2012 a 2013 v rámci řešení prvního cíle projektu NAKI identifikační kód projektu: DF12P01OVV034 „Průzkum sbírkových předmětů z fondů NTM moderními fyzikálními a chemickými metodami“, financovaném MK ČR na základě smlouvy č. 34/2012/OVV. Řešiteli tohoto konsorciálního projektu jsou NTM a FJFI ČVUT v Praze, koordinujícím řešitelem je NTM, respektive odd. preventivní konzervace NTM, řešitelka Ing. Ivana Kopecká, která se analýze historických materiálů a uměleckých děl věnuje více než 30 let, dále se na řešení metodiky značnou měrou podílela RNDr. Eva Svobodová, Ph.D., absolventka analytické chemie na PřF UK a technologie konzervování a restaurování na VŠCHT.

### **Oponentky:**

Ing. Petra Štefcová, CSc., Národní muzeum  
Ing. Magda Součková, Národní knihovna

### **Anotace**

Metodika pro analýzu organických látek (např. organických pojiv a barviv) ve vzorcích historických nebo uměleckých materiálů, které jsou tvořeny souvrstvím, respektive metodika přípravy vzorku pro analýzu jednotlivých vrstev materiálových souvrství metodou FTIR mikroskopie. Diskutuje různé postupy, používané při přípravě vzorku, jejich výhody a limity, a uvádí postupy, které eliminují kontaminaci vzorku zalévací hmotou a jejichž následná analýza je z tohoto hlediska zatížená co nejmenší chybou.

### **Klíčová slova**

FTIR mikroskopie, analýza souvrství, příčný řez, izolace zalévací hmoty, příprava preparátu; *FTIR microscopy, sandwich multilayer samples, cross-section, insulation of synthetic resin, sample preparation.*

## **I. Cíl metodiky**

V oblasti památkové péče, restaurování uměleckých děl a také v oblasti forensní analýzy uměleckých děl se běžně setkáváme s nutností analyzovat souvrství materiálů (např. souvrství barevných vrstev malby, polychromie, laků, ...). Možnosti odběru vzorku jsou v těchto případech velmi omezené, pro analýzu je tedy možné odebrat pouze velmi malý vzorek. Z něho je pak ve formě příčného řezu připraven preparát pro pozorování pod mikroskopem. Tento preparát může být dále využit i pro některé materiálové analýzy (např. pro RTG-fluorescenční, respektive mikro-RTG-fluorescenční analýzu anorganických pigmentů), ale pro analýzu látek organické povahy (organických pojiv, organických barviv nebo syntetických materiálů) není vždy vhodný, ačkoli právě informace o organickém pojivu (např. olej, akryl, tempera) je klíčová pro stanovení techniky malby, pro volbu postupu při restaurování nebo pro potvrzení pravosti díla.

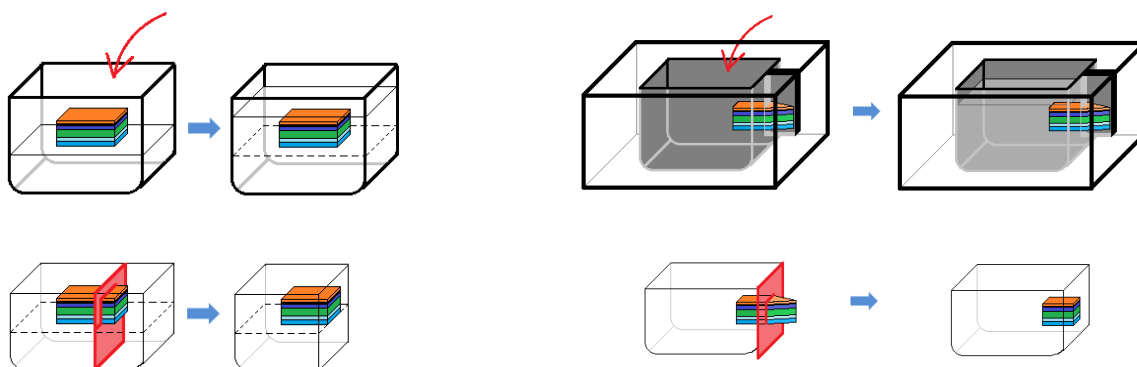
Cílem této metodiky je upozornit na možnosti i limity jednotlivých analytických metod, které byly/jsou používány pro analýzu organických látek v souvrství vzorků historických a uměleckých materiálů, a doporučit postupy analýzy, zatížené co nejmenší chybou.

Při analýze souvrství je prvním krokem vytvoření preparátu ve formě příčného řezu pro pozorování pod mikroskopem. Až na základě detailního pozorování optickým mikroskopem získáme základní představu o složení souvrství, o barevnosti a morfologii jednotlivých vrstev. Aby mohl být takový preparát vytvořen, vzorek musí být zafixován v nějaké hmotě, kterou je možné mechanicky opracovat (řezat, brousit, leštit). Nejčastěji bývá vzorek zalit do syntetické pryskyřice (polyakrylové, polyesterové (PES) nebo epoxidové). V bloku vytvrzené pryskyřice je vzorek dále mechanicky opracován tak, aby plocha příčného řezu souvrstvím byla rovná a hladká a aby mohla být při patřičném zvětšení pod mikroskopem pozorována (a dokumentována). Při procesu zalévání vzorku pryskyřicí však nelze zabránit kontaminaci vzorku zalévací hmotou, zejména u okrajových vrstev vzorku.\* Při optickém pozorování, ani při analýze anorganických složek materiálu tento fakt sice nehraje žádnou roli, ale analýzu organických materiálů může znemožnit nebo významně zkusit. Přitom otázky, spojené s analýzou organických pojiv, se týkají hlavně nejspodnější vrstvy, která bývá považována za původní, a nejsvrchnější – aktuální vrstvy. Ať se jedná o souvrství laků, kdy organické rozpouštědlo, v němž je pryskyřice rozpuštěná, částečně rozpouští i lakovou vrstvu vzorku, anebo o vzorek převážně minerálního charakteru (např. souvrství nástěnné malby), kde zalévací hmota proniká do porézního systému vzorku, z hlediska další analýzy je to vždy významná kontaminace.

Cílem předkládané metodiky je navrhnout takové postupy přípravy vzorku i vlastní analýzy, které by kontaminaci vzorku zalévací pryskyřicí eliminovaly a snížily tak chybu analytického stanovení.

*\*Ukázalo se, že žádný z používaných způsobů zalévání vzorku – co do zalévacího materiálu i co do způsobu zalévání (zalévání vzorku na vytvrzeném podkladu již tuhnoucí pryskyřicí (obr. 1), kdy lze předpokládat natolik vysokou molekulární strukturu pryskyřice, že nepronikne do porézního systému, nebo zalévání vzorku fixovaného do stěny formy (obr. 2) a jeho odříznutí po vytvrzení pryskyřice) nezaručuje, že zalévací hmota nebude vzorek kontaminovat. Kontaminace je důsledkem zejména chemické interakce zalévací hmoty a analyzovaného vzorku. Chemickou podstatu vzorku však neznáme a neumíme předvídat (proto je analyzován). Vliv viskozity a reologických vlastností zalévací hmoty na kontaminaci vzorku není významný (s výjimkou vzorků s extrémně vysokou otevřenou porozitou).*

Obr.1: Zalévání vzorku na vytvrzeném podkladu. Obr.2: Zalévání vzorku, fixovaného do stěny formy.



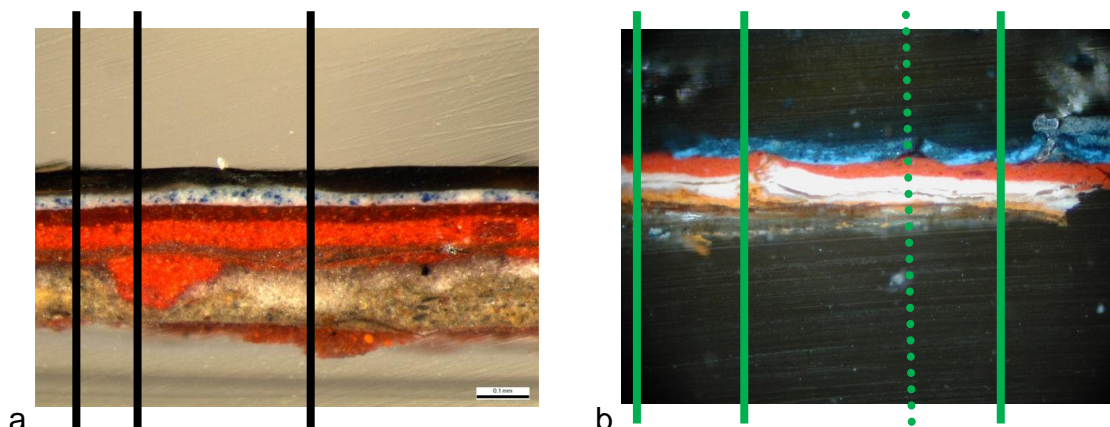
## II. Popis metodiky

### II.1. Požadavky na preparát pro analýzu FTIR nebo Ramanovou spektrometrií

FTIR spektroskopie je v oblasti konzervace a restaurování uměleckých a historických děl poměrně široce využívaná metoda pro analýzu organických látek (pojiv, barviv a syntetických polymerů). Předpokladem pro seriózní analýzu jednotlivých vrstev zkoumaného souvrství je možnost soustředit IR paprsek pouze do jediné, právě analyzované vrstvy. Technika IR mikroskopie to svými parametry umožňuje, nejobtížnějším krokem však zůstává příprava preparátu pro analýzu. Prvním krokem je vždy vizuální zhodnocení příčného řezu analyzovaným souvrstvím. **Ze zkoumaného vzorku je tedy třeba vytvořit preparát pro pozorování pod mikroskopem.** To předpokládá fixaci vzorku do nějaké hmoty tak, aby bylo možné vzorek v příčném řezu vybrousit, eventuálně vyleštit. Obvykle bývá vzorek zalit do syntetické pryskyřice (akrylové, polyesterové nebo epoxidové) a po vytvrzení pryskyřice je pak broušen a leštěn.

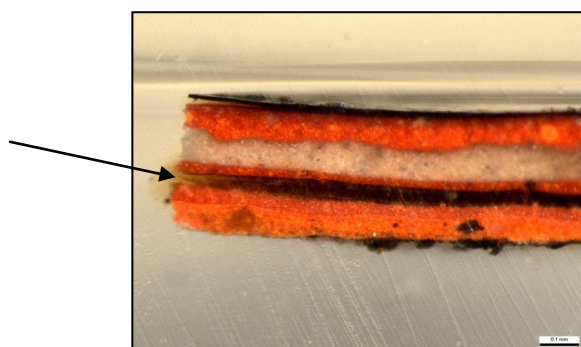
Na vyleštěném nábrusu lze pod mikroskopem pozorovat celé souvrství i jeho jednotlivé vrstvy, jejich sílu (tloušťku), barevnost, zrnitost, homogenitu, ... Až na základě detailního vizuálního zhodnocení je pak možné zvolit místa analýzy, v rámci jednotlivých vrstev dostatečně homogenní, o nichž lze předpokládat, že budou pro danou vrstvu reprezentativní. V ideálním případě lze tento jediný nábrus postupně použít nejen pro optické zhodnocení, ale také pro analýzu organických pojiv FTIR mikroskopii i pro anorganickou prvkovou analýzu elektronovou mikrosondou.

Obr.3a,b: Volba reprezentativního místa v příčném řezu vzorkem pro analýzu.



Vzorky mohou být porézní (např. souvrství nástěnné malby) anebo neporézní (např. barevné souvrství olejomalby nebo laků či nátěrů). V obou případech však dochází ke kontaminaci vzorku zalévací hmotou, která buď prosycuje vzorek tak, že vniká do otevřených pórů či prasklin, anebo rozpouštědlo zalévací pryskyřice částečně rozpouští i laky či nátěry analyzovaného souvrství.

Obr.4: Interakce barevné vrstvy se zalévací hmotou.



V obou případech přítomnost zalévací hmoty významně zkresluje výsledky analýzy, zejména v okrajových vrstvách souvrství, která jsou logicky kontaminována nejvíce. Z této skutečnosti vyplývá požadavek na způsob přípravy preparátu, který by kontaminaci zalévací hmotou eliminoval.

## **II.2. Nabízí se několik možností přípravy vzorku, jejichž výhody i omezení budou dále popsány:**

### **II.2.1. Mechanické oddělení vrstev**

Mechanické rozdělení nezalitého souvrství pod mikroskopem a následně samostatná analýza jednotlivých vrstev je velmi obtížné řešení, málokdy uskutečnitelné, které navíc předpokládá, odběr minimálně dvou vzorků – pro mikroskopii a pro FTIR analýzu. Jednotlivé vrstvy nezalitého vzorku lze také detailně analyzovat technikou diamantové cely, ovšem bez dalšího komparačního vzorku pro mikroskopii, na kterém by bylo možné jednotlivá měření přesně lokalizovat, je tato analýza prakticky bezcenná.

### **II.2.2. Izolace vzorku od zalévací hmoty**

Dalším možným řešením je izolace vzorku od zalévací hmoty. Toto řešení předpokládá aplikaci tenké ochranné vrstvy na povrch vzorku dříve, než bude zalit do syntetické pryskyřice. Existuje více možností, základním požadavkem je co nejmenší interakce materiálu ochranné vrstvy jak se zalévací hmotou, tak s materiálem samotného vzorku (alespoň dokud vrstva nezaschne nebo nevytverdne).

#### **II.2.2.1. Vodní sklo**

K izolaci neporézního lakového vzorku je možné použít vodní sklo\*, ovšem po mokrému broušení vzorku je nutno velmi důkladně povrch příčného řezu omýt vodou a osušit. Ani potom není vyloučeno, že spektra jednotlivých vrstev budou rušena výraznou absorpcí, charakteristickou pro silikáty. Naopak zmýdelnění olejů v důsledku interakce alkalického materiálu s olejovým nátěrem se nepotvrdilo.

*\* Organokřemičitany mohou fungovat obdobně jako vodní sklo, ale pouze za předpokladu, že analyzovaný vzorek nebude reagovat s etanolem (organokřemičitany bývají distribuovány v lihovém roztoku). Vodní sklo se proto jeví jako jednodušší a bezpečnější varianta. (Pro zkoušky bylo použito alkalické draselné vodní sklo.)*

#### **II.2.2.2. Vodná polymerní disperze**

Izolace vzorku vodnou disperzí (např. běžně dostupnými polyakrylovými disperzemi typu Sokrat). Po mokrému broušení akrylový polymer kontaminuje prakticky celou plochu příčného řezu daleko více než vodní sklo.

Přínos tohoto postupu je tedy minimální a nelze jej doporučit.

#### **II.2.2.3. Pokovení**

Pokrytí vzorku molekulární vrstvou uhlíku nebo zlata (obdobně jako při přípravě preparátu pro elektronovou mikroskopii) vzorek dobře izoluje od zalévací pryskyřice, ovšem za předpokladu, že se jedná o vzorek kompaktní, který nemá mimořádně velkou otevřenou porozitu ani praskliny.

#### **II.2.2.4. Cyklododekan – tavenina, roztok**

Cyklododekan ( $C_{12}H_{24}$ ) je uhlovodík (cykloalkan). Je velmi těkavý, nepolární a dobře rozpustný v řadě nepolárních rozpouštědel (např. v tech. benzínu). Restaurátoři jej běžně používají jako pomocnou látku pro různé účely, které jsou časově omezené (např. pro dočasnou ochranu malby, dočasnou izolaci, ...).

Cyklododekan lze s úspěchem použít i jako bariéru mezi vzorkem a zalévací hmotou. Je možné jej použít buď ve formě taveniny, nebo ve formě koncentrovaného roztoku (např. v technickém benzínu). Roztok cyklododekanu vzorek obalí a pronikne i do jeho pórů a prasklin, naproti tomu cyklododekan ve formě taveniny vytvoří relativně silný povlak pouze na povrchu vzorku. Následně je vzorek zalit do syntetické pryskyřice a po jejím zesíťování může být preparát broušen a leštěn.

Pro pozorování mikroskopem lze takto připravený preparát použít ihned, ale před FTIR analýzou je nutné nechat cyklohexan z otevřeného povrchu vytékat (cca 24 hod při laboratorní teplotě, nebo odpaření urychlit teplým vzduchem). Je-li před zalitím do pryskyřice povlak cyklohexanu na povrchu vzorku příliš silný (při použití taveniny), může se stát, že po vytěkání cyklohexanu nebude vzorek v zalévací pryskyřici dostatečně fixován. Proto je výhodnější používat cyklohexan ve formě roztoku.

Metoda izolace vzorku roztokem cyklohexanu od zalévací hmoty se osvědčila. Takto připravené preparáty nejevily při FTIR analýze (technikou mikro-ATR) žádnou kontaminaci – ani zalévací hmotou, ani samotným cyklohexanem a pro optickou mikroskopii jsou rovnocenné s klasickými nábrusy, kdy je vzorek pouze zalit do syntetické pryskyřice.

### II.2.3. Fixace vzorku do tablety KBr

*Bromid draselný (KBr) je anorganická sůl, která nepohlcuje IR záření, ale je pro ně transparentní. IR záření jím tedy prochází. Těto skutečnosti se využívá v řadě pracovních technik IR spektroskopie a lze ji využít i pro analýzu vrstevnatého vzorku FTIR mikroskopem.*

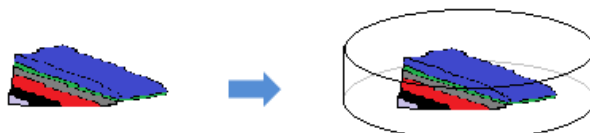
Vzorek je zalisován do tablety z KBr. Při tlaku přibližně 200 kPa se vytvoří tzv. sklovitá modifikace KBr, u níž při průchodu infračerveného záření dochází jen k malým ztrátám intenzity záření (v důsledku odrazu). Tlak zalisování vzorku může být i vyšší než 200 kPa, aby řez souvrstvím byl ve FTIR mikroskopu čitelný, ale zároveň ne tak vysoký, aby došlo k mechanické destrukci souvrství.

Při přípravě tablety – preparátu pro FTIR mikroskopii lze postupovat několika způsoby, podle velikosti a povahy vzorku\*:

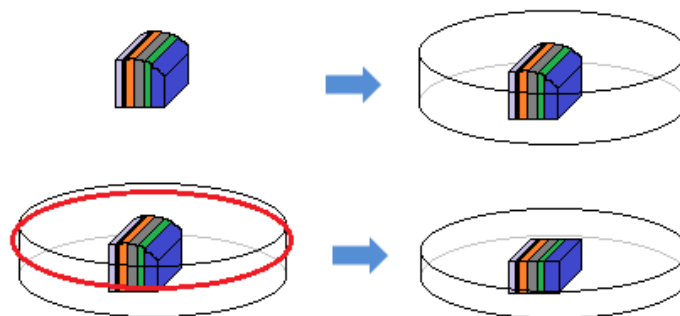
1. Do tablety KBr naplocho zalisovat šikmo seříznuté souvrství, tak aby byly postupně odkryty všechny vrstvy (viz obr.5).
2. Souvrství zalisovat do tablety KBr kolmo k rovině vrstev a poté opatrně (ručně) zbrousit v ploše tablety (viz obr.6).
3. Nejdříve souvrství naplocho zalisovat do tablety KBr, potom dvěma rovnoběžnými přesnými řezy vyříznout z tablety (a ze vzorku) střední část a tuto část znova zalisovat do nové tablety, tentokrát ve směru kolmém na směr lisování původní tablety (viz obr.7).

*\*Otázka velikosti minimálního vzorku je dána jednak nejmenším krokem měření (pohybuje se řádově v nm ( $10^{-9}m$ ), jednak soudržností vzorku (řezat je možné pouze vzorek, který nedelaminuje), v neposlední řadě i zručností pracovníka, který vzorek v tabletě připravuje (pod lupou).*

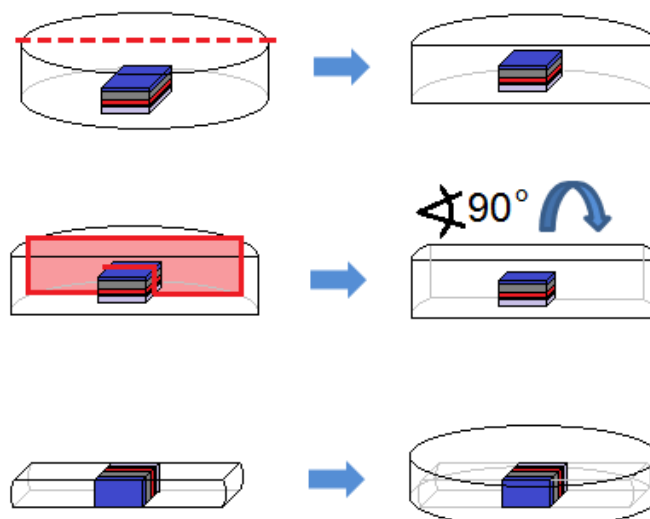
Obr.5: Šikmo seříznuté souvrství, naplocho zalisované do tablety KBr.



Obr.6: Souvrství kolmo k rovině vrstev zalisované do tablety KBr a poté ručně zbroušené v ploše tablety.



Obr.7: Souvrství nadvakrát zalisované v tabletě KBr.



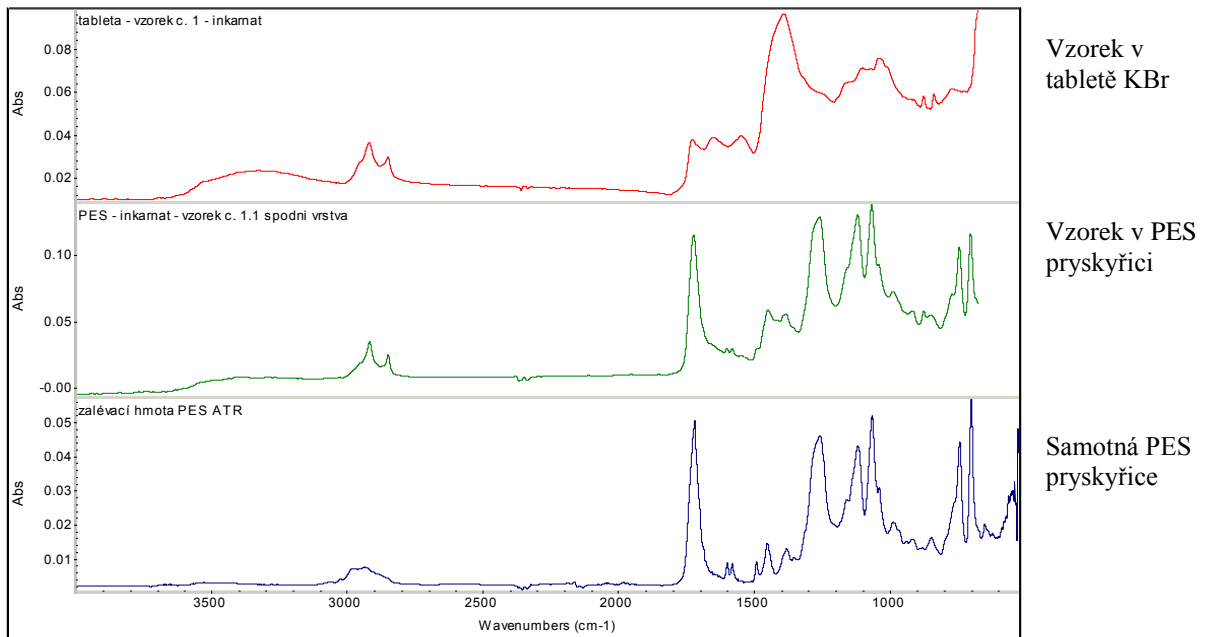
KBr je silně hygroskopická látka. Proto je nutné tablety KBr analyzovat co nejdříve nebo je přechovávat v exsikátoru. Pro analýzu takto připravených preparátů se velmi osvědčila měřicí technika mikro ATR (*technika zeslabeného totálního odrazu*).

Fixace vzorku do KBr tablet je sice ze všech výše uvedených způsobů nejpracnější, avšak výsledky analýz takto připravených preparátů jsou velmi dobré a zaručeně nezkrácené přítomností jakýchkoli pomocných látek. Nevýhodou je omezená archivovatelnost takto připravených preparátů, které lze dlouhodobě uchovat pouze v exsikátoru.

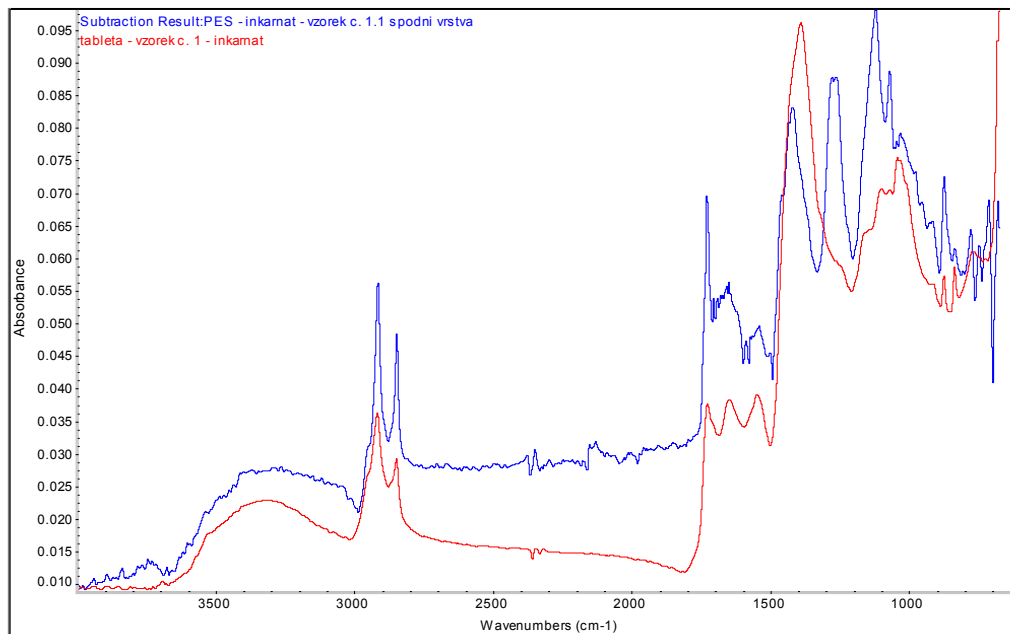
### II.3. Příklad analýzy

Následující příklad demonstruje rozdíl v čitelnosti FTIR spektra, naměřeného na klasicky připraveném vzorku (zalitým do syntetické pryskyřice) a spektra, naměřeného toutéž metodou (mikro ATR) na stejném vzorku, zalisovaném v tabletě KBr. *Jedná se o vzorek středověké malby, inkarnát, technika masné tempéry, převažující pigment olovnatá běloba.*

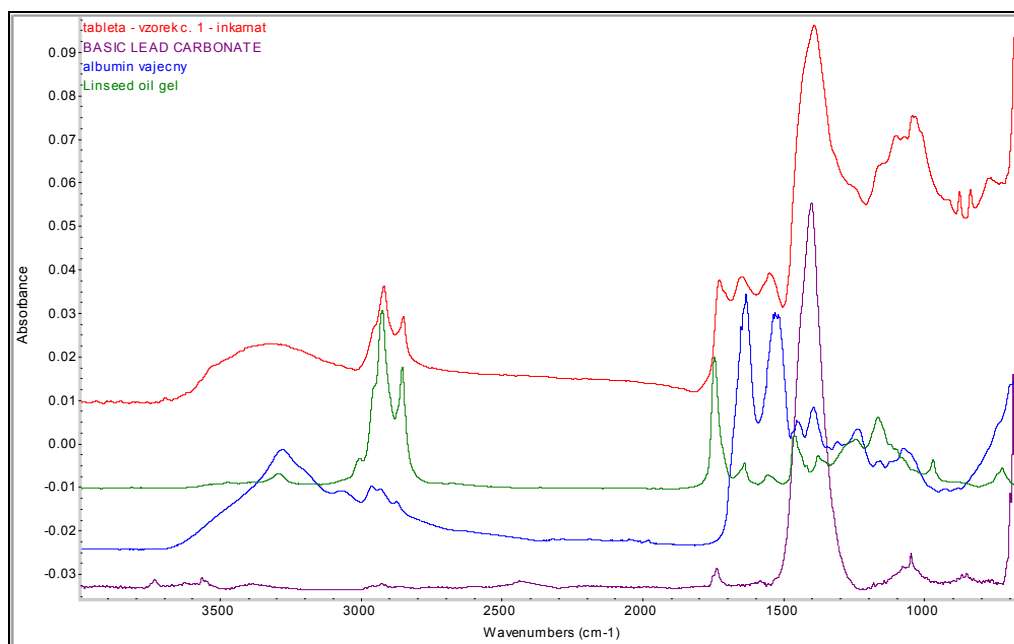
Obr.8: Srovnání FTIR spekter naměřených v tabletě KBr a v PES pryskyřici a spektra samotné PES zalévací pryskyřice. Je zřejmé, že spektrum naměřené na vzorku, zalitém v PES pryskyřici (zelené sp.), je téměř identické se spektrem samotné zalévací hmoty (modré sp.).



Obr.9: Pokus o odečtení spektra samotné zalévací hmoty od spektra vzorku, zalitého v pryskyřici (modré sp.) a jeho srovnání se spektrem vzorku, naměřeným v tabletě KBr (červené sp.). V ideálním případě by tato spektra měla být shodná. Je zřejmé, že tomu tak není, spektrum vzorku, zalitého v pryskyřici je nečitelné, neboť i po odečtení spektra samotné pryskyřice v něm převažují absorpce, charakteristické pro zalévací hmotu.



Obr.10: Velmi dobře čitelné spektrum vzorku, naměřené v tabletě KBr (červené sp.) spolu se spektry standardů: vaječná bílkovina (modré sp.), lněný olej (zelené sp.), olovnatá běloba (fialové sp.).



#### II.4. Souhrn

Tato metodika je určena pro oblast materiálových analýz objektů kulturního dědictví (historických materiálů a uměleckých děl), respektive pro analýzu jednotlivých vrstev materiálových souvrství metodou FTIR mikroskopie. Diskutuje různé postupy, používané při přípravě vzorku, a uvádí postupy, které eliminují kontaminaci vzorku, a z tohoto hlediska tedy FTIR analýzu zatěžují minimální chybou.

Ze zkoumaného vzorku je třeba vytvořit preparát pro pozorování pod mikroskopem. To předpokládá fixaci vzorku tak, aby bylo možné vzorek v příčném řezu vybrousit, eventuálně vyleštit. Vzorek bývá obvykle zalit do syntetické pryskyřice (akrylové nebo polyesterové) a po jejím vytvrzení je pak broušen a leštěn.

Při zachování tohoto postupu většinou dochází ke kontaminaci vzorku zalévací hmotou. Pryskyřice vzorek prosycuje tak, že vniká do otevřených pórů či prasklin, anebo rozpouštědlo zalévací pryskyřice částečně rozpouští i laky či nátěry analyzovaného souvrství. V obou případech přítomnost zalévací hmoty významně zkresluje výsledky analýzy, zejména složení okrajových vrstev souvrství, která jsou logicky kontaminována nejvíce. Interpretace FTIR spekter takto připravených preparátů je velmi obtížná, může být nejednoznačná a do značné míry subjektivní. K tomu přispívá i fakt, že analyzované vrstvy jsou obvykle směsí látek, v níž bývá hledaná látka (např. organické pojivo v barevné vrstvě) zastoupena jen minoritně. Z této skutečnosti vyplynul požadavek na jiný způsob přípravy preparátu, který by kontaminaci vzorku zalévací hmotou eliminoval.

Ze všech výše popsaných metod se osvědčilo několik postupů izolace vzorku před zalitím do syntetické pryskyřice a několik způsobů zalisování vzorku do tablety KBr. Výsledky – jednotlivé postupy, jejich výhody i limity – jsou shrnuty v následujících dvou tabulkách.



Tabulka 1: Způsoby izolace vzorku, zalitého v syntetické pryskyřici a jejich hodnocení z hlediska přesnosti analýzy (1-5).

<i>Izolační vrstva</i>	<i>Kompaktnost preparátu</i>	<i>Kontaminace vzorku</i>	<i>archivace</i>	<i>pracnost</i>	<i>hodnocení</i>
silikáty (vodní sklo)	ano	minimálně	ano	ne	2
vodné polymerní disperze	ano	ano	ano	ne	5
cyklododekan tavenina	ne	minimálně	omezeně	ne	4
cyklododekan roztok	ano	minimálně	ano	ne	2
napařená vrstva C	ano	ne	ano	ano	1
napařená vrstva Au	ano	ne	ano	ano	1

Tabulka 2: Způsoby zalisování vzorku souvrství do tablety KBr a jejich hodnocení z hlediska přesnosti analýzy (1-5).

<i>Způsob zalisování</i>	<i>Kompaktnost preparátu</i>	<i>Kontaminace vzorku</i>	<i>archivace</i>	<i>pracnost</i>	<i>hodnocení</i>
(obr.5) šikmo seříznutý vzorek	ano	ne	omezeně	ano	1
(obr.6) vzorek zbroušený v tabletě	ano	ne	omezeně	ano	1
(obr.7) nadvakrát zalisovaný vzorek	ano	ne	omezeně	ano	1

**Z hlediska přesnosti FTIR analýzy se jako nejvýhodnější jeví všechny postupy zalisování vrstevnatého vzorku do tablety KBr, které vylučují kontaminaci vzorku zalévací hmotou bez ohledu na jeho morfologii (porézni/neporézni, popraskaný, ...) a zároveň i bez ohledu na jeho chemickou povahu.**

**Velmi dobře rovněž vyhověly vzorky pokovené, kde izolační vrstvou je napařená vrstva zlata nebo uhlíku. Byl použit stejný postup, který je běžně používán při přípravě vzorků pro analýzu SEM (skenovací elektronové mikroskopie).**

**Relativně dobré výsledky byly dosaženy i s použitím vodního skla a roztoku cyklododekanu jako izolantu. Tento způsob izolace vzorku však může být ovlivněn chemickou povahou vzorku.**

### **III. Srovnání „novosti postupů“ oproti původním postupům a jejich zdůvodnění: Analytické metody, používané pro analýzu organických látek v souvrství historických nebo uměleckých materiálů v minulosti a v současnosti**

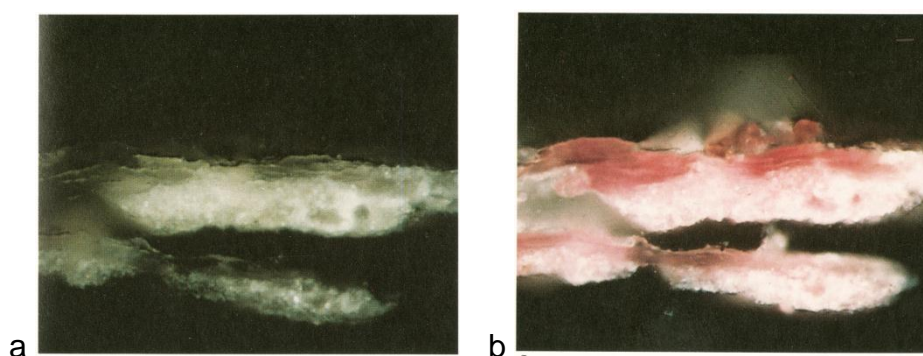
Když pomíneme metodu plošných sond, kterou lze aplikovat jen v některých případech a která podává orientační informace o barevnosti, ale nikoli o chemické povaze jednotlivých vrstev, jsou všechny analytické metody, používané pro analýzu organických látek v souvrství, metody invazivní, spojené s odběrem vzorku. Z odebraného materiálu je vždy v první řadě nutné vytvořit preparát pro optickou mikroskopii, aby bylo možné souvrství zdokumentovat a získat informace o charakteru jednotlivých vrstev (o jejich barevnosti, síle,

homogenitě, porozitě, ...). V ideálním případě pak tento preparát slouží i k chemické analýze materiálu.

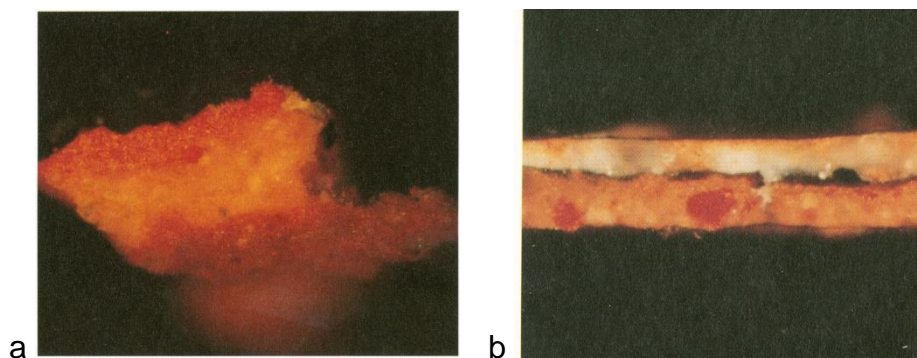
### III.1. Histologické metody

Histologické metody byly používány pro stanovení organických pojiv od 60. let minulého století. Využívají specifické barevné reakce konkrétních funkčních skupin, charakteristických pro určitý typ organického pojiva (např. oleje, bílkoviny, ...). Kromě toho, že vyhodnocení těchto reakcí je do značné míry subjektivní, hlavní nevýhodou této metody je její velmi omezené použití s ohledem na barevnost analyzovaných vrstev. (Tuto metodu nelze aplikovat na tmavé vrstvy, ani na vrstvy v barevném odstínu, který by v důsledku barevné reakce měl vzniknout.)

Obr.11a,b: Příklad barvení bílkovin fuchsinem v barevně neutrálním vzorku. Vzorek bez fuchsinu (a) a vybarvený fuchsinem (b).



Obr.12a,b: Příklad vzorků, barevně nevhodných pro barvení bílkovin fuchsinem.



### III.2. Chromatografické metody

Chromatografické metody začaly být pro analýzu organických pojiv používány koncem 60. let minulého století. Nejdříve se jednalo o tenkovrstvou chromatografii (TLC), později i plynovou chromatografii (GC), v 80. létech kapalinovou a vysokotlakou chromatografii (HPLC) a dále různé varianty a kombinace chromatografických a spektrálních metod (pyrolýzní chromatografie (pyr-GC), chromatografie/hmotnostní spektrometrie (GC/MS nebo HPLC/MS), a další).

Pro všechny chromatografické metody je společné, že je nelze použít pro analýzu naprosto neznámého vzorku. **Prvním předpokladem použití jakékoli chromatografické**

**metody je rozdělení vrstevnatého vzorku na jednotlivé vrstvy, které jsou pak analyzovány samostatně.** Je možné analyzovat pouze takový vzorek, o jehož povaze jsou již předem určité informace (např. jedná se o olej, o bílkovinu, polysacharid, ...). Až na základě této základní informace může být vzorek připraven pro analýzu (čištěn, rozpouštěn, derivatizován, ...) a na základě této informace mohou být zvoleny podmínky analýzy (typ kolony, teplotní gradient, způsob detekce, ...). Při respektování všech výše uvedených podmínek jsou tyto metody velmi citlivé a jejich výsledky velmi podrobné (např. lze takto odlišit jednotlivé typy olejů nebo oligosacharidů – rostlinných gum).

**Všechny tyto skutečnosti posouvají chromatografické metody z oblasti rutinních analýz spíše do oblasti výzkumu a detailních studií známého materiálu.**

### **III.3. Spektrální metody (FTIR a Ramanova spektroskopie)**

Nejčastěji se pro analýzu organických látek v oblasti konzervace a restaurování uměleckých a historických děl používá infračervená mikroskopie a/nebo Ramanova spektroskopie spojená s mikroskopem. IR spektroskopie pracuje se zářením z infračervené oblasti, Ramanova spektroskopie využívá jako zdroje záření různé typy laserů (z viditelné (VIS), z blízké infračervené (NIR), případně i z ultrafialové (UV) oblasti). Mikrospektrometrické měření, kdy je Ramanův spektrometr propojen s optickým mikroskopem, lze využít i pro analýzy *in situ*, bez odběru vzorku. IR i Ramanova spektra poskytují informace o vibračních a rotačních pohybech polyatomických částic (molekul, krystalů atd.). Vibrační pohyb se promítne do IR spekter jen tehdy, mění-li se při něm dipólový moment; aby se vibrace zobrazila v Ramanově spektru, musí při ní docházet ke změně polarizace. Informace, kterou podává IR spektroskopie, může být v Ramanově spektroskopii nedostupná (a naopak). Identifikační možnosti Ramanovy spektroskopie jsou srovnatelné s potenciálem IR spektroskopie, ale intenzity spektrálních linií vibračních frekvencí dané molekuly budou pro obě spektroskopické techniky zřetelně odlišné. V ideálním případě se tyto dvě metody doplňují.

**Nutným předpokladem pro úspěšnost spektrální analýzy je však taková příprava vzorku, která vyloučí kontaminaci analyzovaného vzorku jakýmkoli pomocnými materiály, což je námětem této metodiky.**

## **IV. Uplatnění certifikované metodiky – pro koho je určena a jak bude uplatňována**

Tato metodika je určena pro oblast materiálových analýz objektů kulturního dědictví (historických materiálů a uměleckých děl), respektive pro analýzu jednotlivých vrstev materiálových souvrství metodou FTIR mikroskopie. Diskutuje různé postupy, používané při přípravě vzorku, a uvádí postupy, které eliminují kontaminaci vzorku, a z tohoto hlediska tedy FTIR analýzu zatěžují minimální chybou. Měla by najít uplatnění v oblasti památkové péče, restaurování uměleckých děl, respektive restaurátorských průzkumů, studia historických sbírkových objektů a uměleckých děl.

Tato metodika je určena na jedné straně specialistům - technologům nebo analytickým chemikům, kteří budou analyzovat organická pojiva a barviva souvrství historických nebo uměleckých materiálů. Jim by měla pomoci zvolit analytickou metodu a postup přípravy vzorku tak, aby výsledky analýzy byly zatíženy co nejmenší chybou. Na straně druhé je určena i těm, kdo tyto analýzy zadávají a/nebo z nich vyvozují závěry. Jim by měla pomoci formulovat požadavek – zadání analýzy, dále posoudit hodnověrnost výsledku analýzy a správně jej interpretovat.

## V. Seznam použité literatury:

1. C. M. de Fonjaudran, A. Nevin, F. Piqué, S. Cather: Stratigraphic analysis of organic materials in wall painting samples using micro-FTIR attenuated total reflectance and a novel sample preparation technique; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **392**, 77-86 (2008).
2. S. Prati, E. Joseph, G. Sciutto, R. Mazzeo: New advances in the application of FTIR microscopy and spectroscopy for the characterization of artistic materials; *Accounts of chemical research* **43** (6), 792-801 (2010).
3. S. Prati, F. Rosi, G. Sciutto, R. Mazzeo, D. Magrini, S. Sotiropoulou, M. van Bos: Evaluation of the effect of six different paint cross section preparation methods on the performances of Fourier transformed infrared microscopy in attenuated total reflection mode; *Microchemical Journal* **103**, 79-89 (2012).
4. M. Derrick, L. Souza, T. Kieslich, H. Florsheim, D. Stulik: Embedding paint cross-section samples in polyester resins: Problems and solutions; *Journal of the American Institute for Conservation* **33** (3), 227-245 (1994).
5. R. Mazzeo, E. Joseph, S. Prati, A. Millemaggi: Attenuated total reflection-Fourier transform infrared microspectroscopic mapping for the characterisation of paint cross-sections; *Analytica Chimica Acta* **599**, 107-117 (2007).
6. J. van der Weerd, R. M. A. Heeren, J. J. Boon: Preparation methods and accessories for the infrared spectroscopic analysis of multi-layer paint films; *Studies in Conservation* **49**, 193-210 (2004).
7. Rizzo: Progress in the application of ATR-FTIR microscopy to the study of multi-layers cross-sections form works of art; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **392**, 47-55 (2008).
8. K. Flynn, R. O'Leary, C. Lennard, C. Roux, B. J. Reedy: Forensic applications of infrared chemical imaging: Multi-layered paint chips; *Journal of Forensic Sciences* **50** (4), 1-10 (2005); Paper ID JFS2004502.
9. C. Ricci, S. Bloxham, S. G. Kazarian: ATR-FTIR imaging of albumen photographic prints; *Journal of Cultural Heritage* **8**, 387-395 (2007).
10. J. Zięba-Palus, R. Borusiewicz: Examination of multilayer paint coats by the use of infrared, Raman and XRF spectroscopy for forensic purposes; *Journal of Molecular Structure* **792-793**, 286-292 (2006).
11. Scientific Working Group on Materials Analysis (SWGMAT): *Forensic Paint Analysis and Comparison Guidelines*; May 2000 Revision
12. R. Poli, O. Chiantore, A. Giovagnoli, A. Piccirillo: FTIR imaging investigation in MIR and in an enlarged MIR-NIR spectral range; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 2977-2984 (2012).
13. M. Tahtouh, K. Flynn, S. Walker, C. Roux, B. Reedy: *FTIR spectral imaging applications in trace evidence*; Centre for Forensic Science, University of Technology, Sydney, 1-12.
14. L. Vernoud, H. A. Bechtel, M. C. Martin, J. A. Reffner, R. D. Blackledge: Characterization of multi-layered glitter particles using synchrotron FT-IR microscopy; *Forensic Science International* **210** (1-3), 47-51 (2011).

15. K. Adamsons: Chemical depth profiling of multi-layer automotive coating systems; *Progress in Organic Coatings* **45**, 69-81 (2002).
16. J. van der Weerd, G. D. Smith, S. Firth, R. J. H. Clark: Identification of black pigments on prehistoric Southwest American potsherds by infrared and Raman microscopy; *Journal of Archaeological Science* **31**, 1429-1437 (2004).
17. F. Gruchow, S. Machill, S. Thiele, C. Herm, R. Salzer: Imaging FTIR spectroscopic investigations of wood: Paint interface of aged polychrome art objects; *e-Preservation Science* **6**, 145-150 (2009).
18. D. S. Moore, J. S. White, B. A. Harbin: Infrared sample preparation and interpretation using a knowledge based system; *Analytica Chimica Acta* **294**, 85-94 (1994).
19. M. R. Derrick, D. Stulik, J. M. Landry: *Infrared spectroscopy in conservation science: Scientific tools for conservation*; The Getty Conservation Institute, Los Angeles 1999. ISBN 0-89236-469-6.
20. J. Kirkwood, J. Wilson, M. Kansiz: *Material analysis by infrared mapping: A case study using a multi-layer paint sample*; Agilent Technologies, Inc., March 2011.
21. D. Kovala-Demertzi, L. Papathanasis, R. Mazzeo, M. A. Demertzis, E. A. Varella, S. Prati: Pigment identification in a Greek icon by optical microscopy and infrared microspectroscopy; *Journal of Cultural Heritage* **13**, 107-113 (2012).

## VI. Seznam publikací – výstupů z práce

1. I. Kopecká: Metodika pro analýzu organických látek ve vzorcích historických nebo uměleckých materiálů, které jsou tvořeny souvrstvím/I – možnosti a limity analytických metod, které byly/jsou pro tento typ analýzy používány; *Seminář k návrhu metodiky pro analýzu organických látek ve vzorcích historických nebo uměleckých materiálů, které jsou tvořeny souvrstvím, NTM, 23.6.2013*
2. E. Svobodová: Metodika pro analýzu organických látek ve vzorcích historických nebo uměleckých materiálů, které jsou tvořeny souvrstvím/II – příprava preparátu pro analýzu, která by byla zatížena co nejmenší chybou; *Seminář k návrhu metodiky pro analýzu organických látek ve vzorcích historických nebo uměleckých materiálů, které jsou tvořeny souvrstvím, NTM, 23.6.2013*
3. I. Kopecká, E. Svobodová: Methodology for FTIR analysis of sandwich multilayer samples of historical materials, *Conference Technart 2013 "Analytical Spectroscopy in Art and Archaeology at the Rijksmuseum", 23 – 26 September, 2013, Amsterdam* (přijátý příspěvek)

## VII. Souhrn – Summary – Zusammenfassung

Metodika pro oblast materiálůvých analýz objektů kulturního dědictví (historických materiálů a uměleckých děl), respektive pro analýzu jednotlivých vrstev materiálůvých souvrství metodou FTIR mikroskopie uvádí různé analytické metody i různé postupy, používané při přípravě vzorku, a navrhuje postupy, které eliminují kontaminaci vzorku tak, aby následující analýzy byly z tohoto hlediska zatíženy co nejmenší chybou.

Ze vzorku je třeba vytvořit preparát pro pozorování pod mikroskopem. Aby bylo možné vzorek v příčném řezu vybrousit, je nutné jej zpevnit a fixovat. Obvykle je zalit do syntetické pryskyřice, po jejím vytvrzení je broušen a leštěn. Přitom většinou dochází ke kontaminaci vzorku zalévací hmotou. Pryskyřice vniká do otevřených pórů či prasklin vzorku, anebo rozpouštědlo zalévací pryskyřice částečně rozpouští laky či nátěry analyzovaného souvrství. Přítomnost zalévací hmoty tak významně zkresluje výsledky analýzy, zejména složení okrajových vrstev souvrství, která jsou logicky kontaminována nejvíce. Interpretace FTIR spekter takto připravených preparátů je velmi obtížná, může být nejednoznačná, ne-li nemožná. K tomu přispívá i fakt, že analyzované vrstvy jsou obvykle směsí, v nichž bývá hledaná látka zastoupena jen minoritně (např. organické pojivo v barevné vrstvě). Z této skutečnosti vyplynul požadavek na jiný způsob přípravy preparátu, který by kontaminaci vzorku zalévací hmotou eliminoval, tj. izolace vzorku před zalitím do pryskyřice či zalisování vzorku do KBr tablety.

**Velmi dobře vyhověly vzorky pokovené, kde izolační vrstvou je napařená vrstva zlata nebo uhlíku (byl použit stejný postup, který je běžně používán při přípravě vzorků pro analýzu SEM). Tento způsob izolace vzorku však může být ovlivněn jeho morfologií.**

**Relativně dobré výsledky byly dosaženy i s použitím vodního skla a roztoku cyklododekanu jako izolantu. Tento způsob izolace vzorku však může být ovlivněn chemickou povahou vzorku.**

**Z hlediska přesnosti FTIR analýzy se jako nejvýhodnější jeví všechny postupy zalisování vrstevnatého vzorku do tablety KBr, které vylučují kontaminaci vzorku zalévací hmotou bez ohledu na jeho morfologii (porézní/neporézní, popraskaný, ...) a zároveň i bez ohledu na jeho chemickou povahu.**

### Summary

Methodology for chemical analysis of materials of cultural heritage (historical materials and artwork), resp. for the analysis using FTIR microscopy of the layers superposed in sandwich multilayer sample. Various analytical methods and different procedures used for sample preparation are discussed. Sample preparations eliminating any contamination are proposed.

The sample must be fixed and polished in the form of cross-section to could be observed using the microscope. The sample is usually embedded in synthetic resin, ground and polished. During this process the synthetic resin often contaminates the sample. The resin penetrates into the open pores or cracks in the sample, or solvent of the resin partially dissolves varnish or paint layers of sample which analyzed. In both cases, the presence of synthetic resin significantly distorts the results of analysis, in particular the composition of the external layers, which are of course the most contaminated. Interpretation of the FTIR spectra of individual layers in cross-sections is very difficult and can be ambiguous. This is supported by the fact that the analyzed layers are usually a mixture of substances, where the studied substance represents only a minority (par ex. organic binder in the paint layer). This fact led

to the requirement for different sample preparation methods, which would eliminate contamination of the sample by the embedding compound.

**In terms of accuracy FTIR analysis good results were achieved with samples covered by molecular layer of gold or carbon (used the same technique that is commonly used in the preparation of samples for SEM analysis). This method of insulation of the sample may be influenced by the morphology of the sample.**

**Relatively good results were achieved with the use of a water glass solution or cyclododecane as an insulator. This method of insulation of the sample may be influenced by the chemical nature of the sample.**

**In terms of accuracy FTIR analysis seems the best all procedures of pressing the layered sample in KBr tablets which exclude contamination of the sample by any other compound, regardless of the morphology of the sample (porous / non-porous, cracked, ...), and also regardless of its chemical nature.**

## **Zusammenfassung**

In der Methodik zu Materialanalysen von Objekten des Kulturerbes (historischer Materialien und Kunstwerke), respektive zur Analyse einzelner Materialschichten mittels der FTIR-Mikroskopie werden verschiedene analytische Methoden und Vorgänge für die Herstellung der Proben angeführt. Es werden Vorgänge empfohlen, die eine Probenkontamination ausschalten, damit die Analysen mit möglichst wenigen Fehlern belastet sind.

Aus der Materialprobe muss ein Präparat für die Mikroskopie vorbereitet werden. Es ist notwendig die Probe zu festigen und zu fixieren, um sie dann im Querschnitt schleifen zu können. Gewöhnlich wird die Probe mit synthetischem Harz vergossen und nach dem Aushärten geschliffen und poliert. Dabei kommt es oft zur Kontamination mit dem Gussmaterial. Das Harz dringt in die offenen Poren und Risse ein, oder das Lösungsmittel des Harzes löst die Firnisse und Lacke der zu analysierenden Schichten. Das Gussmaterial fälscht die Ergebnisse der Analyse erheblich, insbesondere die Zusammensetzung der Randschichten, die logischerweise am meisten kontaminiert sind. Die Interpretation der FTIR-Spektren solcher Proben ist sehr schwierig und kann mehrdeutig oder auch unmöglich sein. Dazu kommt auch, dass die analysierten Schichten sehr oft Mischungen sind und die gesuchte Substanz nur in kleiner Menge anwesend ist (z.B. ein organisches Bindemittel in der Malschicht). Durch diese Tatsache entstand die Notwendigkeit, eine andere Herstellungsmethode der Proben zu finden, die die Kontamination mit dem Gussmaterial verhindert.

**Ein sehr gutes Ergebnis brachten metallisierte Proben mit einer aufgedampften Isolationsschicht aus Gold oder Kohlenstoff (Probenvorbereitung wie für die SEM-Analyse). Diese Methode der Isolation der Proben kann aber durch die Morphologie der Proben beeinflusst werden.**

**Relativ gute Ergebnisse brachten auch die Anwendung von Wasserglas und einer Cyclododekanlösung als Isolator. Diese Art der Isolierung der Probe kann aber durch den chemischen Charakter der Probe beeinflusst sein.**

**Als beste Methode für die Exaktheit der FTIR-Analyse erscheint das Einpressen der Probeschichten in eine KBr-Tablette. Diese Methode schließt eine Kontamination der Probe mit der Gießmasse aus, ohne Einfluss der Morphologie der Probe (porös, nichtporös, rissig, ...) und ihres chemischen Charakters.**

## VIII. Seznam zkratek

ATR	technika zeslabeného totálního odrazu
FTIR mikroskopie	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací s mikroskopem
FTIR spektroskopie	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC	vysokotlaká (účinná) kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokotlaká kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
IR	infračervené záření
NIR	blízké infračervené záření
pyr-GC	pyrolýzní plynová chromatografie
RTG	rentgenové záření
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
$C_{12}H_{24}$	cyklododekan
KBr	bromid draselný
PES pryskyřice	polyesterová pryskyřice