



ИЗСЛЕДВАНЕ НА ОРГАНИЧНИ МАТЕРИАЛИ В ХУДОЖЕСТВЕНИ И АРХЕОЛОГИЧЕСКИ ОБЕКТИ С КОМБИНИРАНИ АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ

Лаборатория „Структурен органичен анализ“

Институт по органична химия с център по
фитохимия
Българска академия на науките



ИОХЦФ-БАН,
София, ул. Акад. Г.
Бончев, бл. 9



02 / 9606127
02 / 9606106
02 / 9606103



Bistra.Stamboliyska@
orgchm.bas.bg
Denitsa.Pantaleeva@
orgchm.bas.bg



http:
libra.orgchm.bas.bg
www.orgchm.bas.bg

БЛАГОДАРНОСТИ

Представената методология и изследвания са проведени с финансовото съдействие на Фонд „Научни изследвания“, в рамките на проект “Българско културно наследство – методология за изследване на органични материали” (КП-06-ОПР 05/5)



ФОНД
НАУЧНИ
ИЗСЛЕДВАНИЯ

МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА

1. ЗНАЧИМОСТ НА ИЗСЛЕДВАНИЯТА

Проучването на състава на различни материали от произведения на изкуството и археологически артефакти е безспорно актуална тема. Прилагането на инструментални методи при изучаването и възстановяването на различни културни ценности е представено в редица наскоро публикувани статии и книги [1-5].

Докато материалите от неорганичен характер са били обект на обширни проучвания от изследователи в областта на изкуството и археологията [1-5], изследванията на органичните материали са по-ограничен брой, вероятно защото са разнообразни и многобройни, съставът им е по-сложен и те претърпяват различни химически реакции на разлагане. Органичните материали в археологически контекст, в класически предмети на изкуството и съвременни произведения на изкуството могат да бъдат еднакви или да принадлежат към един клас, но също могат да се различават значително, като често имат и различни пътища на стареене [1].

Проучването на съединенията с биологичен произход в произведенията на изкуството е абсолютно необходимо за определяне на оригиналните материали, за разграничаване на техниките на рисуване, които са били използвани през вековете, за диагностициране на измененията, спиране на процесите на разграждане и за определяне на процедурата за възстановяване в оригинален вид. Освен това, повечето древни свързващи вещества са съединения от домашна употреба, използвани в широк спектър от приложения. По този начин анализът на свързващите вещества и свързаните с тях материали е важен не само за изследване на произведения на изкуството и използвани техники, но и за задълбочаване на познанията за обичаите на древните цивилизации.

Анализът и идентификацията на органичните материали е от голямо значение и за избора на най-подходящата методология за консервацията и реставрацията на културните обекти.

2. ПОДХОДИ ЗА АНАЛИЗ НА ОРГАНИЧНИТЕ МАТЕРИАЛИ

Идентификацията на органичните материали в археологическите находки и произведения на изкуството остава предизвикателство поради обичайно по-малките количества на органичните материали в сравнение с неорганичните (пигменти и хоросан), процесите на разлагане, които допълнително намаляват количествата им, присъствието на смесена техника в произведенията, замърсяването с материали, използвани при предходни възстановителни интервенции и др. Най-добрата стратегия за преодоляване на тези трудности е използването и комбинирането на информацията от няколко вида изследвания.

Сред разнообразието от аналитични техники за идентифициране и характеризиране на различните класове органични съединения [7-25], по-долу ще разгледаме някои техники на анализ, които бяха тествани и валидирани по време на проекта, каква

допълващата се информация може да се получи чрез тях и някои конкретни примери от нашата практика.

- Преди избора на аналитични техники е важно да се направи предварително проучване на историческата обстановка, състоянието на обектите и да се уточнят материалите, които ще се анализират. Въз основа на това ще се формулират по-ясно изследователските въпроси, ще се състави изследователски план за химичен анализ на материалите и ще се изберат подходящите техники.
- Важно е да се познава химическата природа на различните органични материали. Органичните материали от естествен произход, използвани в художествените и археологически обекти, могат да се разделят най-общо на следните класове:
 - протеини (всякакви животински лепила на основата на колаген – т. нар. туткали, яйце, казеин т.е. протеина, извлечан от млякото, кръв и др.);
 - въглеводороди – глюкоза, фруктоза, захар, мед, т. нар. растителни гumi – извлечани от сока на различни дървета като акация (гума арабика), череша, вишна, праскова, слива и др., гumi трагант, гumi гути, тамян, въглеводородни лепила, извлечени от жито, ленено семе и др.;
 - липиди – растителни масла като ленено, орехово, маково и др., животински мазнини, включително мазнините, съдържащи се в яйчения жълтък, пчелен восък и др.
 - терпенови смоли – смоли, съдържащи смес от терпенови съединения, добивани от растителни и животински източници като например колофон, сандарак, мастикс, дамара, шеллак и др.
 - въгледороди – природен битум, катрани, парафини и др.
- Настоящата методология не обхваща съвременните синтетични материали, които са много разнообразни по състав, често са синтетични полимери и изискват отделно внимание.

Литература:

- [1] R. Mazzeo (Ed.), *Analytical Chemistry for Cultural Heritage, "Topics in Current Chemistry Collections" Series*, Springer International Publishing AG, 2017.
- [2] J. M. Madariaga, *Analytical chemistry in the field of cultural heritage*, *Anal. Methods*, 7, 4848-4876, 2015.
- [3] Kuleff, I. *Archaeometry*, Sv. Kliment Ohridski, Sofia, 2012.
- [4] D. Bersani, P. P. Lottici, *Raman spectroscopy of minerals and mineral pigments in archaeometry*, *J. Raman Spectrosc.*, 47, 499, 2016.
- [5] B. Witkowski et al., *Identification of proteins, drying oils, waxes and resins in the works of art micro-samples by chromatographic and mass spectrometric techniques*, *J. Sep. Sci.*, 41, 630, 2018.
- [6] R. P. Evershed, *Organic residues in archaeology: the archaeological biomarker revolution*. *Archaeometry* 50: 895-924, 2008.
- [7] Pecci A. *Organic Residue Analysis in Archaeology*. In: Smith C. (eds) *Encyclopedia of Global Archaeology*. Springer, New York, NY. 2014
- [8] *Biomolecular archaeology: an introduction*. Chichester: Wiley; R. P. Evershed, *Experimental approaches to the interpretation of absorbed organic residues in archaeological ceramics*. *World Archaeology* 40, 26-47, 2008.

- [9] M.P. Colombini, F. Modugno. *Organic mass spectrometry in art and archaeology*. Wiley, Chichester, U.K., 2009.
- [10] I. Bonaduce, A. Andreotti, Py-GC/MS of Organic Paint Binders, In "Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology", M. P. Colombini, F. Modugno (Eds.), Wiley, 2009, chapter 11.
- [11] A. Pecci et al. Identifying wine markers in ceramics and plasters with gas chromatography-mass spectrometry. *Experimental and archaeological materials, J. Archaeol. Sci.*, 40, 109, 2013.
- [12] A. Pecci et al. Residue analysis of some Late Roman amphorae coming from the port of Classe (Ravenna - Italy): relationship between form and function, in S. Menchelli, M. Pasquinucci & S. Santoro (ed.) *LRCW3. Late Roman coarse wares, cooking wares and amphorae in the Mediterranean. Archaeology and archaeometry (BAR International series 2185): 617-22*. Oxford: Archaeopress; 2010.
- [13] Regert, M. Analytical strategies for discriminating archeological fatty substances from animal origin. *Mass Spectrometry Reviews* 30, 177, 2011.
- [14] Ciliberto, E. & G. Spoto. *Modern analytical methods in art and archaeology*. New York: Wiley-Interscience, 2000.
- [15] M. Pollard, C. Heron. *Archaeological chemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008.
- [16] E. Patrick et al, Ancient Egyptian herbal wines, *PNAS* May 5, vol. 106, no. 18, 7361, 2009.
- [17] P. Richard et al. Chemistry of Archaeological Animal Fats, *Acc. Chem. Res.*, 35, 660, 2002.
- [18] I. Bonaduce et al. New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study, *PLOS ONE*, 7, e49333, 2012.
- [19] Bonaduce I et al. A multi-analytical approach to studying binding media in oil paintings. Characterisation of differently pre-treated linseed oil by DE-MS, TG and GC/MS. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 107, 1055, 2012.
- [20] C. Duce et al., Physico-chemical characterization of protein-pigment interactions in tempera paint reconstructions: casein/cinnabar and albumin/cinnabar. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 402, 2183, 2012.
- [21] A. Lluveras, et al., GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipids, Natural Waxes, Terpenoid Resins, Proteinaceous and Polysaccharide Materials in the Same Paint Microsample Avoiding Interferences from Inorganic Media. *Analytical Chemistry* 82, 376–386, 2010.
- [22] J. Pires, Cruz AJ, Techniques of thermal analysis applied to the study of cultural heritage. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 87, 411, 2007.
- [23] D. Fessas et al. , Calorimetric, biochemical and morphological investigations to validate a restoration method of fire injured ancient parchment. *Thermochimica Acta* 348, 129–137, 2000.
- [24] M. Tomassetti et al. Archaeometric classification of ancient human fossil bones, with particular attention to their carbonate content, using chemometrics, thermogravimetry and ICP emission, *Chemistry Central Journal*, 8, 26, 2014.
- [25] *Organic Materials in Wall Paintings: Project Report*, Francesca Piqué and Giovanni Verri (Eds.), The Getty Conservation Institute, J. Paul Getty Trust, Los Angeles, 2015, ISBN 978-1-937433 (online resource).

ВИБРАЦИОННА (ИНФРАЧЕРВЕНА) СПЕКТРОСКОПИЯ

ИЧ спектроскопията е универсална техника, с която могат да се изследват твърди вещества, течности, газове, както и компоненти в смеси. Повечето от материалите на културното наследство (бои, лакове, свързватели, влакна, глини, синтетични лепила и др.) могат да бъдат анализирани с ИЧ спектроскопия. Тя директно осигурява полезна молекулна и структурна информация за органични и неорганични съединения, които се съдържат в пробата – идентифицирането става въз основа на характеристикните абсорбционни ивици, наблюдавани в ИЧ спектъра на материала. Тези ивици се дължат на абсорбцията на инфрачервено лъчение от веществото в резултат от трептенето на различните атомни групировки (функционални групи) в състава му и по тях може да се съди за наличието или отсъствието на различни органични и неорганични съединения в изследваната проба.

Подходяща начална стъпка в анализа на материалите е *in situ* недеструктивният ИЧ анализ директно върху обекта (стенописи, мазилка, керамика, картини и др.) чрез отражателна техника – с т.нар. **отслабено пълно вътрешно отражение (ATR, attenuated total reflectance)**. При тази отражателна техника на анализ ИЧ спектрите на пробите се измерват без предварителна подготовка. Като ATR кристал може да се използва цинков селенид или диамант, като вторият е особено подходящ, тъй като притежава висока твърдост, не се надрасква от изследваните материали и осигурява широк спектрален обхват на изследване. Стритите проби се нанасят върху ATR кристала и се притискат към повърхността му с метален тип. Течните образци от органичен произход като растителни масла се изследват като тънък филм. Екстрактите в органичен разтворител се отлагат като филм чрез накапване върху ATR кристала.

Директно изследване на обект чрез отражателна (ATR) техника на анализ



Нанасяне на твърди проби върху ATR приставката



- Предимства на метода: малко необходимо количество проба за анализ (1-2 мм в диаметър; 0.1-0.5 мг); не се изисква никаква предварителна подготовка на пробите за анализ; бързина на анализа (за време от порядъка на 1-2 минути); могат да се изследват различни повърхности на пробата; след провеждане на ИЧ

анализа пробите са химически непроменени и при необходимост могат да се използват за други анализи.

- Недостатъци: по-слаба интензивност на ивиците, механично въздействие върху пробата при притискане.

При наличие на достатъчно материал (2-3 мг) друга подходяща техника на ИЧ анализ е **абсорбционната техника**, при която твърдите проби се смесват с инертен материал (калиев бромид, непоглъщащ в средната ИЧ област) и пресоват в таблетки.

- Предимства на метода: силно интензивни ивици в спектъра.
- Недостатъци: изследваната проба не може да се възстанови за друг анализ, по голямо необходимо количество, по-дълга пробоподготовка.

Характеристичните ивици на органичните материали се наблюдават в средната ИЧ област ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), така че този спектрален интервал осигурява пълната необходимата информация за идентифициране им. В този спектрален интервал се появяват и ИЧ ивиците на много от неорганичните материали като например карбонати, силикати, сулфати, фосфати, цианиди и др., но част абсорбциите на органичните материали попадат в области ($3100-3000$; $1800-1600\text{ cm}^{-1}$), специфични само за тях, което позволява идентифицирането им дори в смес.

Някои от често използваните червени, оранжеви и жълти минерални неорганични пигменти съдържат оксиди, сулфиди или хидроксици на тежки метали - например минимум (Pb_3O_4), хематит (в състава на червената охра, Fe_2O_3), гьотит и лимонит (в състава на червената и жълтата охра, $\alpha\text{-FeO(OH)}$ и $\text{FeO(OH)}\cdot n\text{H}_2\text{O}$), цинобър (HgS), реалгар ($\alpha\text{-As}_4\text{S}_4$), аурипигмент (As_2S_3), оловна глеч (PbO) и др. Поради химичния си състав, тези минерали поглъщат в спектрален диапазон под 400 cm^{-1} (в така наречената далечна ИЧ област). Те успешно могат да се идентифицират с помощта на ИЧ спектроскопия в далечната област и/или Раманова спектроскопия. Идентифицирането на пигментите значително се улеснява при използването на Раманов микроскоп, който дава възможност за измерване на спектъра на всеки минерал поотделно в сложната смес на боята чрез фино фокусиране на лъча върху частиците му. В този спектрален диапазон органичните материали нямат характеристични поглъщания.

Литература:

- [1] Г. Андреев. Молекулна спектроскопия. УИ, Пловдив, 1999.
http://web.uni-plovdiv.bg/andreev/andreev_ms_2010.pdf
- [2] Ст. Спасов, М. Арнаудов, Приложение на спектроскопията в органичната химия, Изд. Наука и изкуство, София, 1978.
- [3] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, 2004.
- [4] M. R. Derrick, D. Stulik, J. M. Landry, *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, J. Paul Getty Trust Eds., 1999.
- [5] G. Bitossi, R. Giorgi, M. Mauro, B. Salvadori, L. Dei, *Spectroscopic Techniques in Cultural Heritage Conservation: A Survey*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 2005, 40, 187–228.
- [6] *Organic Materials in Wall Paintings: Project Report*, Francesca Piqué and Giovanni Verri (Eds.), The Getty Conservation Institute, J. Paul Getty Trust, Los Angeles, 2015, ISBN 978-1-937433 (online resource).

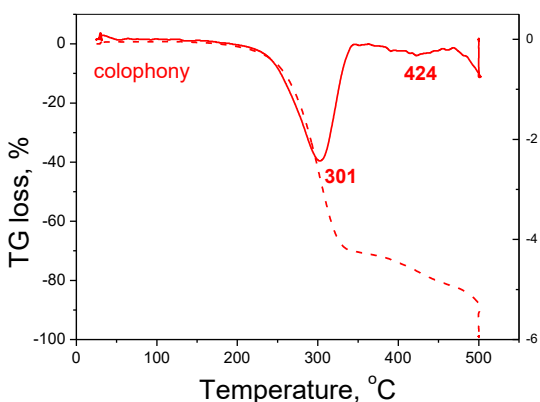
ТЕРМОГРАВИМЕТРИЧЕН АНАЛИЗ (TGA)

Термогравиметричният анализ е важна и мощна техника за изследване на топлинните свойства на материалите и тяхната термична стабилност. Този метод ни дава възможност да следим измененията на масата на даден образец с повишаване на температурата, като ни дава информация за различни физични и химични процеси, които протичат с промяна на неговото тегло (изпарение, сублимация, абсорбция, адсорбция или десорбция, хемосорбция, дехидратация, разлагане, както и за реакции на редукция и окисление). Методът има висока чувствителност и позволява да бъдат изследвани милиграмови количества от образците.

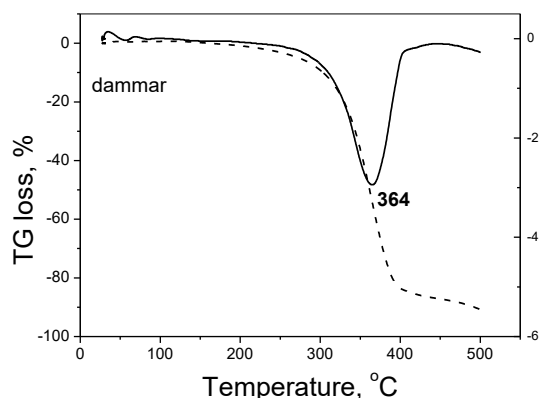
TGA е може да се прилага и в случаите, когато имаме малко количество от пробата, тъй като методът позволява увеличаване на теглото на пробата чрез добавяне на инертен материал, например силициев диоксид, непоказващ термични преходи в изследвания температурен интервал.

- По този начин могат да се идентифицират редица органични материали от горе описаните класове – масла, восъци, смоли, протеини и въглехидрати. Това става въз основа на термогравиметричните криви на загубата на тегло, както и техните първи производни (ДТГ кривите), които ни дават точна информация за температурите на регистрираните ефекти.

TGA анализ на растителна смола колфон



TGA анализ на растителна смола дамара



Литература:

[1] J. Pires, A. J. Cruz, Techniques of thermal analysis applied to the study of cultural heritage. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 87, 411, 2007.

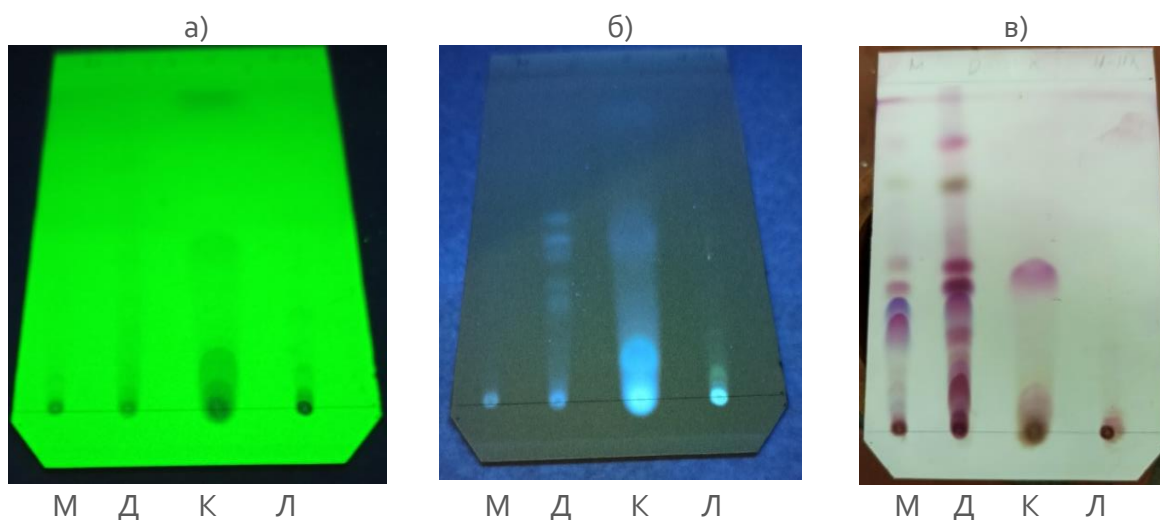
[2] D. Fessas et al., Calorimetric, biochemical and morphological investigations to validate a restoration method of fire injured ancient parchment. *Thermochimica Acta* 348, 129–137, 2000.

[3] M. Tomassetti et al. Archaeometric classification of ancient human fossil bones, with particular attention to their carbonate content, using chemometrics, thermogravimetry and ICP emission, *Chemistry Central Journal*, 8, 26, 2014.

ТЪНКОСЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ (TLC)

Тънкослойната хроматография също предлага възможност за идентифициране на органичните материали чрез **лесен за изпълнение метод и с нескъпа лабораторна апаратура** – УВ лампа за разчитане на тънкослойните плаки. За разчитането могат да се прилагат и химически проявители – разтвори от химически реагенти, които водят до оцветяване на петната на различните компоненти, получени при разделянето.

С тази техника могат да се идентифицират различни растителни смоли (дамара, мастикс, колофон, сандарак, растителни масла и др. Техниката на анализ е илюстрирана по-долу с анализа на референтни растителни смоли и проба от лак от картина. Използвана е елуираща смес от етер и хептан в съотношение 6:5 и постепенна детекция на петната, получени при елуирането, с УВ светлина при 254 и 366 nm, и реагент, съдържащ от р-анисалдехид, перхлорна киселина, ацетон и вода.



Идентифициране на растителни смоли с елуираща смес етер/хептан в съотношение 6:5 и постепенна детекция на петната, получени при елуирането: а) с УВ светлина при 254 nm; б) с УВ светлина при 366 nm; в) с реагент, съдържащ от р-анисалдехид, перхлорна киселина, ацетон и вода. Пробите са означени като М (мастикс), Д (дамара), К (колофон) и Л (лак от картина).

Максимално точно идентифициране на различните смоли се постига при комбинираното прилагане на трите метода за проявяване, но дори и само проявяване с химическия проявител позволява ясното им разграничаване. Използваната елуираща смес е значително по-нетоксична от смесите бензен-метанол и хлороформ-метанол.

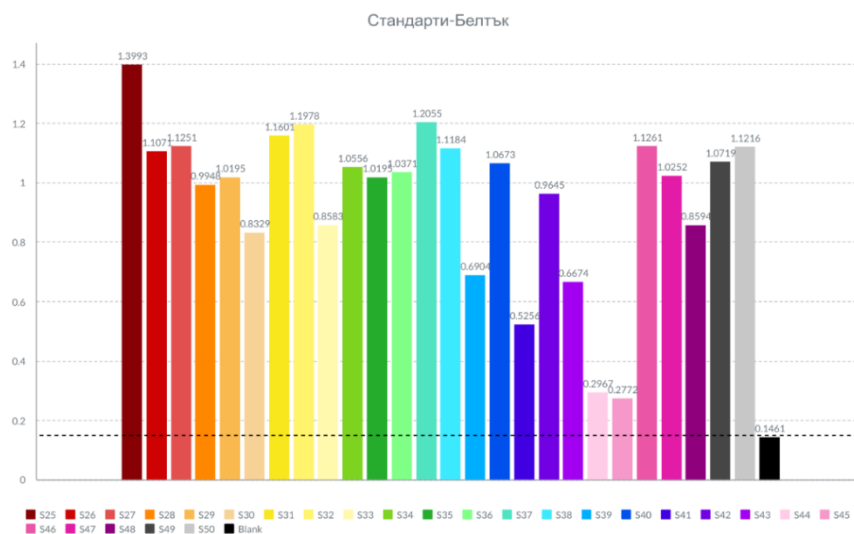
Литература:

[1] M. F. Striegel, J. Hill, Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis, Scientific Tools for Conservation, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, J. Paul Getty Trust Eds., 1996.

ИМУНОЕНЗИМЕН МЕТОД (ELISA АНАЛИЗ)

Имуноензимният метод е **силно специфичен метод**, позволяващ идентифицирането на протеини (в животински туткали, кожа), липиди (в растителни масла и животински мазнини), въглеhidрати (в мед, растителни гуми, нишестета, хартия), и комплексни материали (кръв, яйце, растителни сокове) чрез използване на подходящи антители. Широко приложим е за различаване на протеинови материали. Голямо предимство на метода е възможността да различава недвусмислено близки по рода си материали напр. заешки от рибен туткал и т.н. **Способен е да открива изключително малки количества вещества (о.3-3б нанограма).**

- При анализа трябва да се имат предвид някои особености – като например намалени граници на отчитане в резултат от преченето на някои неорганични материали (определени пигменти например), затруднено извличане на органичния материал от пробите и др.
- Освен високата специфичност, добро допълнително предимство на метода е, че анализът е лесен за изпълнение посредством проста и нескъпа лабораторна апаратура – спектрометър за разчитане на микротитърните плаки от имуноензимния анализ.



Идентифициране на яйчен белтък в моделни образци на бои

Литература:

- [1] N. Khandekar, A. Phenix, J. Sharp., Pilot study into the effects of solvents on artificially aged egg tempera paint films. *The Conservator*, 18, 62-72, 1994.
- [2] J. Mazurek, M. Schilling, G. Chiari, Antibody assay to characterize binding media in paint. *Scientific research, ICOM Committee for Conservation*, 849-856, 2008.

ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФИЯ В КОМБИНАЦИЯ С ПИРОЛИЗА И МАССПЕКТРОМЕТРИЯ

Газовата хроматография в комбинация с пиролиза и масспектрометрия и **позволява идентифицирането на много широк набор от органични материали**, както от естествен произход, така и синтетични полимерни продукти.

Анализът може да се извърши с минимални количества (2-5 мг) и без **никаква предварителна химическа трансформация** в летливи компоненти. Пиролизата на материала води до силно специфичен набор от разпадни продукти, които благодарение на следващото разделяне по газ-хроматографски път и детектиране на базата на масата, дава възможност за много надеждно идентифициране на органичните материали.

Допълнително предимство на метода е, че позволява да се получи **информация едновременно както за фракции от пробата, които могат да се извлекат с разтворител или хидролизират, така и за неразтворими макромолекулни фракции**.

С този аналитичен метод успешно е изследван състава на лакове, битуми и катрани, мастила, ръкописи, свързватели в стенописи и картини, лепила за позлата и други материали, използвани в произведения на изкуството.

Литература:

- [1] J. Poulin, M. Kearney, M.-A. Veall, Direct Inlet Py-GC-MS analysis of cultural heritage materials, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 164, art. no 105506, 2022.
- [2] D. Tamburini, Analytical pyrolysis applied to the characterisation and identification of Asian lacquers in cultural heritage samples – A review, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 157, art. no 105202, 2021.
- [3] F. Nardella, C. Duce, E. Ribechini, Analytical pyrolysis and thermal analysis to chemically characterise bitumen from Italian geological deposits and Neolithic stone tools, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 158, art. no 105262, 2021.
- [4] Z. Sebestyén, E. Badea, C. Carsote, Z. Czégény, T. Szabó, B. Babinszki, J. Bozi, E. Jakab, Characterization of historical leather book bindings by various thermal methods (TG/MS, Py-GC/MS, and micro-DSC) and FTIR-ATR spectroscopy, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 162, art. no 105428, 2022.
- [5] J. La Nasa, P. Carnazza, S. Francone, M. P. Colombini, F. Modugno, Is this tar? Analytical pyrolysis to study the chemical composition of Alberto Burri's paint materials, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 163, art. no 105483, 2022.
- [6] E. Perruchini, G.-J. Pinault, M. Sablier, Exploring the potential of pyrolysis-comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry in the characterization of Chinese inks of ancient manuscripts, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 164, 105503, art. no 2022.
- [7] I. Bonaduce, A. Andreotti, Py-GC/MS of Organic Paint Binders, In "Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology", M. P. Colombini, F. Modugno (Eds.), Wiley, 2009, chapter 11.

3. МЕТОДОЛОГИЯ ЗА АНАЛИЗ НА ОРГАНИЧНИ МАТЕРИАЛИ

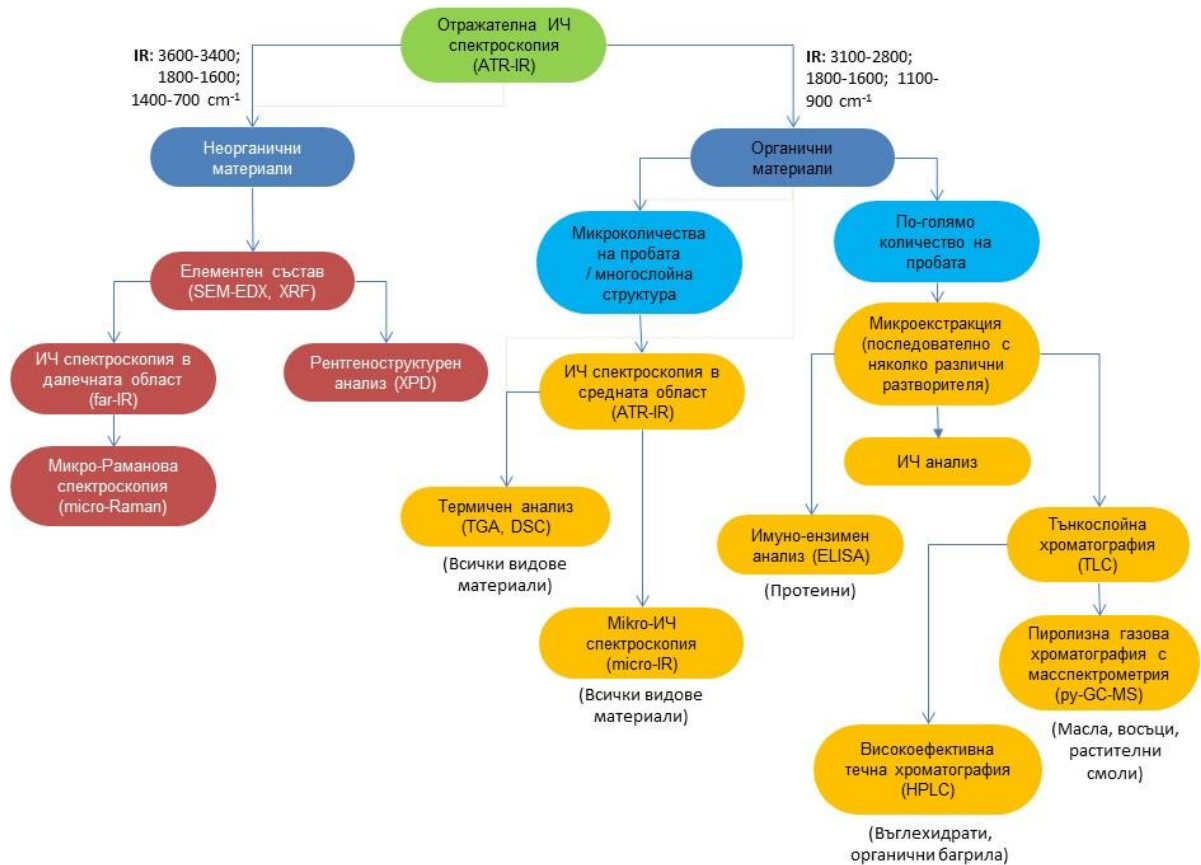
Сложният хетерогенен характер, типичен за пробите от художествени и археологически обекти, налага паралелно в хода на анализа да бъдат надеждно идентифицирани и неорганичните материали, които са обичайно преобладаващи по количество в сместа (виж схемата по-долу). Това може успешно да се постигне чрез прилагане на поредица от инструментални методи – сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно дисперсионната спектроскопия (SEM-EDX) или рентгенова флуоресценция (XRF) за определяне на елементния състав като първа стъпка; ИЧ анализ в далечната спектрална област ($400-80\text{ cm}^{-1}$) и/или микро-Раманова спектроскопия за уточняване на отделните пигмент и пълнители. При възможност – например при прахообразни проби от стенописи или малки фрагменти със сравнително плоска повърхност е препоръчително провеждането на прахов рентгеноструктурен анализ за уточняване на минералните фази. Микро-Раманова спектроскопия предлага особено широки възможности за идентифициране на отделните материали, както в състава на прахообразни проби, така и при фрагменти, микропроби и аншлифове. Методът се характеризира с много висока пространствена резолюция благодарение използването на лазерен източник – типично могат да се изследват частици с размер 1-2 микрона. Затруднение представлява проявата на флуоресценция от някои материали. В това отношение, ИЧ спектроскопията няма ограничение, но методът не може да предложи така висока пространствена резолюция.

При идентифициране на ивици за органичен материал биха могли да се предприемат два подхода за по-нататъшен анализ според наличното количество проба. Първият от тях – когато количеството е твърде ограничено (микроскопични количества), е необходимо да се комбинират ИЧ и микро-Раманови измервания с термичен анализ (TGA, DSC), а при възможност – и с провеждане на микроекстракция и имуноензимен анализ.

За провеждане на термичния анализ при много малки проби (под 2 мг) един добър практически подход е увеличаване на теглото на пробата чрез добавяне на инертен материал.

При наличие на 2-5 мг проба, за по-надеждно идентифициране на органичния материал може да се предприеме микроекстракция с подходящ разтворител или поредица от разтворители.

Обобщена схема за анализ на органични (и съпътстващите неорганични) материали



Най-често неорганичните материали поглъщат силно в инфрачервената област и техните ивици припокриват значителна част от ивиците на органичните материали, затова извличането само на органичния материал в пробата дава възможност за следващ ИЧ спектрален анализ, при който информацията е значително по-богата.

Анализът може да се проведе стъпка по стъпка по следния начин:

Стъпка 1. Установяване на наличието на органично вещество с помощта на ИЧ спектроскопия

ИЧ спектроскопията е много подходящ метод за започване на анализа. Благодарение на специфичните области на поглъщане на органичните материали, които не се припокриват с тези на неорганичните материали - като областта между 3100 и 2800 cm^{-1} , ИЧ спектърът е в състояние да покаже

наличието на органично съединение, дори и в значително по-малко количество от неорганичните компоненти. Ако ивиците са много слабо интензивни ивици (количеството органичен материал е незначително), за по-надеждно идентифициране на органичния материал може да се предприеме микроекстракция с подходящ разтворител или поредица от разтворители. Последователната екстракция на органичните съставки с разтворители с нарастваща полярност (например хексан → ацетон → топла вода → студена вода) осигурява най-пълна информация, тъй като различните по своята природа растителни смоли, растителни масла, восъци, въглехидрати и протеини притежават и различна разтворимост. Извличането само на органичния материал в пробата дава възможност за следващ ИЧ спектрален анализ, при който информацията е значително по-богата.

Стъпка 2. Разграничаване на вида на органичния материал

Следващата стъпка при анализа трябва да е насочена към по-общо определяне на химическия клас, към който принадлежи органичния материал. Както беше разгледано по-горе основните класове за естествените по произход органични материали са протеини, въглехидрати, липиди, терпенови смоли. Органични са и част от използваните пигменти на растителна основа – т.нар. органични багрила като индиго, краплак и др.

На базата на характеристикните ивици във вибрационните спектри, в някои случаи може химическият клас на органичния материал да се идентифицира достоверно само въз основа на ИЧ спектър.

Например при протеиновите материали се наблюдават ясно различни характеристикни ИЧ ивици в следните интервали:

- 3400-3200 cm^{-1} – валентни N-H трептения (Амид А)
- 1660-1600 cm^{-1} – валентни C=O трептения (Амид I)
- 1565-1500 cm^{-1} – деформационни N-H трептения (Амид II)

За разлика от това, при растителните масла, които попадат в класа на липидите, характеристикни ИЧ ивици са в по-различни интервали:

- 3000-2800 cm^{-1} – валентни C-H тр.
- 1750-1720 cm^{-1} – валентни C=O тр.
- 1480-1300 cm^{-1} – деформационни C-H тр.
- 1300-900 cm^{-1} – валентни C-O тр.
- 750-700 cm^{-1} – извънравнинни деформационни C-H тр. (торзионни)

При анализа на някои органични материали може да се наблюдават характеристикни ИЧ ивици за органични съединения от повече от един клас – тъй

като те представляват сами по себе си естествена смес както например яйцето е смес от протеини и мазнини (липиди) или тъй като при изработката са били смесени няколко различни органични материала.

Органичните материали често са претърпели и процеси на стареене и химическа трансформация. В тези случаи и продуктите на трансформацията присъстват в сместа. Например протеиновият свързвател би могъл да образува калциев оксалат в следствие на микробиологична атака; растителни масла, които първоначално са претърпели полимеризация при съхненето, впоследствие може да хидролизират или да се преобразуват частично в метални карбоксилати при взаимодействие с минералните пигменти и т.н.

Стъпка 3. По-точно определяне на вида на органичния материал

ИЧ спектралният анализ не винаги е достатъчен за точното идентифициране на органичните материали – например при близките по химичен състав растителни смоли спектралният анализ би могъл да покаже дали смолата е от дитерпенов или тритерпенов вид, но не и да различи различните тритерпенови смоли като мастикс и дамара; диференцирането на различните протеинови материали също не е възможно по спектрален път.

При идентифициране на ИЧ ивици за протеинов материал може да се проведе допълнително и имуноензимен анализ, който е силно специфичен и дава точна информация за вида на протеина – яйчен овалбумин, млечен казеин, животински колаген и т.н.

При идентифициране на ИЧ ивици за въглехидрати, растителни масла, смоли или восъци, може да се предприеме изследване с тънкослойна хроматография (TLC), която е също бърз и прост метод с изискване за минимално количество проба и в същото време е широко приложим върху всякакъв вид органични материали.

Добри възможности за уточняване на вида на растителните смоли, протеините и въглехидратите предоставя и термичният анализ.

Най-висока степен на точност предлагат инструменталните хроматографски методи – например газовата хроматография в комбинация с пиролиза и масспектрометрия (py-GC-MS) или високоефективна течна хроматография (HPLC), затова оптималният подход би бил провеждане и на един от тези видове анализ.

4. АНАЛИЗ НА ОРГАНИЧНИ МАТЕРИАЛИ В ХУДОЖЕСТВЕНИ И АРХЕОЛОГИЧЕСКИ ОБЕКТИ

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ЯЙЧЕН СВЪРЗВАТЕЛ ПРИ СТЕНОПИСИТЕ В ГРОБИЩНАТА ЦЪРКВА С КОСТНИЦА „ВЪВЕДЕНИЕ БОГОРОДИЧНО“, РИЛСКИ МАНАСТИР

За уточняване на стенописната техника, използвана в Гробищната църква с костница „Въведение Богородично“ на Рилския манастир, изписана през 1795 г., бяха събрани серия микропроби от различни цветове от стенописните изображения на св. Никифор и св. Орест:

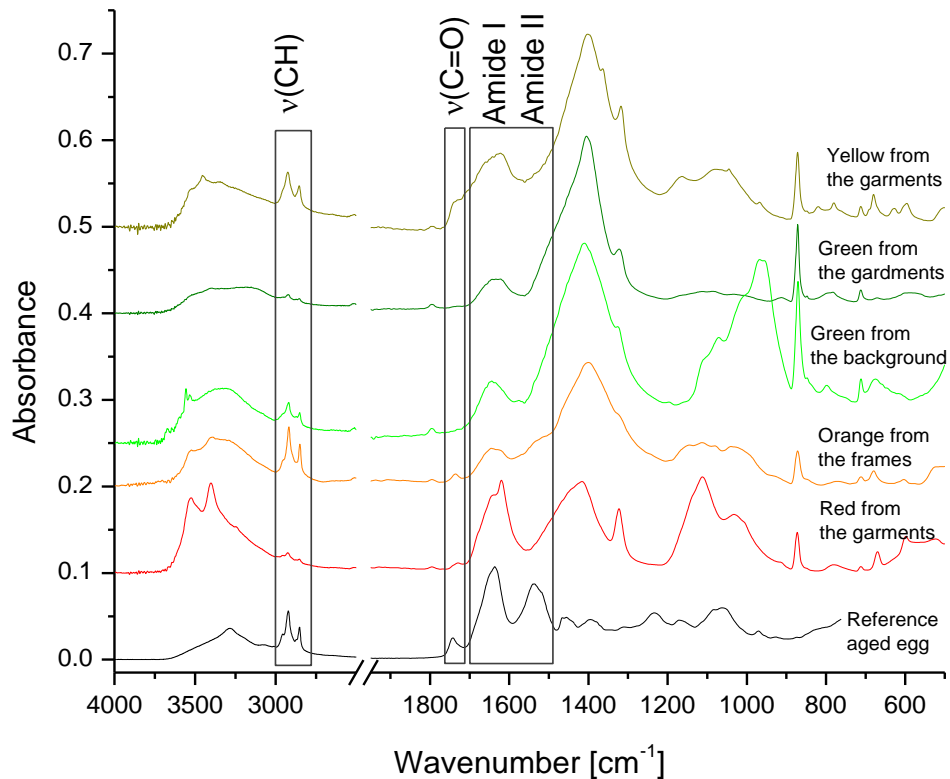
Стенописни изображения на св. Никифор и св. Орест



Събрани микропроби: жълта боя от дрехата, зелена боя от дрехата, червената боя от дрехата, бяла боя от кръста, синя боя от фона, зелена боя от фона, оранжева боя от рамката, бяла боя от рамката.

Събраните микропроби бяха изследвани първоначално с ИЧ спектроскопия – част от измерените ATR спектри са представени на следващата фигура заедно с описание на местата, откъдето са взети.

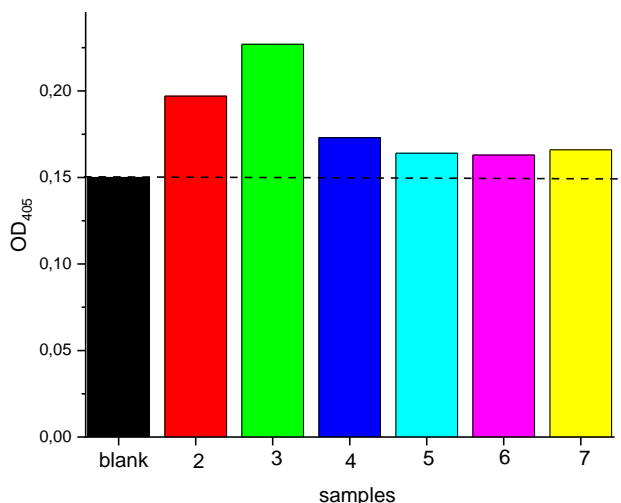
ATR спектри на жълтата боя от дрехата, зелената боя от дрехата, зелената боя от фона, оранжевата боя от рамката, червената боя от дрехата и референтно яйце



В спектрите на изследваните проби, заедно с ивиците на минералните пигменти присъстват и характеристични ивици за органични материали – абсорбционни ивици за протеини около 3300 cm⁻¹ (валентни N-H трептения), 1640 cm⁻¹ (Амид I, валентни C=O трептения) и 1550 cm⁻¹ (Амид II, деформационни CNH трептения); за мазнини при около 1730 cm⁻¹ (валентни C=O трептения), както и за валентни C-H трептения в областта на 2960–2850 cm⁻¹ (протеини/мазнини). Едновременното присъствие на характеристични ивици за протеини и мазнини може да бъде свързано с наличието на свързвател яйца (включващо яйчен белтък и жълтък).

За да бъде потвърдено използването на яйца като свързвател беше проведен допълнителен имуноензимен анализ. Пробите бяха тествани с антитела за яйчен белтък и казеин. Резултатите ясно показаха наличието на яйчен белтък в пробите, тъй като при всички проби стойността за сигнала е над граничната стойност на анализа (долна граница на откриване).

Получените резултати за изследваните микропроби са представени по-долу, където пунктираната линия обозначава граничната стойност на анализа (долна граница на откриване):



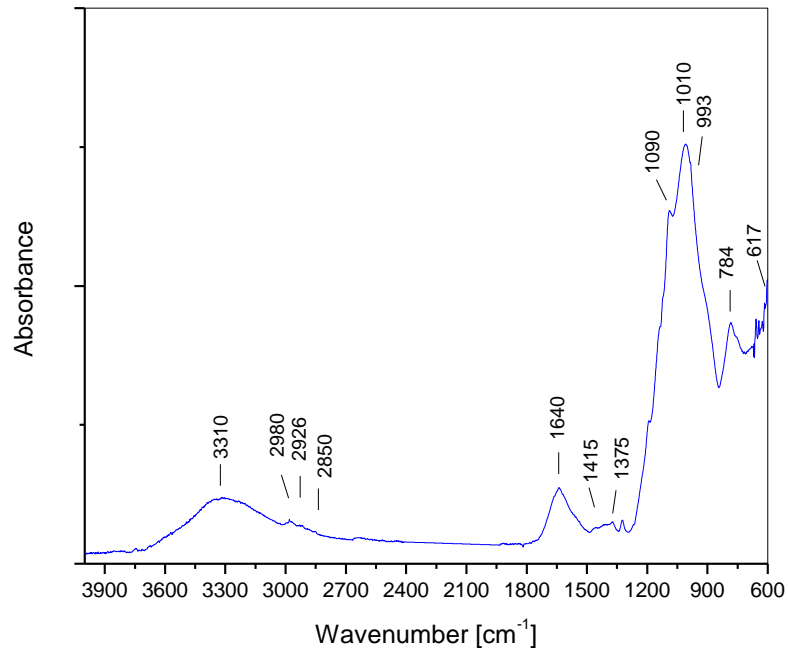
ELISA оптична плътност при 405 nm за пробите, третирани при оптимизирано разреждане на заешки анти-пилешки овалбумин (първично антитяло, 1:10 000) и кози анти-заешки IgG AP (вторично антитяло, 1:2000).

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ВЪГЛЕХИДРАТЕН СВЪРЗВАТЕЛ ПРИ СТЕНОПИСИТЕ НА ГЛАВНАТА ЦЪРКВА „РОЖДЕСТВО БОГОРОДИЧНО“ В РИЛСКИЯ МАНАСТИР

При изследване на стенописите на главната църква „Рождество Богородично“ на Рилския манастир, беше идентифициран успешно и свързателят на синя боя от фона на стенописите в олтара. Освен ивиците на пигмента смалт (кобалтово синьо стъкло) в АТР спектъра на синята микропроба бях установени ИЧ ивици, които са свързани с наличието на органичен материал, различен от яйце (виж фигурата по-долу).

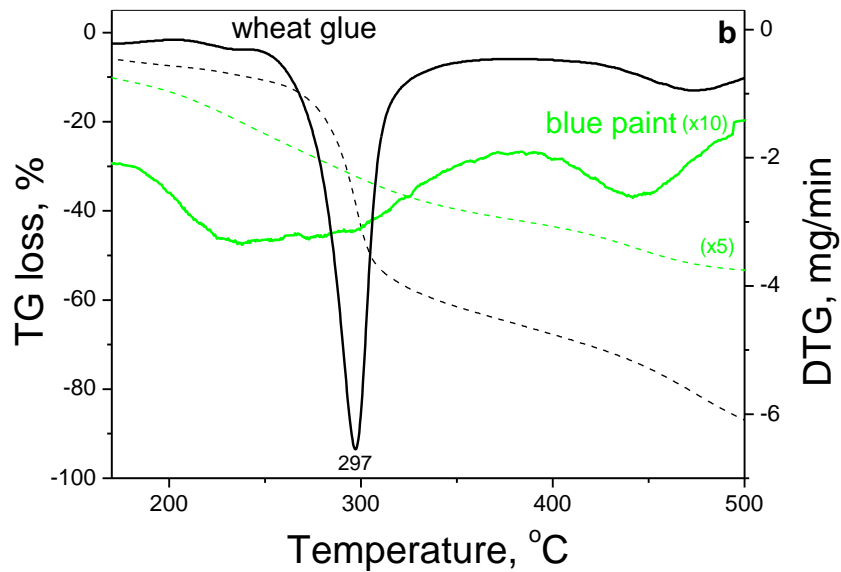
Наблюдаваните ИЧ ивици могат да бъдат отнесени към валентни O–H трептения (3310 cm^{-1}), валентни C–H трептения ($2961, 2878\text{ cm}^{-1}$), деформационни O–H трептения (1639 cm^{-1}), деформационни C–H трептения (мултиплет около 1360 cm^{-1}) и валентни C–O трептения ($1150, 1090, 1003\text{ cm}^{-1}$). На базата на този анализ може да се направи предположение, че най-вероятно синият пигмент е смесван с въглехидратно лепило на основата на нишесте (клайстер).

ATR спектър на синята микропроба от фона



В този случай използването на въглехидратния свързвател, освен с ИЧ спектроскопия, беше потвърдено и с термогравиметричен анализ:

TGA анализ на синята микропроба от фона в сравнение с пшенично нишесте:
TG загуба на тегло в % – пунктирна линия, DTG крива (загуба на тегло % в мин) – плътна линия



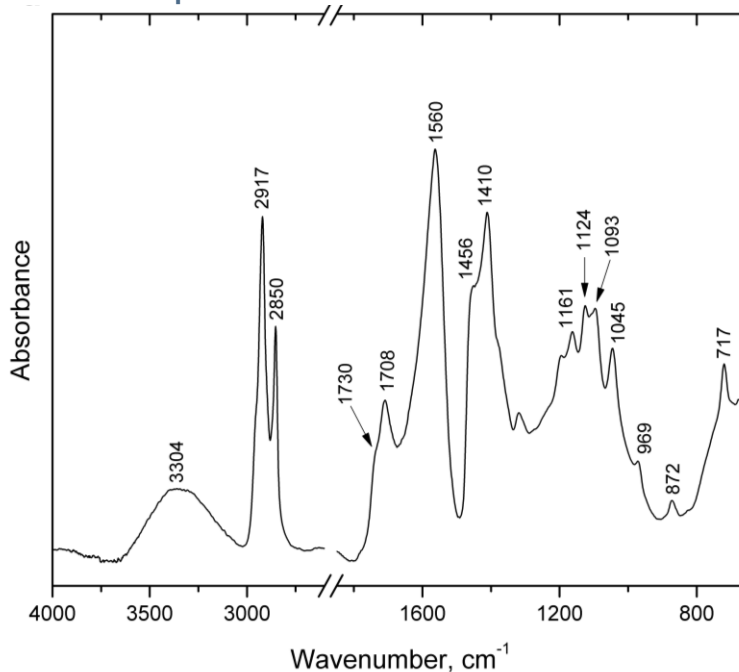
Както може да се види микропробата със синята боя губи тегло в рамките на широк температурен интервал (170-500 °C) и се характеризира с два широки TG/DTG

ефекта, които корелират добре с тези, наблюдавани при референтната проба от пшенично нишесте. При микропробата се регистрира и допълнителна загуба на тегло при ниски температури (170-260 °C). Тази загуба на тегло може да се дължи на наличието на гипс.

ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЪСТАВА НА МИКСИОН ЗА ЗАЛЕПВАНЕ НА ПОЗЛАТА ПРИ СТЕНОПИСИТЕ НА ГЛАВНАТА ЦЪРКВА В РИЛСКИЯ МАНАСТИР

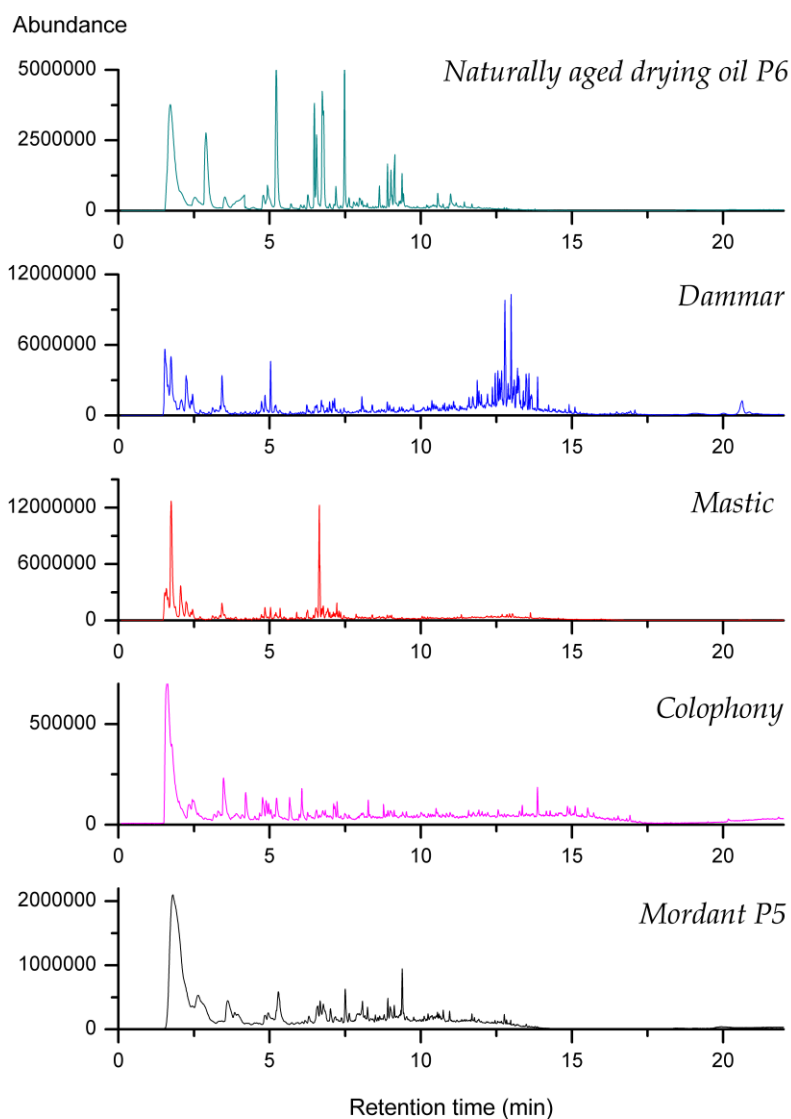
Като част от обширно технологично изследване на стенописите на главната църква „Рождество Богородично“ на Рилския манастир, беше проучен съставът на миксион, използван за залепване на златните листа “варак”. Съгласно СЕМ-ЕДС анализа лепилото се състои от C, O, S, Na, Ca, K, Mg, Zn и Pb. Картографирането по елементи показва, че C, O и Na (и Zn) са с много сходно разпределение. Има отделни участъци, съдържащи по-голямо количество Pb или S. В ATR спектъра на пробата от миксиона бяха установени силни ивици за C-H трептения в областта 2950-2830 cm^{-1} , което е указание на преобладаващо съдържание на органични вещества:

ATR спектър на миксиона за залепване на позлата



Наблюдават се също така други две много силни ивици при 1560 и 1410 cm^{-1} . Тази при 1410 cm^{-1} се дължи на присъствието на калциев карбонат, вероятно от мазилката отдолу. Ивицата при 1560 cm^{-1} , която е най-силната в целия спектър, предполага наличието на голямо количество карбоксилати – соли на мастни киселини (осапунени мастни киселини).

Чрез пиролиза и газхроматографски анализ, комбиниран с мас-спектрометрия, беше показано, че миксионът съдържа естествено остаряло (полимеризирало) растително масло и растителна смола дамара:



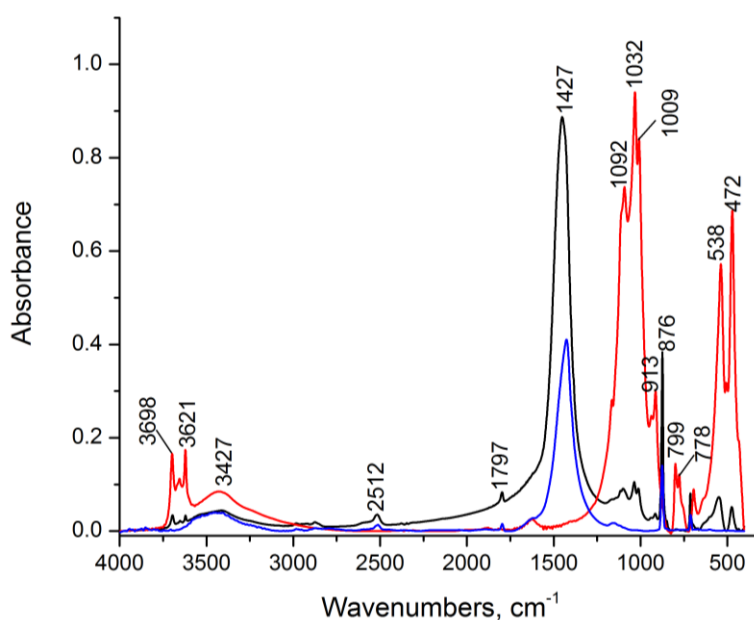
ГС хроматограми на колофон, мастикс, дамара, миксиона за позлатата (P5) и естествено остаряло съхнещо масло (P6)

При хроматографския анализ на лепилото за позлатата бяха отчетени някои фрагменти, отговарящи на адамантанова структура – при 12.7–13 мин. с M/z 206, които са специфични за референтната смола дамара и са били наблюдавани и в предходни изследвания на растителни смоли от други автори. Обобщавайки събраните аналитични данни, беше заключено, че миксионът е приготвен от безир, смола и оловен миниум.

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ПЧЕЛЕН ВОСЪК В СТЕНОПИСНАТА УКРАСА НА ТРАКИЙСКИ МОНУМЕНТИ

В хода на изследването на стенописната украса в гробницата в Александрово на базата на проведения ИЧ анализ на пигментите и детайлно сравняване с ИЧ спектри на вече изследвани в рамките на проекта референтни материали (виж фигурата по-долу) беше установено, че изследваната проба червената стенописна украса е смес от калцит (CaCO_3) и червена охра. Елементният състав на пробата, уточнен с помощта на сканираща електронна микроскопия, комбинирана с енергийно дисперсионната спектроскопия (SEM-EDX), също подкрепя тези заключения.

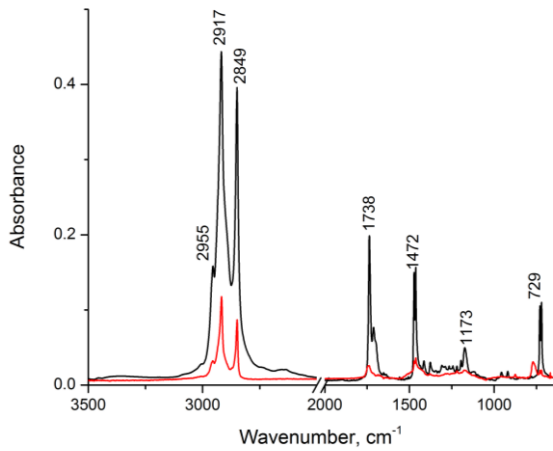
Абсорбционни ИЧ спектри (в таблетка KBr) на червената проба (в черно); референтен CaCO_3 (в синьо) и референтна червена охра (в червено)



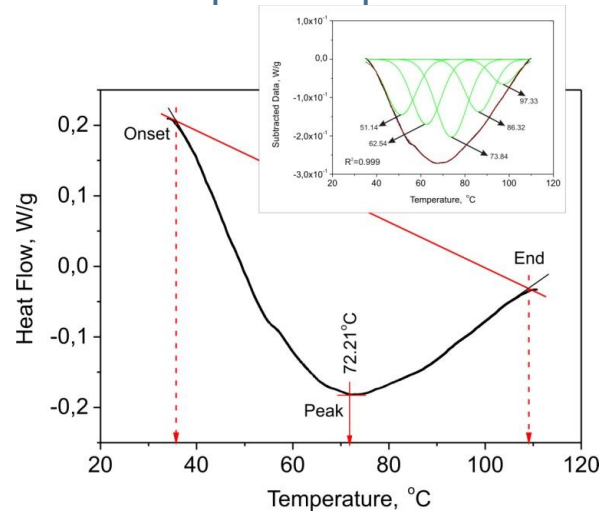
Обект на изследване беше и присъствието на допълнителни органични вещества (восъци/смоли) в състава на живописния слой. Поради много малкото им съдържание, изследването на органичния материал бе значително затруднено. За целта беше приложена процедура за извличане (екстракция) с хлороформ. След сравняване на спектъра на екстракта с различни референтни ИЧ спектри, беше установено добро сходство със спектъра на пчелен восък (силно интензивни ивици за валентни C-H трептения в областта $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, C=O ивица при $1738\text{--}1736\text{ cm}^{-1}$, ивици за деформационни C-H трептения при $1472\text{--}1463\text{ cm}^{-1}$, C-O ивица при $1219\text{--}1173\text{ cm}^{-1}$ и ивици за торзионни C-H трептения при $729\text{--}719\text{ cm}^{-1}$). По този начин беше установено наличието на пчелен восък като добавка в червения слой на стенописната украса.

Резултатът беше потвърден с диференциално-сканираща калориметрия (ДСК):

ATR спектър на екстракта от червената проба (в червено) и референтен пчелен восък (в черно)

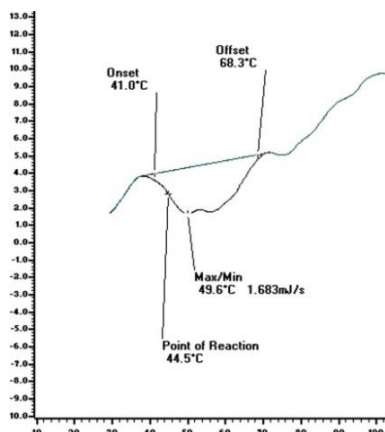


DSC анализ на пчелния восък в червената проба

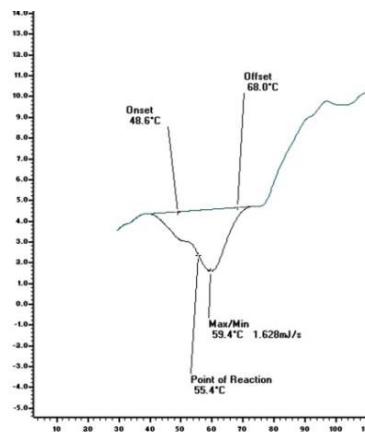


Известно е, че пчелният восък (подобно на другите восъци) е химически стабилен и се топи лесно (при приблизително 64°C), като тази точка на топене остава сравнително постоянна с остаряването. Неговите термични характеристики могат обективно да бъдат оценени с помощта на ДСК. Този надежден метод за идентификация на восък беше използван за изследване на проби и от други тракийски обекти:

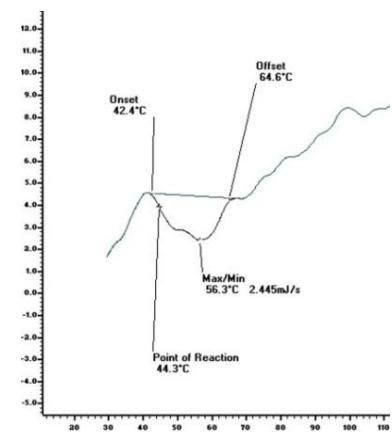
DSC анализ



Долно Луково



Казанлък



Севтополис

Както се вижда, преходи с много близка начална температура на топене се наблюдават за всички проби. Началото на топене се наблюдава при 31-48 °C. Разширени криви на различните гробници илюстрират сравнимо поведение при престой на топене с преобладаващи пикове на топене в интервала 49-59 °C.