

16-04-2009

Čís. 2762

přil. CD

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA CHEMIE A DIDAKTIKY

CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv anorganických pigmentů na identifikaci
vaječných temper pomocí hmotnostní
spektrometrie

Vypracovala:

Lucie Čámská

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Mgr. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní obor:


Biologie-chemie

V Praze dne 11. dubna 2009

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře chemie a didaktiky chemie
Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze v období (květen 2007 – duben 2009).

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech
použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle
zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem
seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona
č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 12. dubna 2009



SOUHRN

Úkolem této diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňují anorganické pigmenty identifikaci vaječné a žloutkové tempery pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Dalším úkolem bylo připravit sadu modelových barevných vrstev obsahujících deset vybraných anorganických pigmentů v kombinaci s vaječnou a žloutkovou temperou. Metodou peptidového mapování získat hmotnostní spektra připravených vzorků a porovnat vzniklé peptidové štěpy. Nakonec bylo možné od sebe odlišit vaječnou a žloutkovou temperu a zjistit, které z pigmentů nejvíce negativně ovlivnily identifikaci obou temper.

V neposlední řadě byly získané hodnoty m/z z vaječné a žloutkové tempery použity ke zkvalitnění již existující databáze referenčních proteinových pojiv používané k identifikaci proteinových pojiv obsažených v uměleckých dílech.

SUMMARY

The aim of this diploma thesis is to find out in what way inorganic pigments influence the identification of egg and yolk tempera using mass spectrometry MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight). The other aim was to prepare a set of model color layers including ten inorganic pigments combined with the egg and yolk tempera. Using the method of peptide mass fingerprinting mass spectra of the samples were found out and the obtained peptides were compared. Finally the egg tempera was distinguished from the yolk tempera and it was found which pigments negatively influenced the identification of the temperas.

The m/z values were found out for both temperas and they were used to upgrade database of the reference proteinaceous binders that have been used in art works.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Štěpánce Kučkové, Ph.D. za její podporu a mnoho cenných rad při vedení mé diplomové práce.

1. ÚVOD	1
2. KONČANTY SLAVIČINÉ PROBLEMATIKY	2
2.1. Biologické úlohy slavičiny	2
2.2. Typy molekulových pólů	3
2.2.1. Polární	3
2.2.2. Nepolární	4
2.3. Analýza slavičiny	4
2.3.1. Chromatografie	4
2.3.2. Třídění	5
2.3.3. Purifikace	6
2.3.4. Kvalitativní analýza	6
2.3.5. Kvantitativní analýza	7
2.3.6. Identifikace	7
2.3.7. Účinnost	7
2.3.8. Účinnost	8
2.3.9. Vlastnosti slavičiny	8
2.3.10. Účinnost	9
2.4. Metody analýzy proteomických pólů	18
2.4.1. Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF	18
2.4.2. Principy hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	18
2.4.3. Principy hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	18
2.4.4. Účinnost hmotnostní spektrometrie	18
2.5. Účinnost hmotnostní spektrometrie	20

Poděkování patří i Ústavu biochemie a mikrobiologie Fakulty potravinářské a biochemické technologie na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze-6 Dejvicích, zejména Prof. RNDr. Milanu Kodíčkovi, CSc., Doc. Dr. Ing. Radovanu Hynkovi, Ing. Jiřímu Šantrůčkovi a ostatním pracovníkům laboratoře hmotnostní spektrometrie za příjemnou a cennou spolupráci.

2.6. Účinnost hmotnostní spektrometrie	23
2.7. Účinnost hmotnostní spektrometrie	23

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	2
2.1 Složení barevné vrstvy uměleckých děl.....	2
2.2 Typy proteinových pojiv.....	3
2.2.1 Bílek.....	3
2.2.2 Žloutek.....	4
2.3 Anorganické pigmenty.....	4
2.3.1 Olovnatá běloba.....	4
2.3.2 Titanová běloba.....	5
2.3.3 Plavená křída.....	6
2.3.4 Kadmiová žluť.....	6
2.3.5 Chromová žluť.....	7
2.3.6 Rumělka.....	7
2.3.7 Auripigment.....	7
2.3.8 Okr.....	8
2.3.9 Svinibrodská zeleň.....	8
2.3.10 Octan měďnatý.....	9
2.4 Metody analýzy proteinových pojiv.....	10
2.4.1 Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF.....	13
2.4.2 Princip hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	14
2.4.3 Základní principy měření molekulových hmotností.....	18
2.4.4 Identifikace bílkovin a peptidů.....	18
2.5 Vlastnosti proteas.....	20
2.5.1 Proteasy používané při peptidovém mapování.....	20
2.5.2 Vlastnosti trypsinu.....	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1 Materiál.....	22
3.2 Chemikálie a pomůcky.....	22
3.3 Promývací roztoky pro reverzní fázi ZIP TIP.....	23
3.4 Trypsinové štěpení proteinů.....	23

3.5	Zahušťování a přečišťování peptidových štěpů na reverzní fázi	23
3.6	Příprava modelových vzorků	24
3.6.1	Podklad	24
3.6.2	Příprava proteinových poživ	26
3.6.2.1	Vaječná tempera	26
3.6.2.2	Žloutková tempera	27
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	29
4.1	Popis peptidových pík modelových vzorků	29
5.	ZÁVĚR	36
6.	LITERATURA	37
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	40

1. ÚVOD

Člověk používal barviva už v pravěku. Jedním z podnětů, které vedly k objevu a používání barevných hlinek či rostlinných barviv byla lidská potřeba pomalovávat si tělo symbolickými, válečnými či rozpoznávacími barvami a tvorba rituálních kreseb zvířat, která si lovci přáli ulovit nebo je již ulovili. Kresby v jeskyni Lascaux ve Francii, datované do doby asi 15 000 před n.l., jsou dokladem nejstaršího známého užití pigmentů, které bylo možné snadno nalézt v přírodě – minerální barviva, hlínky či grafit. Technologie výroby uměle připravovaných barviv byla tajena a předávala se ústně z generace na generaci, z mistra na žáka. A vyzrazení výrobního, malířského a barvířského postupu bylo přísně trestáno. Přesto byly receptury zaznamenány písemně a písemný záznam zase umožnil jejich rozšíření a uchování opisem a překladem do jiných jazyků.

Přímým pramenem poznání barvicích látek a způsobu jejich přípravy jsou receptury zaznamenané příležitostně encyklopedickou, traktátovou, lékařskou, stavební, obchodní a cestopisnou literaturou. Receptury pro přípravu barviv se objevují již ve spisech Theofrasta, Vitruvia (Deset knih o architektuře¹), Plinia Staršího (Kapitoly o přírodě²) či Dioscurida. Byly prepisovány do latiny a od 14. století překládány i do národních jazyků. Malířské receptury jsou zaznamenány například v rukopise z Luccy z 8. století. Cennino Cennini, malíř a historik žijící na přelomu 14. a 15. století, je autorem knihy o umění *Il Libro Dell'Arte*³, kde kromě barviv pojednává také o způsobu jejich pojení různými druhy temper. Pojiva, přestože jsou v barevných vrstvách zastoupena pouze minoritně, zodpovídají právě za kvalitu barevných vrstev. Jejich identifikace je proto velmi důležitá pro restaurátorské účely i pro posouzení techniky malby, a tím i třeba pro ověření pravosti uměleckého díla.

Úkolem této diplomové práce bylo připravit modelové barevné vrstvy uměleckých děl a identifikovat použítá proteinová pojiva pomocí hmotnostní spektrometrie. Modelové barevné vrstvy byly připraveny kombinací deseti pigmentů s dvěma druhy temper, vaječnou a žloutkovou. Dalším úkolem bylo zjistit, jak použité anorganické pigmenty ovlivňují identifikaci zmíněných proteinových pojiv.

Získaná data byla použita pro zkvalitnění a rozšíření databáze referenčních proteinových materiálů, která slouží pro identifikaci proteinových pojiv obsažených v uměleckých dílech.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Složení barevné vrstvy uměleckých děl

Barevné vrstvy obsahují hlavně pigmenty či barviva. Obecně lze říci, že pigmenty jsou barevné sloučeniny nerozpustné ve vodě a pojivech, které mohou být anorganické i organické, přírodní a umělé. Přírodní organické pigmenty jsou barviva vysrážená na vhodný anorganický substrát, např. na kamenec ($\text{KAlSO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) či plavenou křídou (CaCO_3). Množství barvicí látky je v těchto případech minoritní v porovnání s anorganickou složkou. Zatímco barviva jsou látky organického původu, mohou být sice také jak přírodní, tak i syntetická, ale neobsahují v sobě téměř žádnou anorganickou látku.

Barevná vrstva je tedy kombinací pigmentu či barviva a dále organického pojiva. V současné terminologii se ale také termín barevná vrstva používá i pro více jednotlivých barevných vrstev nad sebou, viz obrázek č. 1. Na podložku, která může být dřevěná či plátěná, je nanesen podklad, který je tvořen anorganickým materiálem a pojivem organického původu. Anorganickou složkou může být například přírodní uhlíčitán vápenatý (plavená křída), síran vápenatý (sádra, boloňská křída) nebo méně často bolusové materiály.

Podklad je zakončen izolací proteinového původu (většinou klihem), která má zamezit vpíjení barev do podkladu⁴. Teprve na izolační vrstvu je nanášena jedna či více barevných vrstev a celé dílo je na závěr zakončeno lakem, který je chrání před nepříznivými vlivy okolního prostředí (obrázek č. 1).



Obrázek č. 1. Schématický nákres barevné vrstvy. 1 – podložka, 2 – podkladová vrstva, 3 – izolace, 4 – barevná vrstva (směs pigmentu nebo barviva s pojivem), 5 – závěrečná ochranná vrstva (lak).

2.2 Typy proteinových pojiv

Pojiva jsou lepidlové látky různého chemického složení a různých fyzikálních vlastností, které jsou často rozdílného původu. Pojí se s pigmentem či barvivem a zajišťují přilnavost barevné vrstvy k podkladu. Pojiva rozlišujeme podle jejich hlavní složky na proteinová, olejová, polysacharidová a pryskyřičná. Tato diplomová práce se zaměřuje konkrétně na vaječnou a žloutkovou temperu, které se řadí mezi proteinová pojiva. Proteinové složení bílku a žloutku je popsáno v kapitole 2.2.1 a 2.2.2.

2.2.1 Bílek

V technice malby se bílek přidává do temper, nebo se používá jako pojídlo barev, které jsou určeny pro miniatury. Někdy byl používán ve směsi s cukrem jako provizorní lak u neproschlých olejomalb. Avšak samotný bílek se jako pojivo příliš často nepoužíval, pouze jako technika iluminace ve výzdobě středověkých knih⁴, nebo také v technice polimentového zlacení⁵.

Bílek obsahuje zejména proteiny, dále pak sacharidy, minerální látky a stopy tuků. Proteiny jsou tvořeny ovoalbuminem (54 %), ovotransferinem (13 %), ovomukoidem (11 %), lysozymem (3,5 %), globuliny (4 %) a ovomucinem (1,5–2 %). Významná je funkce lysozymu, který má schopnost lyzovat buněčné stěny gramnegativních bakterií, čímž působí jako ochranný faktor bránící průniku mikroorganismů od skořápky ke žloutku, respektive zárodku, který chrání v době, kdy ještě nemá vytvořeny vlastní imunoglobuliny⁶.

Místo samotného bílku se spíše používalo celé vejce. Tzv. vaječná tempera byla standardním prostředkem evropského deskového malířství až do 15. století⁷. V 15. století byla postupně vytlačena oleji, kombinací olejů a pryskyřic, které napřed pozměňovaly a posléze vytlačily tradiční vaječné pojivo⁴. Vaječná tempera vymizela z běžného užití v Evropě 16. století, ačkoli byla nadále zcela běžná v Rusku a kdekoli jinde v byzantské ortodoxní tradici. Dobře provedená vaječná tempera je jednou z nejtrvanlivějších malířských technik, které lidstvo objevilo⁸.

2.2.2 Žloutek

Vaječný žloutek ředěný vodou tvoří výtečné malířské médium. Často zaznívá obava, že žlutý odstín žloutku bude mít vliv na samotnou barvu, ale v praxi je tento vliv tak nepatrný, že ho lze zanedbat. Při přípravě emulze byl vaječný žloutek smíchán s vodou a pak přidáván přímo k barvám. Takto pojené barvy rychle schnou a mohou být vrstveny vzápětí po nanesení. Výhodou žloutkové tempery jsou také jen nepatrné objemové změny, ke kterým dochází během jejího schnutí⁴.

Vaječný žloutek obsahuje 20-25 % vaječného oleje, 50-52 % vody, ve které je rozpuštěno 15-16 % bílkoviny vitelinu, 7-9 % lecitinu a malé množství minerálních solí a jiných látek. Lecitin je hustá, mastná hygroskopická látka voskového vzhledu a světle žluté barvy. Na vzduchu hnědne a je rozpustná v olejích a organických rozpouštědlech. Ve směsi s tuhneucími oleji zpomaluje jejich schnutí. Vaječný olej patří k olejům polotuhneucím. Skládá se převážně z kyseliny olejové a z menšího dílu kyselin palmitové a stearové. Je žlutý až načervenalý, hustý a snadno žlukne. Barvy pojené vaječným žloutkem se po několika měsících stávají nerozpustnými i v horké vodě⁴.

2.3. Anorganické pigmenty

2.3.1 Olovnatá běloba

Olovnatá běloba odpovídá svým chemickým složením vzorci $2 \text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb(OH)}_2$, jedná se tedy o zásaditý uhličitán olovnatý⁴. Neutrální uhličitán vápenatý se v přírodě vyskytuje ve formě minerálu cerussitu, který provází oxidační zónu olověných ložisek⁹.

Olovnatá běloba patří mezi první uměle připravované pigmenty. Výroba z kovového olova a vinného octa sahá až do 4. století před naším letopočtem. Výrobu olovnaté běloby působením octových par na olovené destičky popsal již ve 4. století před n. l. Theophrastos a v 1. století n. l. Plinius a Vitruvius⁵.

Nejkvalitnější, tzv. lupénková nebo též holandská běloba, se vyráběla z plátků olova, které byly stočené do spirál a umístěny na dno hliněných nádob, ve kterých byla na dně kyselina octová. Tyto nádoby se stavěly do koňského hnoje. Vlivem tepla docházelo k postupnému odpařování kyseliny octové a tyto výpary společně s kyslíkem ze vzduchu

zapříčinily tvorbu zásaditého octanu olovnatého. Výrobní proces trval 6-12 týdnů. Výsledný produkt se ve formě vloček seškrabával z oloveného plechu, následně se plavil, sušil, proséval a poté mohl být použit na tvorbu barev¹⁰.

Mezi velké přednosti olovnaté běloby patří zejména její velká krycí mohutnost a stálost barvy. Zároveň urychluje proces vysychání olejů⁴. Má však i své záporné vlastnosti mezi které patří její jedovatost, dále pak při kontaktu se sulfanem dochází k jejímu hnědnutí až zčernání. Její další nevýhodou je nestálost v alkalickém prostředí, proto její použití není vhodné pro fresku a alkalickou temperu⁴.

Olovnatá běloba má silný antikorozi účinek proti mořské vodě, používá se proto i na nátěry lodí¹⁰. Již od starověku byla olovnatá běloba velmi významným pigmentem, používaným v evropském malířství až 19. století, kde se jako její hlavní konkurent objevuje zinková běloba ZnO (cit. 10).

2.3.2 Titanová běloba

Titanová běloba, neboli oxid titaničitý, TiO_2 , se vyrábí z minerálu illmenitu $FeTiO_3$, který byl popsán v roce 1791 (cit. 4). Existuje několik přírodních polymorfních modifikací oxidu titaničitého se stejným krystalochemickým vzorcem – jako pigment se uplatňuje TiO_2 se strukturou anatasu a rutilu. Oxid titaničitý s anatasovou strukturou se používá pro malířské účely od roku 1920 a s rutilovou strukturou od roku 1941 (cit. 4). Rozlišení obou modifikací přispívá v mnoha případech k autentifikaci uměleckého díla.

Titanová běloba je nejbělejší pigment a má nejlepší krycí mohutnost ze všech bílých pigmentů. Na světle je stálá, odolává zředěným kyselinám i zásadám a není toxická. Kromě toho se oxid titaničitý často využívá i ve směsných bělobách spolu se síranem barnatým, síranem uhličitým, mastkem a oxidem nebo sulfidem zinečnatým¹¹.

Uplatňuje se při výrobě barev, ve sklářském a keramickém průmyslu, přidává se do plastových a nátěrových hmot, do kvalitního papíru, smaltů, používá se v kosmetice, farmacii a v mnoha dalších průmyslových odvětvích. Titanová běloba je nenahraditelná v chemicky odolných nátěrech.

Vzhledem k tomu, že je titanová běloba chemicky stabilní a zdravotně nezávadná, používá se i v potravinářském průmyslu k bělení mléka, přidává se do žvýkaček, omáček, sýrů (potravinářské barvivo E171) a zubních past¹².

2.3.3 Plavená křída

Plavená křída neboli uhličitan vápenatý, CaCO_3 , vznikl sedimentací schránek jednobuněčných živočichů. Ložiska křídly lze nalézt po celé Evropě. Mezi nejznámější patří ložiska ve Francii, Anglii a Maďarsku⁹. Plavená křída se získává mletím a plavením přírodní křídly, která se předtím ponechá rok zvětrat¹⁰.

Mezi její kladné vlastnosti patří její stálost na světle, mísitelnost téměř se všemi pigmenty a snášenlivost alkalického prostředí. V kyselinách se však rozkládá a její nevýhodou je velmi nízká krycí schopnost⁴.

Plavená křída patří mezi velmi staré materiály, které se velmi často používaly pro přípravu podkladů malby. Byla detekována v malbách holandských a vlámských mistrů z let 1430-1816 (cit. 10).

2.3.4 Kadmiová žluť

Kadmiová žluť, CdS , odpovídá svým chemickým složením sulfidu kademnatému. Mezi přednosti této žlutě patří její velká krycí schopnost. Nelze ji však mísit s pigmenty, které obsahují měď a olovo, protože pak dochází k tmavnutí barevné vrstvy⁴. Kadmiová žluť byla objevena v roce 1817 a používána od roku 1829 (cit. 10). Postupně nahrazovala dosud používané žluté pigmenty⁵. Tento pigment lze připravit v mnoha barevných odstínech, barva odstínu závisí na velikosti a tvaru částic, na krystalické struktuře a také na přítomnosti jiných minerálů¹¹.

2.3.5 Chromová žlut'

Jako pigment se oxid chromitý, Cr_2O_3 , používá od počátku 19. století. Do umělecké malby byl zaveden až v roce 1862 (cit. 5). Dnes je tento pigment nahrazován kadmiovými žlutěmi⁴. Na světle velmi pomalu tmavne, reaguje s kyselinami i zásadami. Je využíván v plastech a v automobilovém průmyslu, i když ze zdravotních důvodů je jeho použití v mnoha státech omezováno. U všech sloučenin šestimocného chromu je totiž podezření na karcinogenní účinky¹¹.

2.3.6 Rumělka

Cinnabarit, cinobr, HgS , tedy sulfid rtuťnatý je znám pod jménem rumělka. Jedná se o nízkoteplotní červený minerál, který vzniká při teplotách okolo $100\text{ }^\circ\text{C}$ (cit. 9).

Rumělka se buď připravuje synteticky nebo mletím tohoto minerálu. Pigment má velmi vysokou krycí mohutnost a ze všech pigmentů největší specifickou váhu. Jeho použití sahá do Říma a staré Číny⁴. Rumělka vždy patřila k nejdražším barvám. V pozdním středověku byla proto uměle vyráběna sublimací rtuť a síry pod názvem vermillion¹³.

„Kupuj vždy cinobr kusový, ne tlučný ani mletý. Důvodem k tomu je, že často se podvodně napodobuje miniem nebo tlučenou cihlou, píše C. Cennini³“.

Rumělka byla v 19. století nahrazována jinými pigmenty, jednak šlo a jde o jeden z nejdražších pigmentů a druhým důvodem byla nedostatečná odolnost některých jejích druhů vůči světlu¹⁰, kdy docházelo k jejímu tmavnutí.

2.3.7 Auripigment

Auripigment je znám od antiky a byl používán do konce 19. století¹⁰. Auripigment, nebo-li sulfid arsenitý, As_2S_3 , je přírodní minerál citrónově žluté až zlatožluté barvy provázející ložiska realgaru. Realgar, AsS , minerál oranžovo-červené barvy se vyskytuje společně s auripigmentem a oba jsou hydrotermálního původu⁹.

Auripigment má velmi dobrou krycí mohutnost a je stálý na světle, nelze ho však mísit s olovnatými a měďnatými pigmenty, protože dochází k tvorbě černých sulfidů. Jeho další zápornou vlastností je značná jedovatost.

2.3.8 Okr

Červený okr, Fe_2O_3 , se připravuje mletím přírodní suroviny. Jeho první použití sahá až do pravěku. Přírodní hydratované a nehydratované oxidy trojmocného železa se používaly jako pigmenty už ve starší době kamenné. Jejich umělá výroba pak byla známa již dávno před začátkem našeho letopočtu. Odstín pigmentu závisí na hydratovanosti oxidu železitého⁴. Nehydratované oxidy jsou tmavě červené až kaštanově hnědé, hydratované pak červené či žluté.

Mezi přednosti červeného okru patří jeho stálost na světle, odolnost vůči alkáliím, stálost ve směsi s ostatními pigmenty a jeho vysoká kryvost. Rozpouští se pouze v horkých koncentrovaných kyselinách¹⁰.

2.3.9 Svinibrodská zeleň

Svinibrodská zeleň, $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3 \text{Cu}(\text{AsO}_2)_2]$, je směsí arsenitanu a octanu měďnatého. Má velmi vysokou schopnost krytí⁴, je stálá na světle a má nádhernou modrozelenou barvu. Rozkládá se jak kyselinami, tak i zásadami a stejně tak i teplem. Při styku se sulfanem dochází k jejímu černání. Podobně jako olovnatá běloba či auripigment je i svinibrodská zeleň prudce jedovatá⁴.

Objevena byla současně na dvou místech; v roce 1808 Sattlerem ve Schweinfurtu a v rozmezí let 1798-1812 ve Vídni Mitisem¹⁰. Od roku 1814 se průmyslově vyráběla ve Schweinfurtu - odtud název svinibrodská zeleň⁴.

2.3.10 Octan měďnatý

Octan měďnatý nebo-li měďěnka, $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{Cu}(\text{OH})_2]$, je zásadité povahy a vyrábí se působením octa na měď. Pigment je zrnitý, zelenomodré barvy s charakteristickou vůní kyseliny octové⁴. Měďěnka je nestálá s barvami obsahujícími olovo a síru, reakcí s alkáliemi a se sirnými plyny obsaženými ve vzduchu černá.

Od 19. století se v malířství měďěnka již nepoužívá⁴.

2.4. Metody analýzy proteinových poživ

Správná identifikace proteinových poživ obsažených v barevných vrstvách uměleckých děl je nezbytná pro výběr nejvhodnějšího restaurátorského postupu, určení malířské techniky a v některých případech také k ověření pravosti daného uměleckého díla¹⁴. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) či pyrolysní plynová chromatografie (Py-GC), jsou založeny na sledování poměrů jednotlivých aminokyselin, které jsou charakteristické pro základní druhy proteinových poživ (vejce, kasein, klihy). Kostní, králičí a kožní kliš stejně jako vyzina jsou pro tyto metody nerozlišitelné díky podobnému obsahu jednotlivých aminokyselin^{15,16,17}.

Hlavní nevýhodou výše uvedených metod je samotná příprava vzorku k analýze. Rozklad proteinových poživ obsažených v nerozpustné matici barevné vrstvy se provádí několikahodinovým vařením s vysoce koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou¹⁸. Během rozkladného procesu dochází ke ztrátám aminokyselin různými reakcemi s dalšími organickými látkami přítomnými ve vzorku (např. se sacharidy – Maillardovy reakce), a tím jsou ovlivněny výsledné poměry zastoupení jednotlivých aminokyselin, podle kterých je pojivo identifikováno. Kromě ztrát aminokyselin během přípravy vzorku, tak také při detekci aminokyselin vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s UV nebo fluorescenční detekcí, plynovou chromatografií s plamenovým detektorem (GC-FID) nebo hmotnostním detektorem (GC-MS), dochází k interferencím s ionty Ca^{2+} , Cu^{2+} a Fe^{3+} , které pocházejí z běžných anorganických složek barevné vrstvy. Vliv těchto iontů na analýzu je ale možné zmírnit přidávkem Na_2EDTA (cit. 19).

Skupina M. P. Colombini a I. Bonaduce použila například plynovou chromatografií ke studiu fresek pocházejících ze 14. století z Velkého hřbitova v Pise, kde se jim podařilo zjistit přítomnost kaseinu a kliš²⁰.

G. Chiavari se svými spolupracovníky použil metodu pyrolysní plynové chromatografie spojenou s hmotnostní spektrometrií, kterou aplikoval na třicet modelových vzorků barevných vrstev, ve kterých byla jako pojiva použita vejce, kasein a kliš²¹.

Další metody, které se používají k identifikaci, avšak pouze základních druhů organických poživ, jsou infračervená spektroskopie (FTIR) (cit. 22) a Ramanova spektroskopie^{23,24,25}. Jejich společným rysem je nedestruktivní způsob měření. Hlavním

přínosem je pak možnost získání strukturální informace, která je často jinými metodami velmi obtížně zjistitelná. Jejich použití k identifikaci proteinových poživ je ale limitováno nepříznivou mezí detekce a jejich relativně nízkou selektivitou. Pokud se organická pojiva vyskytují ve směsích s jinými organickými či anorganickými látkami, není jednoduché a ani bezpečné rozhodnout o přítomnosti proteinu a už v žádném případě nelze určit jeho druh²⁶.

Infračervená spektroskopie je metodou srovnávací. Důležitým faktorem pro úspěšnost analýzy je existence velkého souboru infračervených spekter standardů a reálných vzorků, tzv. knihovny spekter. Výsledek analýzy je potom získán pomocí korelace mezi spektrem analyzovaného vzorku a standardu z knihovny spekter.

Obdobně jsou i Ramanova spektra neznámých vzorků srovnávána s referenční knihovnou spekter, které jsou přístupné například na internetu²⁷, nebo je možné aby si je každý uživatel vytvořil sám. I zde, obdobně jako u FTIR, se neznámé molekuly identifikují tzv. metodou otisku prstu^{28,29}.

Z infračervených spekter lze získat informace nejen o chemickém složení vzorku, ale při použití reflektanční techniky měření i o procesech stárnutí materiálu, působení chemických látek použitých při konzervaci a restaurování, vlivu okolního prostředí a podmínek uložení na možné poškození uměleckého objektu³⁰. V tomto případě se využívá rozdílné odrazivosti infračerveného záření na látkách, které se ve viditelném světle jeví jako totožné. To umožňuje rozlišit v infračerveném světle některé pigmenty, lazury, přelakované nebo přemalované vrstvy na obrazech, zviditelnit vybledlé malby, ověřit pravost podpisů a signatur autorů uměleckých děl. Protože se řada barev chová odlišně v infračerveném záření než za běžného světla, je například možné identifikovat uhlíkaté pigmenty s amorfní strukturou i pod nánosem jiných barevných vrstev³¹.

Mobilní reflektanční infračervenou spektroskopii použil k identifikaci pigmentů i kolektiv Davida Hradila, Igora Fogaše a Constanzy Miliani (MOLAB) při průzkumu obrazů Vídeňské školy 18. a 19. století, kde se jim podařilo identifikovat například olovnatou bělobu, pruskou modř a kostní čern³².

Mezi poměrně nové metody identifikace proteinových poživ patří také heterogenní imunoanalýza ELISA a imunofluorescenční metody³³. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent) je

zvláštním typem EIA (Enzyme Immuno Assay; enzymová imunoanalýza) a patří k typu imunoanalýzy se značenými reaktanty, založené na fotometrických principech³⁴. Skupina vedená Arlen Heginbotham úspěšně vyzkoušela imunofluorescenční mikroskopii a metodu ELISA na reálném vzorku odebraném z Francouzského kabinetu od André-Charlese Bouleaa ze 17. století, kde zjistili přítomnost vaječných proteinů³⁵.

V posledních letech se s rozvojem proteomiky, vědy o proteinech, začala pro identifikaci proteinových poživ používat hmotnostní spektrometrie. Pomocí metody MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry) lze studovat nejen celé bílkoviny, ale i peptidové štěpy, získané enzymatickým štěpením³⁶. Peptidová směs vzniklá tímto specifickým štěpením je pro daný protein typičtější než poměr jednotlivých aminokyselin a jednoznačně ho charakterizuje³⁷. Další výhodou této metody je malá spotřeba vzorku barevné vrstvy, cca 5 µg (cit. 38), její vysoká citlivost a rozlišení.

2.4.1 Hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF

V roce 2002 byli Nobelovou cenou za chemii oceněni dva vědci, kteří velmi významně přispěli k vývoji metod zabývajících se analýzou biomolekul. Cenu získal John B. Fenn a Koichi Tanaka, a to za vývoj šetrných ionizačních metod pro hmotnostní spektrometrickou analýzu biologických makromolekul. Málokdy se stává, aby cenu sdíleli dva vědci, mezi kterými je tak velký věkový rozdíl – celých 42 let (cit. 39).

John B. Fenn se narodil v roce 1917 v USA. Dostal řadu vyznamenání v USA i v Evropě a mimo jiné je i čestným členem mnoha výborů mezinárodních konferencí.

Koichi Tanaka se narodil v roce 1959 v Japonsku. Je nejmladším laureátem Nobelovy ceny za chemii od roku 1967. Od ukončení studia elektrotechniky na Universitě v Tohoku pracuje jako vývojový pracovník ve firmě Shimadzu, která se zabývá výrobou laboratorních zařízení⁴⁰.

Tanaka zásadním způsobem přispěl k objevu metody Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI). Vývoj této analytické metody se týká především způsobů převedení biologické (makro)molekuly do plynné fáze v podobě iontů bez fragmentace, přičemž náboj molekuly bývá obvykle ± 1 . Vzniklé ionty se analyzují hmotnostním spektrometrem. Ze získaných spekter lze určit jejich molekulovou hmotnost, popřípadě z jejich rozpadu dospět k závěrům o jejich struktuře. Hmotnostní spektrometrie pracující na principu MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, avšak nyní se využívá také i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Její výhodou je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se makromolekuly nerozpadají, což umožňuje měření složitějších směsí.

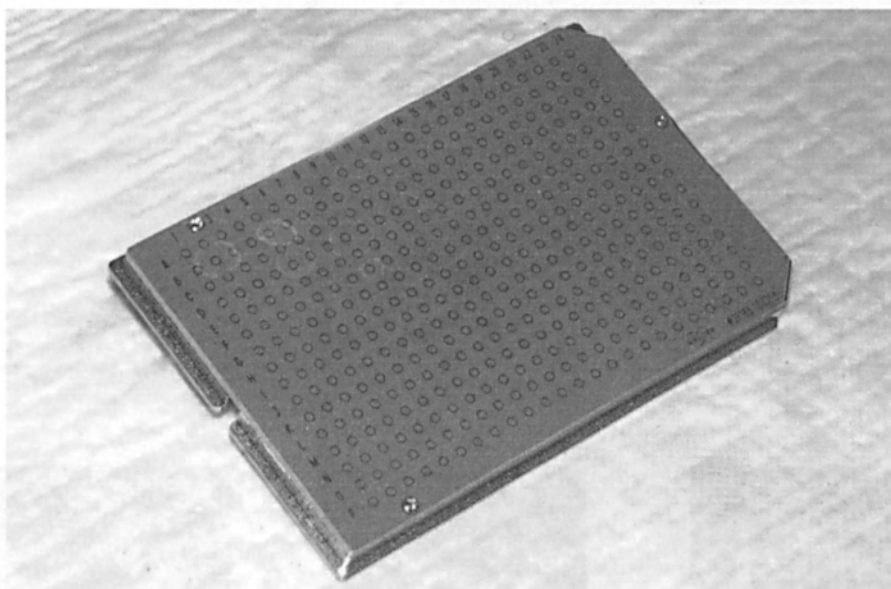
K hlavním cílům metody MALDI-TOF MS patří možnost využití při kvantitativním stanovení analytické látky či k nalezení univerzální matrice pro daný typ laseru⁴¹.

2.4.2 Princip hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

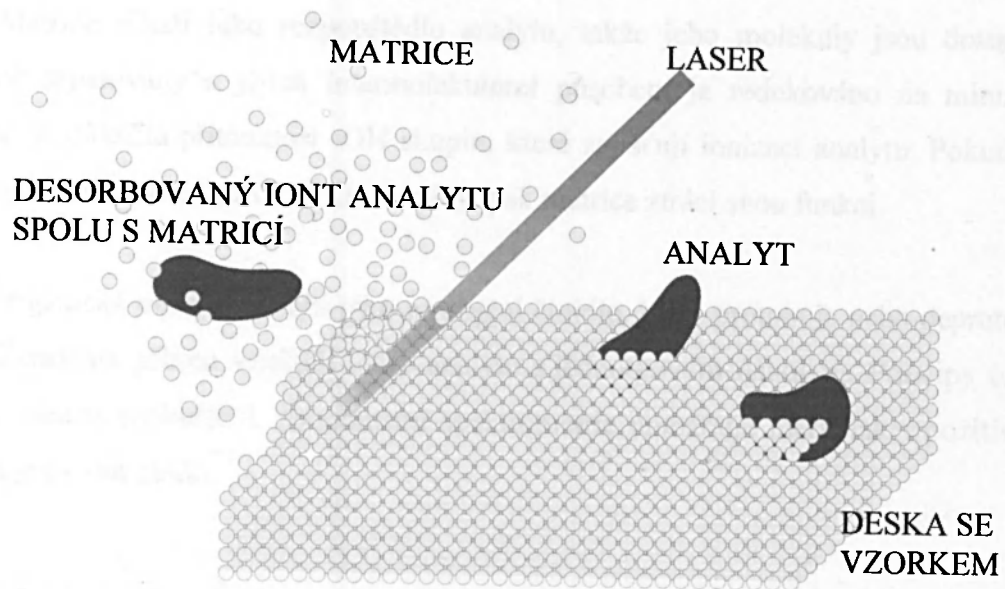
Směs organické matrice a studovaného vzorku v pevném stavu a na vhodném nosiči, obvykle na ocelové destičce (obr. č. 2), je zasažena nanosekundovým pulzem laseru. Matrice energii pulzu absorbuje a její rozklad ionizuje molekuly vzorku (obr. č. 3). Z mechanismu MALDI plynou i základní požadavky na vhodné matrice:

- a) absorpce při vlnové délce použitého laseru (obvykle 337 nm)
- b) tvorba žádoucích krystalů s analytem (nutno stanovit empiricky)
- c) matricí obvykle kyselého charakteru (účinná ionizace přenosem protonu na analyt).

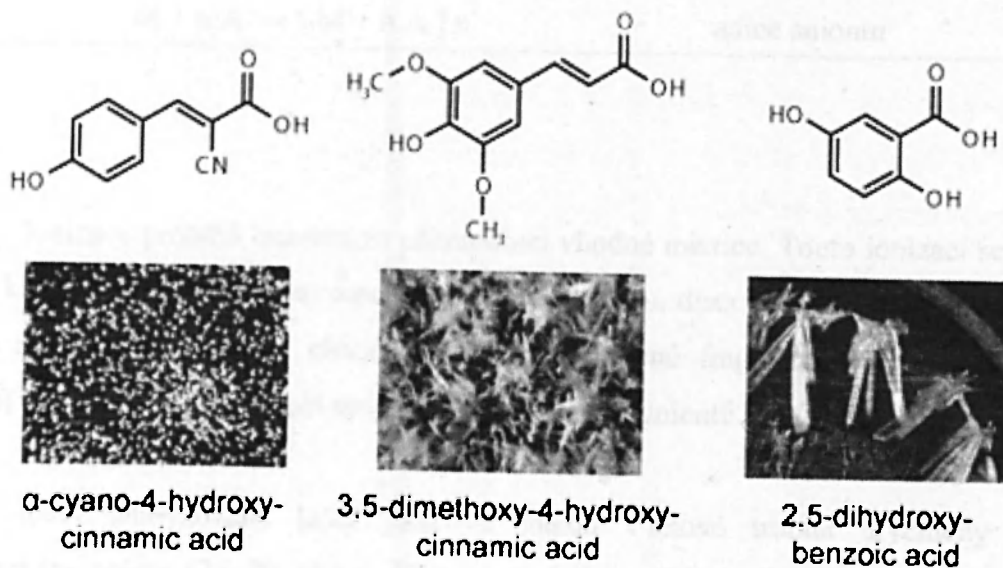
Obvykle se používají organické kyseliny (např. α -kyano-4-hydroxykyselinová kyselina (CHCA); 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) aj.). Na obrázku č. 4 jsou uvedeny ukázky nejčastěji používaných typů matric.



Obrázek č. 2. Ocelová destička používaná pro měření biomakromolekul technikou MALDI – TOF MS.



Obrázek č. 3. MALDI-TOF proces – desorbce iontů makromolekulárního analytu spolu s matricí⁴².



Obrázek č. 4. Ukázky nejčastěji používaných typů matric a jejich strukturních vzorců⁴³.

Matrice slouží jako rozpouštědlo analytu, takže jeho molekuly jsou dostatečně vzájemně separovány a jejich intermolekulární působení je redukováno na minimum. U matric je důležitá přítomnost -OH skupin, které zajišťují ionizaci analytu. Pokud jsou -OH skupiny nahrazeny za CH₃CO- skupiny, pak matrice ztrácí svou funkci.

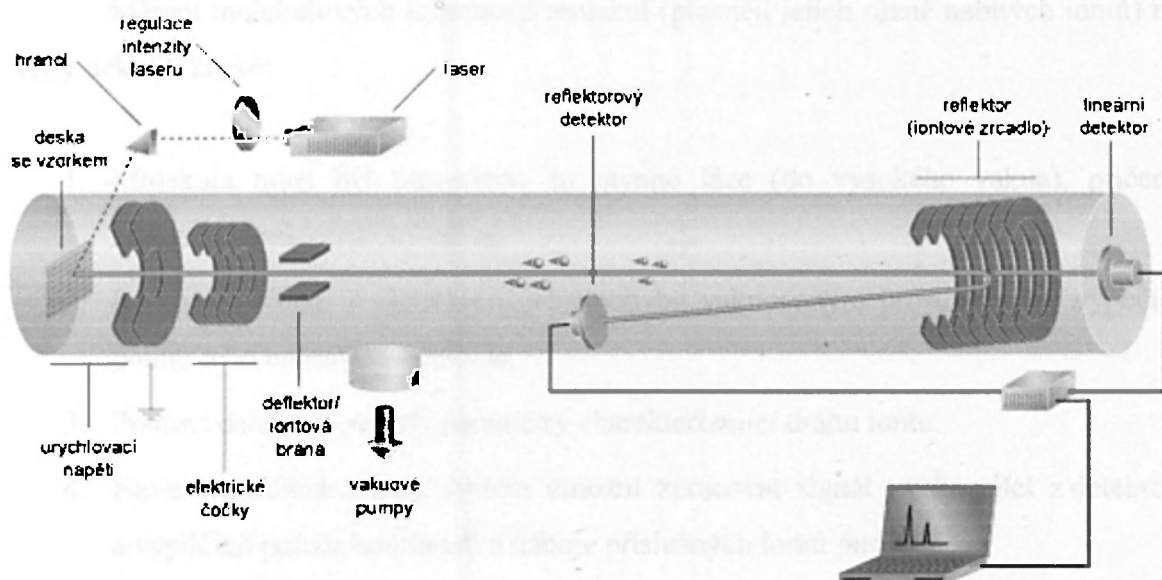
Organická matrice působí jako ionizační činidlo, které protonuje nebo deprotonuje analyt. Zpravidla přitom vznikají ionty analytu s jednotkovým nábojem. Principy tvorby iontů je uveden v tabulce I. Hmotnostní spektrometrie umožňuje měřit jak v pozitivním, tak i v negativním modu.

Tabulka I. Mechanismy tvorby iontů během ionizace.

	Mechanismus	Název
1.	$CA \rightarrow C^+ + A^-$	disociace
2.	$M \rightarrow M^+ + e^-$	tvorba radikálů
3.	$M + n H^+ \rightarrow [M + n H]^+ n^+$	adice protonu
	$M \rightarrow [M - n H]^+ n^+ + n H^+$	eliminace protonu
4.	$M + n C^+ \rightarrow [M + n C]^+ n^+$	adice kationtu
	$M + n A^- \rightarrow [M + n A]^- n^-$	adice aniontu

Ionizace probíhá laserem za přítomnosti vhodné matrice. Touto ionizací se rozumí adice kationtu (H⁺, Na⁺) či aniontu na molekulu vzorku, disociace H⁺ z molekuly vzorku, vznik radikálu odštěpením elektronu, popřípadě cílené fragmentace (vysokou energií laseru) molekuly vzorku a opět spojení jednotlivých fragmentů.

Ionty analyzované látky jsou ve vakuu v letové trubici urychleny silným elektrickým polem (25–30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem, viz obr. č. 5.



Obrázek č. 5. Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF (cit. 44).

Ionty se stejným nábojem získají při průchodu gradientem elektrického napětí stejnou hodnotu energie ($E_{pot} = zU$, kde z je náboj a U elektrický potenciál (V)), jejich rychlost (v) pak závisí na hmotnosti m podle rovnice $E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2$. V detektoru o konstantní délce se pak měří doba letu částice a z ní se vypočte poměr molekulové hmotnosti a také náboje částice⁴⁴. Tento způsob určování hmotnosti se nazývá TOF (time of flight).

2.4.3 Základní principy měření molekulových hmotností

Měření molekulových hmotností molekul (přesněji jejich různě nabitých iontů) má vždy několik kroků:

1. Molekula musí být převedena do plynné fáze (do vysokého vakua), přičemž získává charakteristický náboj.
2. Iont je urychlen. Z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje.
3. Pomocí detektoru se určí parametry charakterizující dráhu iontu.
4. Navazující elektronický systém umožní zpracovat signál vycházející z detektoru a vypočítat poměr hmotnosti a náboje příslušných iontů (m/z).

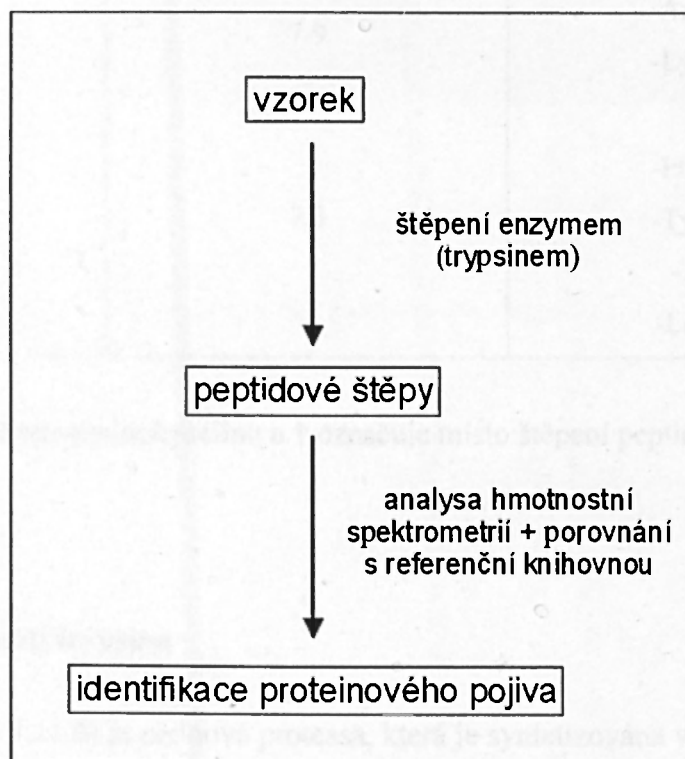
2.4.4 Identifikace bílkovin a peptidů

Pomocí současných hmotnostních spektrometrů je možné stanovit hmotnost peptidu či bílkoviny s velkou přesností⁴⁴. Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3, nachází nejvýznamnější uplatnění v proteomice při identifikaci proteinů. Sekvence celé řady proteinů jsou již známy a uloženy v proteinových databázích dostupných na internetu. Například na webových stránkách www.expasy.ch (cit. 45).

Při metodě nazvané peptidové mapování (PMF - peptide mass fingerprinting) je vzorek proteinu nejprve selektivně štěpen enzymem (v biochemii je nejpoužívanějším enzymem trypsin), viz obrázek č. 6. Výsledná směs peptidových štěpů, která je charakteristická pro každý protein, je následně analyzována hmotnostní spektrometrií. Je získáno hmotnostní spektrum peptidových fragmentů a zjištěné hodnoty m/z jsou porovnány s teoreticky vypočtenými hmotnostmi peptidů získaných stejným způsobem z bílkovin, jejichž sekvence jsou uloženy v proteinové databázi. Výsledkem tohoto porovnání je seznam proteinů, přičemž každému proteinu je přiřazeno skóre vyjadřující spolehlivost identifikace. Pro spolehlivou identifikaci proteinu je nutné, aby hodnota skóre převyšovala určitou hodnotu, která závisí na použitém algoritmu a databázi sekvencí.

Při použití spektrometru na principu MALDI-TOF se pro získání sekvence peptidu využívá rozpadu ionizovaných molekul prekurzoru v letové trubici již bez přítomnosti elektrického pole; k rozpadu iontů tedy dochází až za zdrojem (post-source decay, PSD). Nutná je však přítomnost iontového selektoru, který ze směsi peptidů (prekurzorů) vybere ten, jehož sekvenci chceme určit⁴³. K přesnější hmotnostní analýze fragmentů je dále třeba, aby MALDI-TOF spektrometr byl vybaven reflektorem, neboť fragmentové ionty mají stejnou rychlost, ale rozdílnou hmotnost. Čím těžší je fragmentový iont, tím má vyšší kinetickou energii, tím hlouběji pronikne do reflektoru a tím delší bude jeho doba letu k reflektorovému detektoru⁴³.

U některých proteinů se však identifikace pomocí PMF nezdaří protože, například dávají málo peptidových štěpů, mají nepopsané posttranslační modifikace nebo jejich sekvence pro daný biologický druh není uložena v databázi⁴⁶.



Obrázek č. 6. Schéma metody peptidového mapování.

2.5. Vlastnosti proteas

2.5.1 Proteasy používané při peptidovém mapování

V tabulce II. jsou uvedeny příklady proteas nejčastěji používaných při enzymovém štěpení proteinů při přípravě vzorků na měření hmotnostní spektrometrií pracující na principu MALDI-TOF.

Tabulka II. Charakteristika vybraných endopeptidas používaných při peptidovém mapování⁴⁷.

Název enzymu	pH optimum	Specifita
pepsin	1,5-2,5	-X † Phe † X- -X † Tyr † X -Leu † Glu
trypsin	7-9	-Arg † X- -Lys † X-
chymotrypsin	7,8	-Phe † X- -Tyr † X- -Trp † -Leu † X

Pozn. X označuje jakoukoliv aminokyselinu a † označuje místo štěpení peptidového řetězce.

2.5.2 Vlastnosti trypsinu

Trypsin (EC 3.4.21.4) je serinová proteasa, která je syntetizována ve slinivce břišní u všech obratlovců a to ve formě proenzymu trypsinogenu. Trypsinogen je vylučován do dvanáctníku, kde je aktivován odštěpením N-koncového hexapeptidu⁴⁸. Má nejvyšší aktivitu v mírně alkalické oblasti odpovídající hodnotě pH dvanáctníku.

Trypsin (obr. č. 7) se vyznačuje vysokou specifitou štěpení za aminokyselinovými zbytky lysinu a argininu. Za těmito bazickými aminokyselinami neštěpí pouze v případě, když po nich následuje prolin.



Obrázek č. 7. Schematické zobrazení prostorového uspořádání trypsinu⁴⁹.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.2 Chemikálie a pomůcky

trypsin TPCK	Promega Corporation
trifluoroctová kyselina	Sigma
2,5-dihydroxybenzoová kyselina	Sigma
ZipTip C18	Millipore Corporation

Všechny ostatní použité chemikálie čistoty p.a. byly dodány společností Lachema Brno.

Seznam původu pigmentů a olejů použitých při přípravě modelových barevných vrstev.

Lněný olej	Barvy UMTON
Ořechový olej	Ferrari Color, Italy
Želatina	PedF UK (původ neznámý)
Titanová běloba	PedF UK (původ neznámý)
Auripigment	PedF UK (původ neznámý)
Kadmiová žlut'	PedF UK (původ neznámý)
Oxid železitý	Lachema Brno
Uhličitan vápenatý	Reachim, SSSR, pa.
Oxid chromitý	Polskie Odczyniki, Ch. Gliwice
Octan mědnatý	Lachema Brno
Olověná běloba	PedF UK (původ neznámý)
Svinibrodská zeleň	Deffner + Johann, Spol. s r.o.
Rumělka	PedF UK (původ neznámý)

Vejce použitá na výrobu temper byla zakoupena v obchodním řetězci Tesco.

3.3 Promývací roztoky pro reverzní fázi ZIP TIP

aktivační roztok – 50% acetonitril v H₂O;

ekvilibrační roztok – 0,2% trifluoroctová kyselina v H₂O;

eluční roztok – 50% acetonitril s 0,1 % kyseliny trifluoroctové v H₂O

3.4 Trypsinové štěpení proteinů

Štěpení proteinů trypsinem bylo provedeno za použití štěpícího roztoku (2,0 μl trypsinu o koncentraci 1,0 μg/μl ve 100 μl 50 mmol/l NH₄HCO₃/(NH₄)₂CO₃ pufru o pH 7,5). Ke vzorkům bylo přidáno 10,0 μl štěpícího roztoku tak, aby v něm byly ponořeny. Štěpení probíhalo v uzavřených mikrozkušavkách po dobu dvou hodin.

Hmotnostní spektra byla získána na hmotnostním spektrometru Bruker-Daltonics Biflex IV MALDI-TOF, který je vybaven dusíkovým laserem (337 nm) v reflektorovém modu. Než byly vzorky nanесeny na ocelovou vzorkovací destičku byly 2,4 μl naštěpeného vzorku byly smíchány s 5,0 μl kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (DHB) (8,0 mg DHB v 0,5 ml roztoku 30% acetonitrilu s 0,1% kyselinou trifluoroctovou). Následně byly vzorky na destičku nanесeny v objemu 1,2 μl a to vždy na dva spoty a ponechány uschnout.

Každé spektrum vzniklo nasbíráním alespoň 270 laserových pulsů a pak bylo vyhodnoceno softwarem Bruker Flex III a Bruker XToF. Přístroj byl pro každé měření externě kalibrován peptidovou směsí MhPepmix (2,0 μl Mh Pepmix/4,0 μlDHB).

3.5 Zahušťování a přečišťování peptidových štěpů na reverzní fázi

ZipTip™ (Millipore Corporation, USA) jsou polypropylenové špičky částečně naplněné chromatografickým médiem, např. reverzní fázi C 18, sloužící k purifikaci a zakoncentrování peptidů pro hmotnostní spektrometrii. Níže je uveden postup pro zahušťování a přečišťování peptidových štěpů na reversní fázi:

1. Reverzní fáze je nejprve aktivována desetinasobným promytím po 10,0 μl aktivačního roztoku.
2. Reverzní fáze je ekvilibrována desetinasobným promytím 10,0 μl ekvilibračního roztoku.
3. Navázání peptidů: 10 \times promýt 10,0 μl analyzovaného roztoku.
4. Ekvilibrace: 10 \times promýt 10,0 μl ekvilibračního roztoku.
5. Eluce: 10 \times promýt jednorázově odebranými 5,0 μl elučního roztoku. (Celkový objem analyzovaného vzorku po eluci je 5,0 μl).
6. Eluce: zbývající navázané peptidy jsou odstraněny desetinasobným promytím 10,0 μl elučního roztoku.
7. Celý postup je možné zopakovat od bodu 2.

3.6 Příprava modelových vzorků

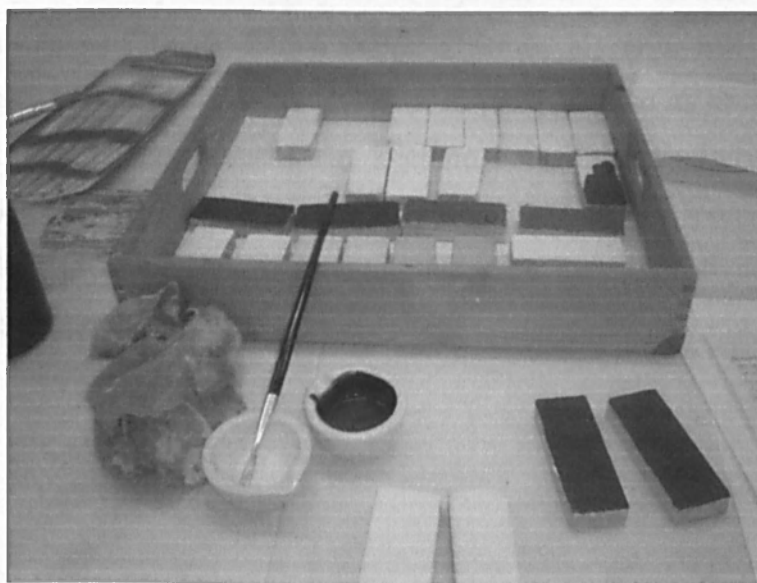
3.6.1 Podklad

Modelové vzorky (obr. č. 8) připravené kombinací deseti pigmentů a dvou typů temper (vaječné a žloutkové) byly připraveny na řádně ohoblovaných dřevěných destičkách ze smrkového dřeva bez jakékoliv impregnace a laku o rozměrech 8 x 5 x 1 cm. Na destičky byla nanášena podkladová vrstva a následně byl podklad zaizolován.

Podklad v modelových vzorcích barevných vrstev byl připraven smícháním dvou objemových dílů boloňské křídly (CaSO_4) a jednoho objemového dílu roztoku želatiny rozpuštěné ve vodě. Roztok želatiny byl připraven ze 40 g želatiny rozpuštěné v 500 ml vody⁴. Na podložku byly nanášeny dvě vrstvy tohoto podkladu. Po uschnutí a zatuhnutí podkladu následovalo jeho zbrúšení smirkovým papírem.

Na zbrúšený podklad byla nanášena izolační vrstva vlažného želatinového roztoku ve dvou vrstvách. Na přípravu izolace bylo odebráno 235 ml roztoku želatiny připraveného rozpouštěním 40 g želatiny ve 250 ml vody⁴ (rozpuštění probíhalo na vodní lázni) a smícháno se 2,3 g kamence ($\text{KAlSO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$). Izolace podkladové vrstvy se provádí proto, aby se následně nanášená barevná vrstva nevpíjela do podkladu.

Barevná vrstva složená z temper (kapitola 2.2.1 a 2.2.2) a jednotlivých pigmentů (kapitola 2.3) se nanášela na zaizolovaný podklad.



Obrázek č. 8. Příprava modelových vzorků.

3.6.2 Příprava proteinových pojiv

Pro přípravu modelových barevných vrstev byla zvolena vaječná a žloutková tempera. Složení bílku a žloutku je popsáno v kapitolách 2.2.1 a 2.2.2. V minulosti termín tempera nebyl přesně vymezen, ale v současnosti je zvykem užívat tohoto termínu pouze pro malířské techniky, jejichž pojivými látkami jsou výlučně emulze, ať už umělé nebo přírodní⁴. Ke zhotovení tempery je známo nespočet množství receptů, jejich použití se řídí podle toho, jaká malba se má temperou provádět a hlavně podle typu podkladu, na který se bude tempera nanášet.

Nejtypičtějším emulzním pojivem používaným u závěsných obrazů je právě vaječná a žloutková tempera. Stejně jako do vaječné, tak i do žloutkové emulze se mohou přidávat změkčovadla (med, fíková šťáva, glukóza, glycerin, mléko, slad aj.) a také tuhnutí oleje, laky a vosky. Změkčovadla se přidávala pro zvýšení pružnosti barevné vrstvy, aby po uschnutí nedocházelo k jejímu krakelování. Barvy pojené žloutkem schnou nejdříve fyzikálně, odparem vody, a posléze tuhnou pomalým polymeračním procesem žloutkového oleje. Jsou velmi stálé a po čase i relativně odolné vůči vodě a organickým rozpouštědlům⁴.

3.6.2.1 Vaječná tempera

Vaječná tempera byla připravena smícháním tří vajec (jedno vejce má objem přibližně 45 ml) a 50 ml lněného oleje⁴. Čerstvě připravená tempera byla smíchána s pigmentem. Takto připravená barevná vrstva se nechala jeden den odstát v lednici a poté byla nanášena na dřevěné destičky se zaizolovanou podkladovou vrstvou. V tabulce III. jsou uvedeny poměry navážky pigmentů a vaječné tempery.

Tabulka III. Poměr navážky jednotlivých anorganických pigmentů a vaječné tempéry.

Pigment	Navážka pigmentu (g)	Navážka vaječné tempéry (g)
Hydroxid olovnatý ($\text{Pb}(\text{OH})_2$)	5,0	10,0
Měděnka [$\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{Cu}(\text{OH})_2$]	5,0	10,0
Oxid chromitý (Cr_2O_3)	3,0	10,0
Oxid titaničitý (TiO_2)	6,0	10,0
Oxid železitý (Fe_2O_3)	3,0	10,0
Sulfid arsenitý (As_2S_3)	2,5	10,0
Sulfid kademnatý (CdS)	3,0	10,0
Sulfid rtuťnatý (HgS)	5,0	10,0
Svinibrodská zeleň [$\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3 \text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$]	5,0	10,0
Uhličitan vápenatý (CaCO_3)	8,0	10,0

3.6.2.2 Žloutková tempera

Žloutková tempera byla připravena ze 3 objemových dílů žloutku, 1,5 obj. dílu ořechového oleje, 1 obj. dílu vody a 1 obj. dílu arabské gumy⁴. Zrnko kafru, které bylo v receptu uvedeno a má desinfekční účinek, nebylo ke směsi přidáno, neboť tempera byla hned následující den smíchána s pigmenty a zpracována.

Připravené barevné vrstvy byla ponechány přes noc odstát v lednici a poté byly naneseny na dřevěné destičky se zaizolovanou podkladovou vrstvou. Na destičky byly naneseny tři vrstvy připravených maleb. V tabulce IV. jsou uvedeny navážky pigmentů a žloutkové tempéry.

Tabulka IV. Poměr navážky jednotlivých anorganických pigmentů a žloutkové tempéry.

Pigment	Navážka pigmentu (g)	Navážka žloutkové tempéry (g)
Hydroxid olovnatý ($\text{Pb}(\text{OH})_2$)	3,0	10,0
Měděnka [$\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{Cu}(\text{OH})_2$]	2,5	10,0
Oxid chromitý (Cr_2O_3)	2,5	10,0
Oxid titaničitý (TiO_2)	2,5	10,0
Oxid železitý (Fe_2O_3)	3,0	10,0
Sulfid arsenitý (As_2S_3)	3,0	10,0
Sulfid kademnatý (CdS)	3,0	10,0
Sulfid rtuťnatý (HgS)	2,5	10,0
Svinibrodská zeleň [$\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3 \text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$]	5,5	10,0
Uhličitan vápenatý (CaCO_3)	3,0	10,0

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Popis peptidových píků modelových vzorků

Metodou peptidového mapování byly studovány modelové vzorky barevných vrstev, které byly připraveny použitím vaječné a žloutkové tempéry a které byly smíchány s deseti anorganickými pigmenty. Každý odebraný vzorek modelové barevné vrstvy byl rozštěpen působením trypsinu, vzniklé peptidové štěpy byly přečištěny na reverzní fázi, analyzovány hmotnostním spektrometrem a následně vyhodnoceny pomocí programu mMass. Hodnoty m/z byly pro každý vzorek zpracovány do tabulky V. a VI. K hodnotám m/z získaným z daných modelových vzorků, které byly všechny měřeny celkem pětkrát, byla přiřazena relativní intenzita.

Hodnoty m/z , které se vyskytovaly v 80 % všech změřených spekter (výjimkou byly měďnaté pigmenty), byly dále porovnány s peptidovými štěpy získanými modelovým štěpením v programu mMass a souhlasícím hodnotám m/z byly přiřazeny aminokyselinové sekvence (tab. č. VII.). Nízké pokrytí aminokyselinových sekvencí lze vysvětlit jednak neúplným popsáním proteinového složení obou vaječných komponent (žloutku a bílku), ale také možnými interakcemi vaječných proteinů s dalšími látkami obsaženými v jednotlivých temperách a celých barevných vrstvách.

V tabulce č. VII., jsou uvedeny píky, které jednoznačně potvrzují přítomnost vaječné či žloutkové tempéry v kombinaci se všemi studovanými pigmenty s výjimkou měďenky $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{Cu}(\text{OH})_2]$ a svinibrodské zeleně $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3 \text{Cu}(\text{AsO}_2)_2]$. Oba tyto měďnaté pigmenty poskytovaly s oběma druhy temper nejmeně kvalitní spektra. Překvapivě nejlepší spektra byly získána ze vzorků obsahujících iont těžkého kovu Cd^{2+} pocházejícího z kadmiové žlutě (CdS). Tato zjištění potvrzují i údaje z publikace M. Green a H. Neurath, která se zabývá vlivem dvojmocných kationtů na enzymovou aktivitu trypsinu⁵⁰. V tomto článku je uveden Cu^{2+} jako inhibitor a Cd^{2+} jako aktivátor trypsinu. Srovnání spekter žloutkové tempéry smíchané s kadmiovou žlutí a měďenkou je na obrázku č. 9.

Tabulka V. Nalezené hodnoty m/z peptidových štěpů s přiřazenými intenzitami nalezených v barevných vrstvách pojených vaječnou temperou. Hodnoty m/z jsou uvedeny s přesností $\pm 0,2$ Da. (x – nízká intenzita, xx – střední intenzita, xxx – vysoká intenzita signálu)

Pigment	HgS	Fe ₂ O ₃	Pb(OH) ₂	TiO ₂	[Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 3 Cu(AsO ₂) ₂]	[Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 2 Cu(OH) ₂]	As ₂ S ₃	CdS	CaCO ₃	Cr ₂ O ₃
m/z										
910,4		x	x	x				x		x
924,5		x	x	x						
1016,5	xx	x	x				x	x		
1024,5	xx	x	x	x	x		x	x		x
1048,6	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
1052,6	xx	x			x			xx		x
1068,5		x					x	x		
1085,5			x				x			x
1094,6	xxx	xx	xx	xx	xx		xx	xx	xx	xx
1099,6	x		x				x			
1106,6	xx	xx	xx	xx	x		xxx	xx	xx	xx
1123,6	x	x	x				x			x
1207,6	xx						x	x		
1267,8				xx		x				x
1401,7		xx		x	x		xxx	xx	xx	x
1406,7	xxx	xxx	xxx				xxx	xxx		xx
1428,7			xx				xx	xx		
1434,7		x		x			x	x	x	
1445,8		xx					xx	xx		
1461,7	x							x		x
1560,8		xx			xx		xx	xx	xx	
1562,8	xx	xx					xxx	xxx		xx
1568,9	xx						xx			xx
1592,8		xx					xx		xx	
1601,7			x				x	xx		
1607,8			x				x	x		
1687,9	xxx	xx	xx	xxx	xxx		xxx	xxx	xx	xx
1773,9		x			x		x			
1815,9		x	x					x		
1829,9	x	x					xx			
1841,1	x			x	x	x	xx	xx		
1859,0		xx	xx	xx	xx		xxx	xxx	xx	xx
1875,0	x			xx	xx		xx	xx	xx	xx
1891,1	xx	xx	xx	xx	xx		xxx	xxx	xx	xx
1893,1	xxx	xx					xxx	xxx		
1930,1	x	x					xx	xx		
1980,2		x	x	x			x		x	xx

Tabulka VI. Nalezené hodnoty m/z peptidových štěpů s přiřazenými intenzitami nalezených v barevných vrstvách pojených žlutkovou temperou. Hodnoty m/z jsou uvedeny s přesností $\pm 0,2$ Da. (x – nízká intenzita, xx – střední intenzita, xxx – vysoká intenzita signálu).

Pigment	HgS	Fe ₂ O ₃	Pb(OH) ₂	TiO ₂	[Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 3 Cu(AsO ₂) ₂]	[Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 2 Cu(OH) ₂]	As ₂ S ₃	CdS	CaCO ₃	Cr ₂ O ₃
m/z										
999,5			x				xxx	xx		x
1048,6	xxx	xx	xxx	xxx	xx	xx	xxx	xxx	xxx	
1068,5	x	x	xx			x	xx	x	xx	x
1077,5		x	x	xx				xx	xx	
1083,4	xx		x	x			xx	xx		
1085,5		x	xx	xx			xxx	xx	xx	xx
1106,5	xx		xxx				xxx		xx	xx
1150,5	xx	x	xx	xx			xx	xx	xx	x
1164,4	xx	xx	xx	xx	xx	x	xx	xx	xx	xx
1213,5	x	x	x	x			x	xx	xx	
1270,6		x		x			x			x
1273,6	xx	xx	xxx	xx			xx	xx	xx	xx
1276,7	x	x							x	x
1324,6	xx	x	xx	xxx			xx	xx	xx	xx
1333,6	xx	x	xx	xx			x	x	xx	x
1342,6		xx	xxx	xxx			xxx	xxx	xxx	
1365,7	x	xx	xx	xx			xxx	xxx	xxx	x
1374,8	x	x	xx	xx			xx	xx	xx	x
1401,7	xxx	xxx	xxx	xxx	xx		xxx	xxx	xxx	xxx
1406,7	xxx	xxx	xxx	xxx		xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1418,8		x		x			xxx		xx	
1434,8	xx	xx	xx	xx			xx	xx	xx	xx
1439,7	xx		xx				xx	xx	xx	
1445,8	xxx	xx	xxx	xxx	xxx		xxx	xxx	xx	xxx
1458,7				xx			xx	xx	xx	
1473,7	xx		xx	xx					xx	
1525,8			xx					x	x	x
1527,8	xx	x	xx	x					x	
1534,8	xx	x	xx	x				x		
1542,8	x	x	xx	xx				x		
1544,7	x		xx	xx				x	x	
1560,7	xxx	xxx	xxx	xxx			xxx	xxx	xxx	xxx
1562,8			xx				xxx	xxx		
1592,9	xx	xx	xxx	xxx				xxx	xxx	xxx
1600,8			x	x				x		
1607,7	xx	x	xxx	xx			x	x	xx	xx
1610,6	x			x				x	x	
1687,8			xx					x	x	

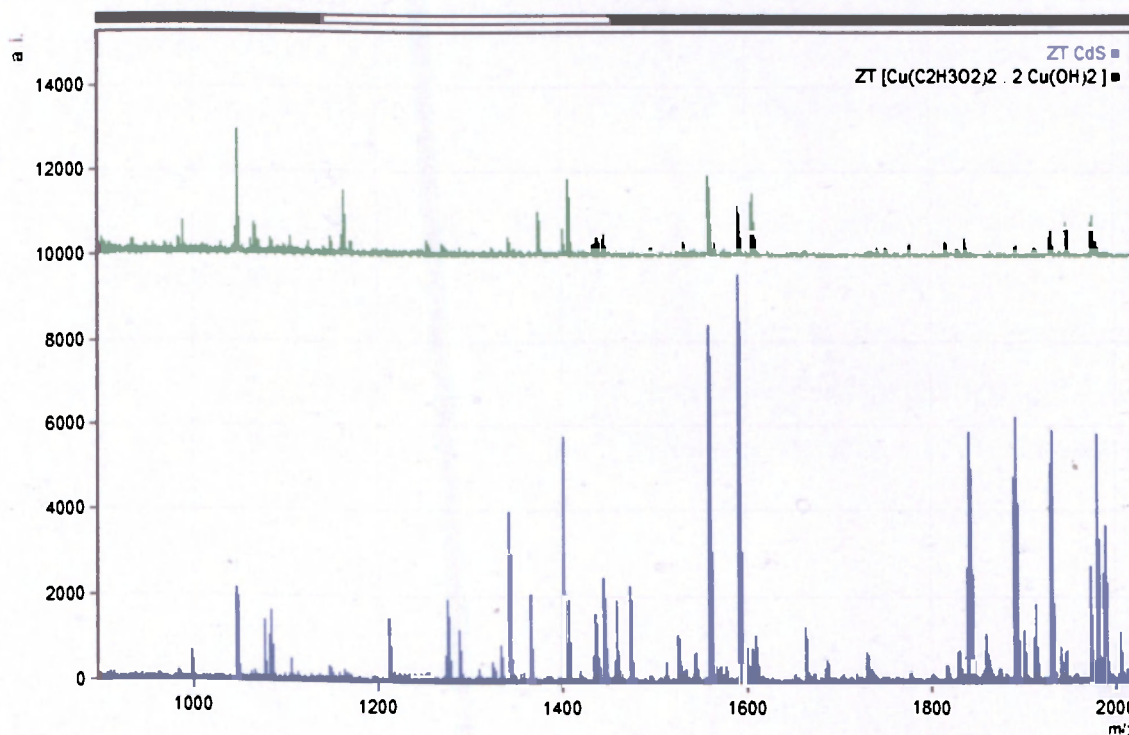
Pigment m/z	HgS	Fe ₂ O ₃	Pb(OH) ₂	TiO ₂	[Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 3 Cu(AsO ₂) ₂]	[Cu(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 2 Cu(OH) ₂]	As ₂ S ₃	CdS	CaCO ₃	Cr ₂ O ₃
1703,9			x	x				x		
1815,7	xx	xx	xx	xx	x		x	x		
1818,0		x		x				x		
1829,8			xx				xx	xx		x
1830,0		x		x						
1837,9	xx	xx	xx	xx			xx	xx	xx	xx
1841,1				x				x	x	
1843,0	xx	xx	xx	xx			xx	xx	xx	xx
1875,0			x					x	x	
1891,1	xxx	xx	xx	xx		xx	xxx	xxx	xx	xx
1901,1				x				x	x	x
1914,2	x		x	x			xx	xx	xx	
1930,1		xx	xx	xx			xx	xx	xx	xxx
1932,2		xx	x	x						
1940,1	xx		x						x	x
1947,0	xx	xx	xx	xx			x			xx
1973,0	xx	xx	xx	xx			xx	xx	xx	
1975,2				x			xx	xx		
1980,1	x	xx	xx	xx	xx		x	xx	xx	xx
1989,1		xx	xx	xx				xx	xx	

Tabulka VII. Přiřazení píků peptidových štěpů nalezených v 80 % hmotnostních spekter vaječné (VT) a žloutkové temperry (ŽT) smíchané s anorganickými pigmenty. Dle database Expasy pochází štěpy z prekursorů proteinů vitelogeninu II (žloutkového proteinu) a ovalbuminu (proteinu pocházejícího z bílku).

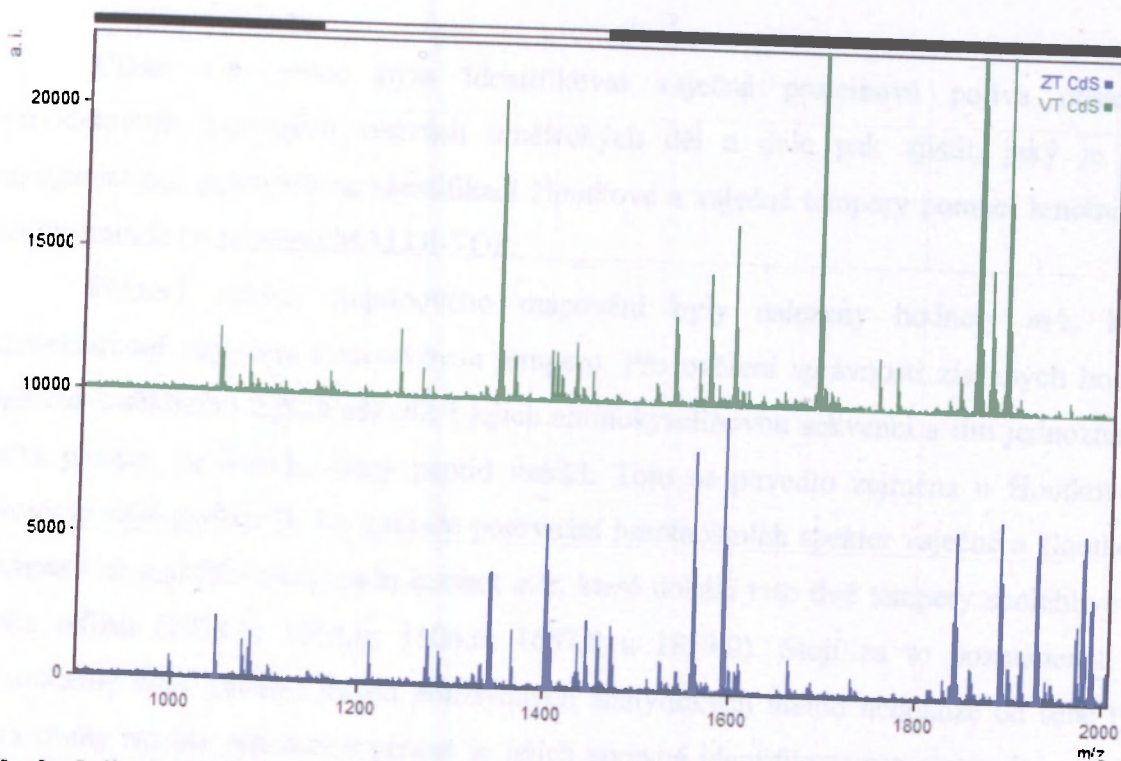
m/z	Intenzita	Tempera	Sekvence	Poloha	Protein
1024,5	x	VT			
1048,6	xx/xxx	VT / ŽT			
1068,5	xx	ŽT			
1094,6	xx	VT			
1106,6	xx	VT	FLEVVQLCR	333-341	vitelogenin II
1150,5	xx	ŽT			
1164,4	xx	ŽT			
1273,6	xx	ŽT			
1324,6	xx	ŽT			
1333,6	xx	ŽT			
1365,7	xxx	ŽT			
1374,8	xx	ŽT			
1401,7	xxx	ŽT			
1406,7	xxx	ŽT			
1434,7	xx	ŽT	ILGIDSMFKVANK	1083-1095	vitelogenin II
1445,8	xxx	ŽT			
1560,7	xxx	ŽT			
1607,7	xx	ŽT	QARNKDASSSRSSK	1160-1174	vitelogenin II
1687,8	xxx	VT	GGLEPINFQTAADQAR	127-142	ovalbumin
1837,9	xx	ŽT			
1843,0	xx	ŽT			
1859,0	xx	VT			
1891,1	xx/xxx	VT / ŽT			
1980,1	xx	ŽT			

Na obrázku č. 10 je srovnání vaječné a žloutkové tempéry smíchané s kadmiovou žlutí (CdS). Obě spektra jsou si velmi podobná, přesto lze nalézt více píků ve spektru žloutkové tempéry. Předpokládáme, že větší počet píků nalezených ve žloutkové tempeře je způsoben vyšší koncentrací menšího počtu proteinů než je tomu i vaječné tempéry, která kromě žloutku obsahuje navíc i proteiny bílku a možná právě proto jsou zde žloutkové proteiny hůře dostupné pro trypsin. Menší počet peptidů u vaječné tempéry je také možné vysvětlit vyšší reaktivitou bílkových proteinů s kovovými ionty pocházejících z přidávaných anorganických pigmentů a proto i menší ochotou trypsinu je štěpit. Tuto hypotézu by bylo vhodné ověřit přidávkem některého z chelatačních činidel (například Na_2EDTA).

Podle výsledků uvedených v tabulce č. VII. je možné od sebe odlišit vaječnou temperu od žloutkové podle peptidů o hodnotách: 1024,5; 1094,6; 1106,6; 1687,8 a 1859,0 m/z . Tyto peptidy musí pocházet z bílku, který není obsažen ve žloutkové tempeře. K hodnotě 1687,8 m/z se podařilo přiřadit aminokyselinovou sekvenci z ovalbuminu, nejčtenějšího proteinu bílku (viz kap. 2.2.1).



Obrázek č. 9. Spektra žloutkové tempéry smíchané s CdS (modré spektrum) a $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2 \text{Cu}(\text{OH})_2]$ (zelené spektrum).



Obrázek č. 10. Spektra vaječné (zelené spektrum) a žloutkové tempéry (modré spektrum) smíchané s kadmiovou žlutí (CdS).

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo identifikovat vaječná proteinová pojiva obsažená v modelových barevných vrstvách uměleckých děl a dále pak zjistit, jaký je vliv anorganických pigmentů na identifikaci žloutkové a vaječné tempery pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF.

Pomocí metody peptidového mapování byly nalezeny hodnoty m/z , které charakterizují vaječnou a žloutkovou temperu. Pro ověření správnosti získaných hodnot m/z lze k některým z píků přiřadit i jejich aminokyselinovou sekvenci a tím jednoznačně určit protein, ze kterého daný peptid vznikl. Toto se povedlo zejména u žloutkového proteinu vitelogeninu II. Na základě porovnání hmotnostních spekter vaječné a žloutkové tempery se podařilo zjistit sadu hodnot m/z , které dokáží tyto dvě tempery spolehlivě od sebe odlišit (1024,5; 1094,6; 1106,6; 1687,8 a 1859,0). Stojí za to poznamenat, že v současné době žádná z jiných používaných analytických metod nedokáže od sebe tyto dva druhy temper rozeznat a přitom je jejich správná identifikace pro restaurátory velmi žádoucí a cenná. Získané hodnoty m/z byly rovněž použity k doplnění knihovny referenčních spekter proteinových poživ.

Dále se podařilo se zjistit, které ze studovaných pigmentů nejvíce ovlivňují identifikaci vaječné a žloutkové tempery. Jedná se o měděnku a svinibrodskou zeleň, tedy pigmenty obsahující kationt Cu^{2+} , který je uváděn mezi inhibitory enzymové aktivity trypsinu. Ostatní anorganické pigmenty poskytují kvalitní spektra, která umožňují bezpečnou identifikaci použitých temper.

Cílem do budoucna je upravit podmínky pro spolehlivou identifikaci proteinových poživ i ve směsích s pigmenty obsahujícími měď, například použitím chelatačních činidel, a dále vyzkoušet možnost odlišení vaječné a žloutkové tempery i v případě reálných vzorků.

6. LITERATURA

1. Pollio Vitruvius Marcus: Deset knih o architektuře. Svoboda, 1979.
2. Plinius Starší: Kapitoly o přírodě. Svoboda, 1974.
3. Cennino Cennini: Il Libro dell' Arte. 1437. České vydání: Kniha o umění středověku. Přeložil F. Topinka. Praha, 1946.
4. Slánský B.: Technika malby, díl I: Malířský a konzervační materiál. Paseka, Praha, 2003.
5. Slánský B.: Technika v malířské tvorbě: Malířský a restaurátorský materiál. Vydání 1. Státní nakladatelství technické literatury. Praha, 1973.
6. <http://old.mendelu.cz/~subrt/drubez.htm> (26.10.2007)
7. Smith R.: Encyklopedie výtvarných technik a materiálů. Praha, Slovart 2000.
8. Thompson D.V.: The Materials and Techniques of Medieval painting. Dover Publications, Inc., New York, 1956.
9. Ziegler V.: Základy mineralogie a petrologie pro studenty Pedagogické fakulty. Praha, 2003.
10. Šimůnková E., Bayerová T.: Pigmenty. Společnost pro technologie opravy památek - STOP, 1999.
11. Jirásek J., Vavro M.: Nerostné suroviny a jejich využití. Ostrava: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR & Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2008.
12. Štengl V.: Kouzelný oxid titaničitý. Jak se zbavit toxických látek. Vesmír 87, 402, 2008/6.
13. Hradil D., Hradilová J.: Minerály starých obrazů-Ukázky z průzkumu barevné vrstvy. Vesmír 81, 383, 2002/7.
14. Hynek R., Kuckova Š., Hradilová J., Kodíček M.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings. RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 1-5 (2004).
15. Carhini M., Stevanato R., Rovea M., Traldi P., Favretto D.: Curie-point pyrolysis gas chromatography mass spectrometry in the art field. The characterization of proteinaceous binders. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10: 1240-1242 (1996).

16. Chiavari G., Gandini N., Russo P., Fabbri D.: Characterisation of standard tempera painting layers containing proteinaceous binders by pyrolysis gas chromatography mass spectrometry. *Chromatographia* 47: 420-426 (1998).
17. Ciliberto E., Spoto G.: Modern Analytical Methods in Art and Archeology. Wiley-Interscience. New York, 2000.
18. Colombini M.P., Modungo F.: Characterisation of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques. *J. Sep. Sci.* 27: 147-160 (2004).
19. De la Cruz-Canizares J., Doménech-Carbó M.T., Gimeno-Adelantado J.V., Mateo-Castro R., Bosch-Reig F.: Suppression of pigment interference in the gas chromatographic analysis of proteinaceous binding media in paintings with EDTA. *J. Chromatogr. A* 1025: 277-285 (2004).
20. Bonaduce I., Colombini M.P.: Gas chromatography/mass spectrometry for the characterization of organic materials in frescoes of the Momumental Cemetery of Pisa (Italy) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 2523-2527 (2003).
21. Chiavari G., Gandini N., Russo P., Fabbri D., Characterisation of Standart Tempera Painting Layers Containing Proteinaceous Binders by Pyrolysis (/Methylation)-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia*, Vol. 47, No. 7/8 (1998).
22. Fabbri M., Picollo M., Porcinai S., Bacci M. *Appl. Spectrosc.* 55:428–433 (2001).
23. Vandenabeele P., Wehling B., Moens L., Edwards H., De Reu M., Van Hooydonk G. *Anal. Chim. Acta* 407:261–274 (2000).
24. Vandenabeele P, Verport F, Moens L. *J. Raman Spectrosc.* 32: 263 (2001).
25. Edwards HGM, Brooke CJ, Tait JFK. *J. Raman Spectrosc.* 28: 95 (1997).
26. Odlyha M.: *Thermochym. Acta*, 269/270, 705-727 (1995).
27. <http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/specplib.html> (5.11. 2008)
28. <http://web.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/112/2007/unor/capoun.html> (24.3. 2009)
29. Baumbruk V.: Infračervená a Ramanova spektroskopie – co nám mohou říci vibrace o (bio)molekulách. *Materials structure* , vol.12, no. 2 : 118/119 (2005).
30. Van't Hul-Ehrereich, E. H., Infrared Microspectroscopy for the Analysis of Old Painting Materials, *Studies of Conservation* 15, s. 175–182 (1970).
31. <http://www.czechdesign.cz/index.php?status=c&clanek=85&lang=1> (28.3. 2009)
32. http://www.techartis.cz/TA_2006/3_Hradil/3_Hradil.htm (14.1.2009)

33. Tokarski C., Martin E., Rolando C., Olivé C., Identification of Proteins in Renaissance Paintings by Proteomics. *Anal. Chem.*, 78, 1494-1502 (2006).
34. Chromý V. a kol.: Bioanalytika. Analytická chemie v laboratorní medicíně. Masarykova univerzita, Brno 2002.
35. Heginbotham A., Millay V., Quick M., The Use of Immunofluorescence Microscopy (IFM) and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) as Complementary Techniques for Protein Identification in Artists' Materials. *J. Am. Inst. Cons.*, 45 (2), p. 89 – 105 (2006).
36. Dif K., Pepe C., Peduzzi J., Lavedrine B., Chachine C.: *J. Cult. Heritage*, 3, 317-323 (2002).
37. Griffin T.J., Smith L.M.: Single-nucleotide polymorphism analyses by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol.* 18: 77-84 (2000).
38. Kučková Š., Grygar T., Hradil D., Hradilová J.: *J. Solid State Elect.* 7:706 (2003).
39. Hanuš V., Herman Z., Lern K.: Hmotnostní spektrometrie a velké molekuly. *Vesmír* 82, 312, 2003/6.
40. Kodíček M.: Biochemické pojmy výkladový slovník elektronická interaktivní verze. Praha, VŠCHT 2004.
41. Havliš J.: Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* 78, 448, 1999/8.
42. http://www.eurogentec.com/EGT/Images/maldi_tof.jpg (16.5.2008)
43. <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php> (1.6. 2008)
44. <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/> (12.11. 2007)
45. www.expasy.ch (22.11. 2008)
46. Kaš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie. 1. vydání VŠCHT v Praze, Praha 2006.
47. Glückmann M., Pfenninger A., Krüger R., Thierolf M., Karas M., Horneffer V., Hillenkamp F., Strupat K.: Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes? *Int. J. Mass Spectrom.* 210/211: 121-132 (2001).
48. Kodíček M. Biochemické pojmy: výkladový slovník. Praha: VŠCHT Praha, 2007.
49. <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331public/trypsin-4ba.gif> (3.2. 2009)
50. Green M., H. Neurath: The Effect of Divalent Cations on Trypsin. *J. Biol. Chem.* 342: 379-390 (1953).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CHCA	α -kyano-4-hydroxybenzoová kyselina
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent
ESI MSD	elektro-spray ionizace v hmotnostně detekční spektrometrii
FAST	fragmentation analysis and structural TOF
GC-FID	gas chromatography-flame ionisation detector (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem)
HPLC	high performance liquid chromatography (vysoce účinná kapalinová chromatografie)
MALDI	matrix-assisted laser desorption-ionization
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
PMF	peptide mass fingerprinting (metoda peptidového mapování)
PSD	post source decay (pozdní rozpad)
TOF	time of flight (doba letu částice)