

**KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA CHEMIE A DIDAKTIKY CHEMIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Identifikace mléčných a kolagenových pojiv používaných
v barevných vrstvách uměleckých děl**

Vypracovala:

Pavla Kofroňová

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Mgr. Štěpánka Kučková, Ph.D.

Studijní obor:

Chemie - Matematika

V Praze dne 6. dubna 2012

.....

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze v období (květen 2007–duben 2012).

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 6. dubna 2012

SOUHRN

Úkolem mé diplomové práce bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňují anorganické pigmenty identifikaci kaseinové olejové tempery a klišové tempery pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry). Nejprve bylo potřeba připravit soubor modelových barevných vrstev temper s vybranými deseti anorganickými pigmenty. Pak metodou peptidového mapování získat hmotnostní spektra vzorků a porovnat peptidové štěpy obou temper. Nakonec bylo možné určit charakteristické peptidové štěpy pro obě proteinová pojiva v temperách a zjistit, které pigmenty nejvíce ovlivňují identifikaci kaseinu a králičího klišu touto metodou.

Získané hodnoty m/z kaseinové olejové tempery a klišové tempery byly použity ke zkvalitnění a doplnění databáze referenčních proteinových poživ, která slouží k identifikaci proteinových poživ v uměleckých dílech na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze.

SUMMARY

The task of this diploma thesis was to investigate the influence of inorganic pigments on the identification of casein oil and animal glue tempera by mass spectrometry MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry). First, it was necessary to prepare a set of model colour layers containing casein and animal glue tempera together with ten inorganic pigments. Consequently, the method of peptide mass fingerprinting was used to obtain mass spectra of the samples. Finally, it was possible to compare and determine the characteristic peptide fragments for both proteinaceous binders and find pigments that most affected the identification of casein and rabbit glue temperas.

The obtained values of m/z casein oil tempera and animal glue tempera were used to improve and complete reference database of protein binders that is used to identify protein binders in works of art at the Institute of Chemical Technology in Prague.

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.

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, Ph.D. a ostatním pracovníkům laboratoře hmotnostní spektrometrie za příjemnou a cennou spolupráci.

Zároveň bych chtěla poděkovat rodičům za trpělivost a podporu při mém studiu.

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	STRUKTURA VRSTEV UMĚLECKÝCH DĚL	2
2.2	ANORGANICKÉ PIGMENTY	3
2.2.1	BÍLÉ PIGMENTY	3
2.2.1.1	Plavená křída	3
2.2.1.2	Olovnatá běloba	4
2.2.1.3	Titanová běloba	4
2.2.2	ŽLUTÉ PIGMENTY	5
2.2.2.1	Auripigment	5
2.2.2.2	Kadmiová žluť	5
2.2.3	ČERVENÉ PIGMENTY	6
2.2.3.1	Rumělka	6
2.2.3.2	Železitá červen	6
2.2.4	ZELENÉ PIGMENTY	7
2.2.4.1	Chromoxid bezvodý (tupý)	7
2.2.4.2	Měděnka	7
2.2.4.3	Svinibrodská zeleň	8
2.3	POJIVA	8
2.3.1	PROTEINOVÁ POJIVA	9
2.3.1.1	Kasein	9
2.3.1.2	Klihy a želatina	10
2.3.1.3	Vaječná pojiva	12
2.4	ANALÝZA UMĚLECKÝCH DĚL	13
2.4.1	METODY IDENTIFIKACE PROTEINOVÝCH POJIV	13
2.5	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI-TOF	15
2.5.1	HISTORIE	15
2.5.2	ZÁKLADNÍ PRINCIPY MĚŘENÍ MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ	16
2.5.3	PEPTIDOVÉ MAPOVÁNÍ	19

2.5.4	SEKVENOVÁNÍ BÍLKOVIN A PEPTIDŮ.....	21
2.5.5	STUDIUM PROSTOROVÉHO USPOŘÁDÁNÍ.....	22
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1	MATERIÁL.....	24
3.1.1	CHEMIKÁLIE A POMŮCKY.....	24
3.1.2	SLOŽENÍ PROMÝVACÍCH ROZTOKŮ.....	24
3.1.3	REFERENČNÍ MATERIÁL.....	24
3.1.4	PŘÍPRAVA MODELOVÝCH VZORKŮ.....	25
3.1.4.1	Příprava podkladové vrstvy.....	25
3.1.4.2	Příprava kaseinové olejové tempery.....	25
3.1.4.3	Příprava klišové tempery.....	27
3.2	ZAHUŠŤOVÁNÍ A PŘEČIŠTĚNÍ PEPTIDOVÝCH ŠTĚPŮ NA REVERSNÍ FÁZI.....	28
3.3	ANALÝZA VZORKŮ POMOCÍ MALDI-TOF MS.....	28
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5.	ZÁVĚR.....	35
6.	LITERATURA.....	36
7.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	40

1. ÚVOD

Již od pradávna člověk rád využíval různé barvy ke zdobení svého obydlí, oděvů i těla. Ke spojení sypkých barviv a pigmentů začal používat různá, v dané době dostupná, pojiva. Tyto pojiva se rozlišují podle převládající složky na proteinová, olejová, polysacharidová nebo pryskyřičná. V současné době je k zachování historických uměleckých děl zapotřebí rozpoznat různé malířské techniky, k čemuž nám napomáhá správná identifikace použitých organických materiálů. Vzhledem k tomu, že většina malířů si míchala barvy sama a své receptury držela v přísné tajnosti, se mnoho historických postupů malířských technik nedochovalo.

Přesnou analýzou materiálů, tj. pigmentů a pojiv, lze tyto metody malby znovu oživit. Znalosti technik nám umožňují díla restaurovat stejným způsobem, jakým byla kdysi vytvořena. Výsledky analýz mohou být také využity historiky k zařazení uměleckého díla do časového období, eventuálně mohou napomoci s rozpoznáním některé malířské školy a žáků jednotlivých mistrů. Mnoho uměleckých děl bylo kopírováno, napodobováno a vydáváno za originály slavných a ceněných umělců. Přesná znalost technik využívaných daným autorem nám může napomoci tyto falsifikáty či kopie rozpoznat. Vzhledem ke kvalitě některých malířských postupů, které prověřil čas, je mnoho starodávných receptur využíváno i dnešními malíři.

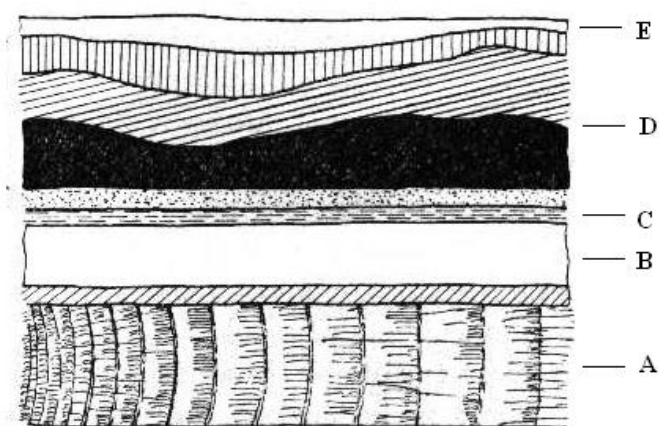
V současné době je jednou z nejmodernějších a nejpřesnějších metod analýzy proteinových pojiv hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight). Tato metoda nám umožňuje rozpoznat proteinová pojiva jakými je například žloutek, celé vejce, kasein a kliš.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Struktura vrstev uměleckých děl

Struktura obrazu musí být po technické stránce důmyslně promyšlený celek, aby se co nejlépe zabránilo jeho zkáze. Technické typy výstavby jsou úzce spojeny s obdobím, ve kterém vznikaly, protože technický styl se odvíjí od estetického slohu dané doby.

Nejspodnější vrstvu tvoří podložka (obr. 1), která může být z různých materiálů: dřeva, plátna, kovu, papíru, lepenky, kamene, skla, umělých hmot a podobně. Na ní bývá zpravidla nanesen podkladový nátěr, jímž se upravuje struktura podložky. Podklad je složen z anorganických plnidel, pigmentů a pojiva. Anorganická složka může být přírodní křída (uhličitan vápenatý), sádra (síran vápenatý) nebo různé druhy přírodních hlinek. Pokud tyto hlinky obsahují oxidy železa nebo mají červenohnědé zbarvení, označujeme pak tyto podklady jako bolusové. Podle pojiva rozlišujeme podklady na klišové, olejové a emulsní. Na podkladovou část se nanáší tenká vrstvička izolace, která zabráňuje vsakování pojidel barev do podkladu. Izolace může být nátěr želatiny nebo pryskyřičného či olejového laku. Následně se vytváří samotná malba, která se může skládat z většího počtu vrstev. Tyto vrstvy mohou být vytvořeny různými technikami. Hlavními složkami malby jsou pigmenty a pojiva případně některé další přísady, které ovlivňují vlastnosti malby. Nakonec se nanáší ochranná vrstva [1].



Obrázek 1. Struktura deskového obrazu: A – podložka, B – podkladová vrstva, C – izolace, D – barevná vrstva (směs pigmentů s pojivou), E – ochranná vrstva (lak, lazura, vosk) [1].

2.2 Anorganické pigmenty

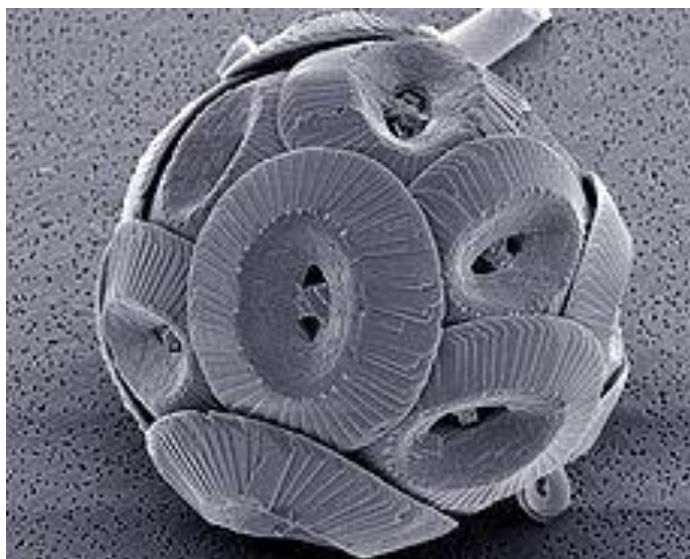
2.2.1 Bílé pigmenty

2.2.1.1 Plavená křída

Plavená křída (CaCO_3) vzniká rozpadem schránek mořských mikroorganismů. Nejčastěji jde o planktonické foraminifery a hlavně kokolity (schránky řas řádu *Coccolithophoridae*), ale i jiné organické zbytky (obr. 2) [2]. Přírodní křída se naláme na kusy a nechá se větrat po dobu jednoho roku, pak se roztluče a rozemele ve vodě a dále se plaví [3].

Plavená křída vyniká svou bělostí, jemností a měkkostí, ale má velmi nízkou kryvost, proto se používala jako podkladový materiál. Dnes se využívá jako plnivo, jako podkladový materiál a substrát pro výrobu barev [3].

pKs: 8,35



Obrázek 2. 3D mikrofotografie kokolitu řasy *Coccolithus pelagicus* z elektronového mikroskopu [4].

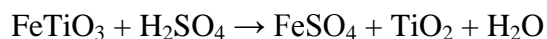
2.2.1.2 Olovnatá běloba

Olovnatá běloba (zásaditý uhličitan olovnatý: $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$) je jeden z prvních uměle připravených pigmentů (4. století př. n. l.). Způsobů přípravy tohoto pigmentu je více. Jeden z nich je srážení roztoku octanu olovnatého roztokem uhličitanu sodného. Olovnatá běloba byla používána ve vaječné tempeře, akvarelu a v klišovém pojivu. Vzhledem ke svému silnému antikoroznímu účinku proti mořské vodě se využívá i na nátěry lodí [3].

Olovnatá běloba je jedovatá, velmi stálá na světle a její krycí schopnost je velmi vysoká obzvláště v oleji. Při styku se sulfanem ve vzduchu tento pigment černá (vzniká sulfid olovnatý: PbS), ale v olejomalbě kryté lakem k tomu nedochází.

2.2.1.3 Titanová běloba

Klasická sulfátová výroba oxidu titaničitého (TiO_2) využívá titanovou rudu ilmenit (FeTiO_3), která se louží v koncentrované kyselině sírové (rov. 1). Podle způsobu hydrolyzy je produktem anatasová nebo rutilová běloba, které se liší v uspořádání, krycí mohutnosti, indexem lomu a barvicími schopnostmi [3].



Rovnice 1

Titanová běloba se začala používat jako pigment až v roce 1920 a v dnešní době patří mezi nejužívanější bílé pigmenty. Je nejbělejší a má největší kryvost z bílých pigmentů. Na světle je velmi stálá a snáší se dobře s ostatními pigmenty a pojivy. Je velice odolná vůči zředěným kyselinám a zásadám a není jedovatá [3]. Vzhledem k tomu, že není jedovatá, používá se jako bělicí látka také v potravinářství a přidává se do zubních past [5].

2.2.2 Žluté pigmenty

2.2.2.1 Auripigment

Přírodní minerál auripigment (As_2S_3) [6] se zpracovává mletím, promýváním a proséváním. Syntetický auripigment se připravuje buď tzv. suchou cestou přímo z prvků a poté se čistí sublimací (poprvé doloženo roku 1758). Lze jej připravit také srážením z roztoku tzv. mokrou cestou, ale takto vyrobený minerál se pravděpodobně nevyužíval jako pigment.[3]. Byl využíván již v Antice a v mnoha středověkých perských a byzantských iluminovaných rukopisech. Dále se používal na nástěnné malby ve střední Asii a Číně. V Evropě se používal na deskové malby. Běžně z něj spolu s indigem byla připravovaná zelená barva. V dnešní době se již nevyužívá [3].

Má krásný zlatožlutý odstín, dobrou kryvost a je stálý na světle. Je odolný vůči zředěným kyselinám i zásadám. Není mísitelný s měďnatými a olovnatými pigmenty, s nimiž vytváří černé sulfidy. Je prudce jedovatý [3].

pKs: 28,40

2.2.2.2 Kadmiová žluť

Kadmiová žluť (CdS) se připravuje dvojím způsobem. Mokrý způsob přípravy spočívá ve srážení kademnatých solí alkalickými sulfidy nebo sulfanem a suchý způsob je zahřívání kovového kadmia, oxidu nebo uhličitanu kademnatého se sírou bez přístupu vzduchu při 300–500 °C. Kadmiová žluť se využívá v malbě od roku 1829 a je vhodná ke všem malířským technikám kromě fresky, kde je použití sporné [3].

Kadmiová žluť může mít různé odstíny, což závisí na velikosti a tvaru částic, krystalické struktuře, aglomeraci a přítomnosti jiných minerálů [7]. Má vysokou kryvost, stálost na světle je různá. Kadmiovou žluť není vhodné mísit s měďnatými a olovnatými pigmenty, protože s nimi vytváří černé sulfidy a dochází k šednutí nebo hnědnutí barvy [1]. Ve vlhku může naopak blednout následkem oxidace [8]. Je nerozpustná ve zředěných minerálních kyselinách, zásadách, kyselině octové a teploty do 300 °C ji neovlivňují. Není toxická [3].

2.2.3 Červené pigmenty

2.2.3.1 Rumělka

Přírodní rumělka (HgS) se připravovala mletím minerálu cinabaritu, což je červený nízkoteplotní minerál [6], a opakovaným promýváním. Syntetická příprava probíhá opět buď suchou cestou, sublimací, nebo mokrou cestou, která je založena na přeměně černé modifikace sulfidu rtuťnatého zahříváním v roztoku sulfidu amonného nebo draselného. Tento způsob byl objeven v roce 1687 a je dnes jediný způsob výroby v Evropě. [3] Přírodní rumělka byla známa již v 6. století před naším letopočtem v Řecku a byla identifikovaná v mnoha evropských malbách téměř z každého období. Častěji se používala v temperě a akvarelu než v olejomalbě [3].

Odstín pigmentu může být od intenzivně červené až po ostře červenooranžovou barvu. Má vysokou kryvost. Je odolný vůči zásadám, zředěným i koncentrovaným kyselinám kromě lučavky královské. Ačkoliv se jedná o sulfid, nereaguje s ostatními pigmenty. Je považovaný za světlostálý pigment, ale v některých případech došlo k ztmavnutí (přeměna hexagonální rumělky na černý kubický cinabarit), které je však vratné [1].

pKs: 26,10

2.2.3.2 Železitá červeně

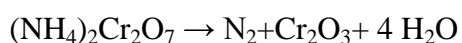
Železitá červeně (Fe_2O_3) se připravuje srážením z roztoků železitých a železnatých solí nebo tepelným rozkladem. Další způsob získání tohoto pigmentu je mletí přírodního minerálu hematitu [3]. Přípravu tohoto pigmentu uvádí již Plinius starší (žil v 1. století našeho letopočtu) [9]. V dnešní době patří mezi nejvýznamnější komerčně vyráběný pigment.

Odstín tohoto pigmentu je různý, od čistě červené až po červenohnědou barvu, což závisí například na době žihání. Na světle je velmi stálý a má vysokou kryvost a barvivost [1].

2.2.4 Zelené pigmenty

2.2.4.1 Chromoxid bezvodý (tupý)

Chromoxid bezvodý (Cr_2O_3) se připravuje se tepelným rozkladem dichromanu amonného (rov. 2) nebo redukcí dichromanu draselného nebo sodného dřevěným uhlím, pilinami, melasou apod. Poprvé byl použit v roce 1809 v továrně na porcelán. O něco později byl využíván i v malbě, ale méně než dihydrát oxidu chromitého [3].



Rovnice 2

Má nevýrazný barevný odstín, ale má velmi dobrou barevnou vydatnost a krycí schopnosti [1]. Je stabilní a odolný k zásadám, kyselinám i vysokým teplotám. Dobře se snáší se všemi pojivy i pigmenty [3]. U tohoto pigmentu vzniklo podezření na karcinogenní a alergenní účinky [7].

2.2.4.2 Měděnka

Měděnka je označení pro měďnaté octany různého složení, její nejběžnější složení se uvádí vzorcem $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Již ve starém Řecku a Římě se měděnka vyráběla uměle tak, že měděné desky polévali vinnou trestí, močí a octem. Produktem byla směs zásadité a neutrální měděnky, která se rozděluje pomocí koncentrované kyseliny octové. Dále se připravuje srážecí reakcí roztoku síranu měďnatého a octanu olovnatého, barnatého a vápenatého [3].

Díky svému různorodému složení může být měděnka zelená, modrozelená až modrá. U zásadité měděnky dochází v oleji a vaječné tempeře ke změně odstínu do zelena. Směsi měděnky s pigmenty obsahující síru ve vodném pojivu tmavnou (vzniká sulfid), kdežto s olejovým pojivem se nemění. Má dobrou odolnost vůči světlu. Je citlivá na zahřátí (rozkládá se na černý oxid měďnatý) a zásady (mění se na modrý hydroxid). Může působit destruktivně na papír [3].

2.2.4.3 Svinibrodská zeleň

Syntetická svinibrodská zeleň ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$) se vyrábí srážením a krystalizací. V minulosti byly důležité dva způsoby výroby: sulfátový a octanový. Používala se k napodobení patiny na bronzových sochách, tisku tapet a v dekorativním malířství [3].

Odstín pigmentu je zářivý, bledě až tmavě zelený podle způsobu výroby. Má dobrou krycí schopnost, odolnost proti povětrnosti a je stálý na světle. Rozpouští se v minerálních kyselinách a za horka se rozkládá v zásadách. S pigmenty obsahujícími síru černá. Rozkládá organické laky a je prudce jedovatá, proto už se prakticky nepoužívá [1].

2.3 Pojiva

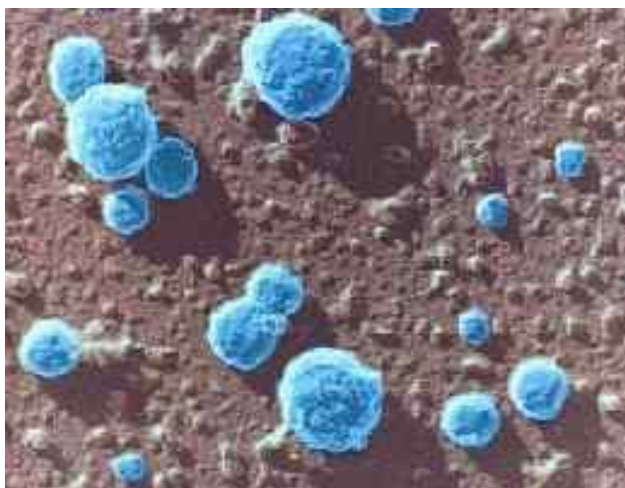
Látky, řidší nebo hustší konzistence, které slouží k dokonalému spojení práškového pigmentu tak, aby vznikla kašovitá forma roztíratelná štětcem, nazýváme v malířství pojiva. Jako pojivla se používají například různé pryskyřice, vosky, oleje, emulse a vodové pojiva.

Přírodní pryskyřice vznikají z balzámů, což jsou sirupovité, husté silně lepivé tekutiny vylučované z různých rostlin. Mezi pryskyřice patří třeba kalafuna, šelak, mastix a kopály. Vosky rozlišujeme na rostlinné, živočišné a syntetické a jsou to estery vyšších mastných kyselin a vyšších alkoholů. Mezi nejznámější vosky patří včelí vosk, parafín, japonský vosk a karnaubský vosk. Oleje rostlinného původu jsou složité směsi esterů glycerolu a vyšších mastných kyselin. Oleje dělíme na tuhnoucí (např. lněný, makový), polotuhnoucí (například slunečnicový, sójový) a netuhnoucí (např. olivový, ricinový). Emulse je kapalina, v níž jsou rozptýleny velmi jemné částice druhé kapaliny. Mezi emulse patří mléko a vaječný žloutek (kap. 2.3.1). Vodová pojiva jsou koloidní látky, které mají velkou lepivost. Podle původu je rozdělujeme na rostlinné, např. arabská guma a škrob, živočišné např. klihy, želatina, kasein, bílek a albumin (kap. 2.3.1) [1].

2.3.1 Proteinová pojiva

2.3.1.1 Kasein

Kasein je složená bílkovina takzvaný fosfoprotein vyskytující se v mléce ve formě vápenatých solí [10]. V kravském mléce je 80 % proteinů tvořeno právě kaseinem, a to α -kaseinem (42 %), β -kaseinem (25 %), γ -kaseinem (4 %) a κ -kaseinem (9 %). Zbýlých 20 % proteinů tvoří α -laktalbumin, sérový albumin, β -laktoglobulin, imunoglobulin a polypeptidy [11]. Kasein v mléce vytváří micely (obr. 3).

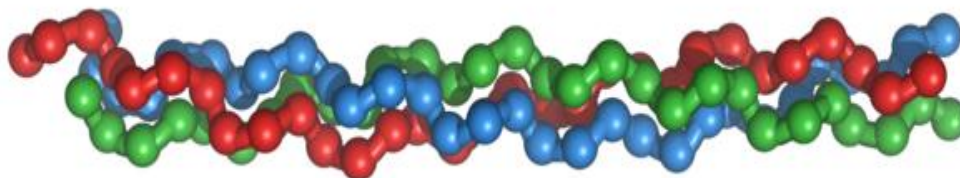


Obrázek 3. Micela kaseinu pořízená elektronovým mikroskopem [12].

Kasein se připravuje buď kyselým srážením, které je založeno na působení kyseliny nebo sladkým srážením, které probíhá působením syřidla (nejčastěji enzym chymosin z telecích žaludků). Při obou postupech dochází na různém principu k porušení stability kaseinových micel. Pak následuje promytí a vysušení [13]. Kaseinový prášek je ve vodě nerozpustný, pouze v ní bobtná. Nabobtnalý kasein lze rozpustit mírným zahřáním s alkálií. Kasein je typický ireversibilní koloid, neboť po zaschnutí je ve vodě nerozpustný. Zaschlý kasein je velmi křehký, proto není příliš vhodný k použití na pohyblivých podložkách zejména na plátno. Kasein je znám již z antických dob, jako silné a nerozpustné lepidlo. Jako pojídlo barev se začal využívat v baroku v nástěnných technikách, vzhledem k tomu, že se s ním pojí nerozpustné soli a jeho malá pružnost zde také nevadí [1].

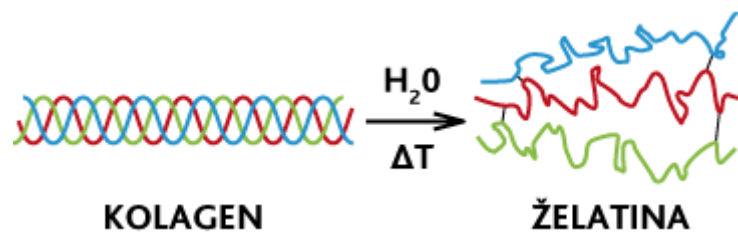
2.3.1.2 Klihy a želatina

Želatina a kliš jsou částečné hydrolyzáty kolagenu. Kolagenů je známo 27 rozdílných typů a je to největší skupina živočišných bílkovin. Jeho název je odvozen z řeckého *colagené*, což znamená klišodárný. Kolagen se tvoří v buňkách vazivových (fibroblastech), chrupavkových (chondroblastech), kostí (osteoblastech) a v epitelových buňkách. Molekula kolagenu je tvořena převážně aminokyselinami glycinem, prolinem, hydroxyprolinem a hydroxylysinem. Skládá se z řetězců, které tvoří trojitou levotočivou šroubovici, kterou nazýváme tropokolagen (obr. 4), díky níž jsou kolagenní vlákna velmi pevná [14].



Obrázek 4. Schématické zobrazení tropokolagenu [15].

Klihy a želatina jsou tvořeny dlouhými řetězci vysokomolekulárních polypeptidů. Tyto řetězce mají rozdílnou molekulovou hmotnost. Molekulová hmotnost klišu se udává mezi 20.000 a 250.000 [16] a u želatiny je v rozmezí 20.000 až 100.000 Da [17]. Získávají se vyvařením materiálů obsahující kolagen jako například kosti, chrupavky, rohoviny a kůže (obr. 5). Želatina vzniká delším vyvařením při nižších teplotách, a proto obsahuje více neštěpený kolagen. [18]. Takto získaný materiál není čistý, ale obsahuje ještě jiné bílkovinné složky (kreatin, elastin, mucin, chondrin) a různé anorganické soli [1].



Obrázek 5. Schéma vzniku želatiny [14].

Podle surovin, z nichž byl kliš vyroben, rozlišujeme několik jeho typů, které se liší molekulovou hmotností, podílem nečistot a svými vlastnostmi. Mezi nejběžnější typy klišů patří kožní kliš, kostní kliš a rybí kliš.

- Kostní kliš je kyselý, jeho pH se pohybuje v rozmezí mezi 5,8 až 6,3, a proto je potřeba jeho roztok neutralizovat. Vzhledem k tomu, že může obsahovat tuky a lipidy je jeho lepivost nižší než u kožního klišu [1].
- Kožní kliš je kvalitnější než kostní kliš, jeho pH je v rozmezí 6,5 až 7,4 a má větší lepivost. Do obchodů přichází ve formě králičího klišu nebo želatiny. Jejich výhodou oproti kaseinu je relativně velká pružnost, pokud ovšem neztratí velké množství vody, což může být způsobeno nadměrným suchem nebo vystavováním příliš vysokým teplotám. Pozlacovači a rámaři považují králičí kliš za nejlepší [1].
- Rybí kliš se připravuje z rybích kostí a chrupavek, je velmi jemný a čistý. Nejlepší kliš je vyzina (typ rybího klišu), která je čirá, netmavne a má nejsilnější lepicí účinky. Vyzina se získává ze sušených měchýřů vyzy nebo jesetera. Její destičky mají perleťový lesk. Slabý roztok se používá jako lepidlo zlata na sklo [19]. Význam a kvality vyziny zmiňuje již Heraklius (10. stol) [20]. Považuje ji za velmi vhodnou k lepení zlaté fólie na slonovinu.

Kliš se ve studené vodě nerozpouští, ale pouze bobtná. Takto nabobtnalý kliš lze zahřátím rozpustit na sirupovitou tekutinu, která však po vychladnutí opět rosolovává. Kliš patří mezi koloidy reversibilní, ale tuto vlastnost ztrácí přidáním některých látek (kamence, formalinu, taninu) nebo stářím [1].

Kliš je jedno z nejstarších adheziv vůbec. Staří Egypťané ho používali již 4000 let před naším letopočtem. První tovární výroba ve světě byla založena roku 1690 v Holandsku a

dále se rozšířila do Anglie a následně do USA. Roku 1754 získala Anglie patent na výrobu rybího klišu [21].

2.3.1.3 Vaječná pojiva

Hlavní složkou vejce je voda, která tvoří bez skořápky asi 74 %. Kromě vody je vejce tvořeno hlavně proteiny, lipidy a v malém množství organickými látkami jako například vitamíny, enzymy, kyselinami a barvivy [22].

Struktura žloutku je tvořena dvěma fázemi – plazmou a granulemi. Plazma obsahuje především lipidy (asi 75 % sušiny) a zbytek jsou hlavně proteiny. Je rozpustná ve vodě. V granulích převažují proteiny (asi 64 % sušiny) a lipidy (asi 34 % sušiny). Granule jsou rozpustné až při vyšší iontové síle [23].

Bílkoviny vaječného žloutku se většinou nenachází v čisté formě, ale tvoří komplexy se sacharidy a lipidy. Mezi významné glykoproteiny ve žloutku patří fosfovitin. Viteliny a vitelenin tvoří komplexy s fosfolipidy a řadí se mezi lipoproteiny. Lipoproteiny tvoří asi 63 % proteinů žloutku. Jsou tvořeny frakcemi různé hustoty (VLDL, LDL, HDL). Snadno podléhají denuraci. Lipidy tvoří asi 33 % sušiny žloutku, z čehož přibližně dvě třetiny připadají na acyl glyceroly a jedna třetina na fosfolipidy, steroly a cerebrosidy [22].

Bílek je z největší části tvořen vodou (kolem 87 %). Z ostatních látek převažují proteiny, dále pak sacharidy, minerální látky a ve stopovém množství lipidy. Bílek je směsí asi 40 různých typů proteinů, které strukturálně patří mezi fibrilární i globulární proteiny. Mezi sedm hlavních, nejvíce zastoupených proteinů patří ovoalbumin (54 %), ovotransferin (13 %), ovomukoid (11 %), lysozym (3,5 %), globuliny (4 %), ovomucin (2 %) a avidin (méně než 0,1%). Všechny proteiny vaječného bílku, s výjimkou lysozymu, transthyretin (TBP) a cystatinu, patří mezi glykoproteiny obsahující kovalentně vázané oligosacharidy [22].

Vaječné proteiny jsou jako pojiva používány velmi dlouho. První zmínky pocházejí již ze starého Egypta. Nejvýznamnější využití má žloutek a celé vejce ve žloutkové a vaječné temperě. Tyto tempery jsou velmi stálé vůči vodě a organickým rozpouštědlům. Samotný bílek se spíše využíval v knižních malbách (iluminacích) vzhledem k tomu, že po zaschnutí byly barevné vrstvy poměrně křehké [1].

2.4 Analýza uměleckých děl

Ke správnému restaurování uměleckých děl je zapotřebí přesně určit veškeré materiály, které umělec použil. Tyto vědomosti nám mohou posloužit nejenom k vhodné renovaci daného díla, ale také k vyloučení falsifikátů, případně napomáhají určení autora nepodepsaných či neparafovaných děl. Před vznikem moderní vědecké analýzy, při obnově uměleckých děl, se vycházelo pouze ze znalostí malířských technik, které jsou charakteristické pro dané období. Moderní chemické metody identifikace umožňují určování anorganických i organických složek barevných vrstev. Analýzu nám velmi ztěžuje vrstvení materiálů, různé směsi pojiv, nízká koncentrace sledovaných látek a v neposlední řadě také stáří přísad.

2.4.1 Metody identifikace proteinových pojiv

Jedna skupina metod identifikace pojividel jsou různé typy chromatografií. Jsou to například chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC), klasická plynová chromatografie (GC-MS nebo GC-FID) a pyrolýzní plynová chromatografie (Py-GC-MS).

Nejjednodušší, ale zároveň vhodná jen v některých případech k určení kaseinu je papírová chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Zkouška je totiž založena pouze na přítomnosti velkého množství fosforu, který kasein oproti ostatním pojivům obsahuje. Pokud je fosfor obsažený v pigmentu či jiné složce analyzovaného vzorku jsou výsledky zkresleny [24].

Ostatní chromatografie jsou založeny na sledování poměrů aminokyselin v proteinových pojivech. Nevýhodou těchto metod je nutnost poměrně velkého množství studovaného vzorku. Například pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (RP-HPLC) je zapotřebí 10–200 µg [25], pro plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) 50–100 µg [26], pro plynovou chromatografii s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) 0,5 mg [27] a pro pyrolýzní plynovou chromatografii (Py-GC-MS) jen několik mikrogramů [26]. Dalším problémem u vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a plynové chromatografie (GC) je, že vzorky vyžadují časově náročné úpravy, jako například

hydrolyzu, extrakci a derivatizaci (Maillardova reakce, přirozené chemické reakce – oxidace, prokřížení, dehydratace, kondenzace), což může způsobit ztrátu aminokyselin [28]. Mimo těchto ztrát dochází k vzájemnému ovlivňování s vápenatými, měďnatými a železitými kationty, které jsou obvyklou součástí anorganických pigmentů a složek ostatních materiálů. Tyto interferenci se mohou částečně eliminovat přidáním činidla na vyvázání kationtů Na_2EDTA [29]. Tyto metody nám pomohou identifikovat základní proteinová pojiva jako kasein, klihy a vejce, ale nerozliší, vzhledem k obdobnému aminokyselinovému složení, jednotlivé klihy jako kostní, králičí, kožní a rybí kliš [30–32].

Neinvazivní (bez odběru vzorku) metoda analýzy zkoumaného díla je infračervená spektroskopie (FTIR). Tato metoda je založena na principu, že různé chemické vazby absorbují infračervené záření různých vlnových délek, a tak mohou být rozpoznány na základě porovnání FTIR spekter s komerční databází nebo s vlastními referenčními spektry [33]. Adsorbční čáry v infračerveném spektru mohou být přiřazeny určitým funkčním skupinám v molekulách organických i anorganických látek – typickým výsledkem je tak určení základní třídy materiálu (např. lipid, protein), ne jeho bližší specifikace [34]. Pokud je dílo opatřeno svrchním ochranným lakem, je identifikace pojiva prakticky vyloučena [35].

Další nedestruktivní metodou analýzy pojiv je Ramanova spektroskopie. Tato metoda měří spektrum elektromagnetického záření rozptýleného díky Ramanově jevu. Ten způsobuje, že rozptýlené záření má nepatrně odlišnou délku od vstupujícího záření. Jako zdroj světla se obvykle používá výkonný pulzní laser [36]. Ramanova spektra se porovnávají metodou hlavních komponent (PCA) s referenční knihovnou spekter, která je dostupná na internetu [37] nebo s vlastními referenčními spektry. Touto metodou skupina vědců pod vedením prof. Austina Nevina dokázala identifikovat ve zkoumaných vzorcích některá pojiva jako například vyzinu, pergamen a hovězí kostní kliš [38].

Jednou z neinvazivních metod je také totální emisní spektrometrie založena na měření fluorescenčního elektromagnetického záření atomů v elektromagnetickém záření určitých vlnových délek po excitaci pomocí záření laditelného laseru (LIV) [36]. Tato metoda je poměrně citlivá a proto je schopná rozlišit pojiva i s malými rozdíly. Emisní spektrometrie LIV byla úspěšně vyzkoušena na identifikaci samotných proteinových pojiv a povedlo se rozlišit proteiny ve vejci a zvířecím klišu [39].

Mezi novodobější způsoby identifikace proteinových poživ patří enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent (ELISA) [40]. Tato metoda je založena na přítomnosti protilátek k určitému antigenu (Struktura, která prostřednictvím nekovalentních vazeb interaguje se specifickou protilátkou. Bílkovinné antigeny obsahují obvykle několik oblastí, na něž se váží jednotlivé protilátky [10]), což se projeví barevnou změnou [41]. Enzymovou analýzou ELISA a imunofluorescenční mikroskopií (IFM) se podařilo identifikovat vaječný albumin ve vzorku odebraném s umělecké skříňky ze 17. století [42].

Mezi velmi přesné metody hmotnostní spektrometrie patří MALDI-TOF (Matrix Assisted-Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight). Je založena na šetrné ionizaci peptidů za pomoci matrice. Peptidová směs, vzniklá specifickým štěpením pomocí enzymů, je charakterističtější pro proteinové pojivo než poměr jednotlivých aminokyselin [43]. Výhodou této metody je velmi nízká spotřeba vzorku, přibližně 5 µg [44], protože její detekční limity se pohybují v řádech pikomolů a femtomolů. Například u β-kaseinu je tento limit 18 femtomolů [45].

2.5 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

2.5.1 Historie

Profesor Tanaka zásadním způsobem přispěl k objevu metody Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), která v hmotnostní spektrometrii umožňuje převést biologické (makro)molekuly do plynné fáze bez fragmentace, přičemž náboj molekuly bývá obvykle +/- 1. Tato metodika se standardně využívá pro identifikaci proteinů, a umožnila proto prudký rozvoj proteomiky (vědní obor, snažící se identifikovat všechny bílkoviny a vysvětlit jejich funkci). V pozdních 80. letech se J. B. Fennovi podařilo zavést pro hmotnostní spektrometrii metodu, kdy molekuly jsou převedeny do plynné fáze pomocí silného elektrického pole (tzv. electrospray ionisation, ESI). Nedochozí tak k jejich fragmentaci a je možno přesně určit molekulové hmotnosti i relativně velkých biologických molekul. V roce 2002 získali japonský vědec Koichi Tanaka a americký chemik John Bennett Fenn (obr. 6)

Nobelovu cenu za vývoj nedestruujících ionizačních metod pro hmotnostní spektrometrii biologických makromolekul [10].



Obrázek 6. Koichi Tanaka a John Bennett Fenn [10].

2.5.2 Základní principy měření molekulových hmotností

Hmotnostní spektrometrie je založena na rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém/magnetickém poli. Dosavadní způsoby ionizace a detekce umožňovaly analyzovat látky jen s nízkou molekulovou hmotností (do tří tisíc). Hmotnostní spektrometrii nebylo tedy možno analyzovat látky s vyšší molekulovou hmotností. Po dvou desetiletích studia se zjistilo, že k ionizaci vzorku laserem je třeba zajistit efektivní a kontrolovatelný přenos energie na vzorek a zároveň zamezit jeho tepelnému rozkladu. Obě podmínky jsou splněny v těchto případech:

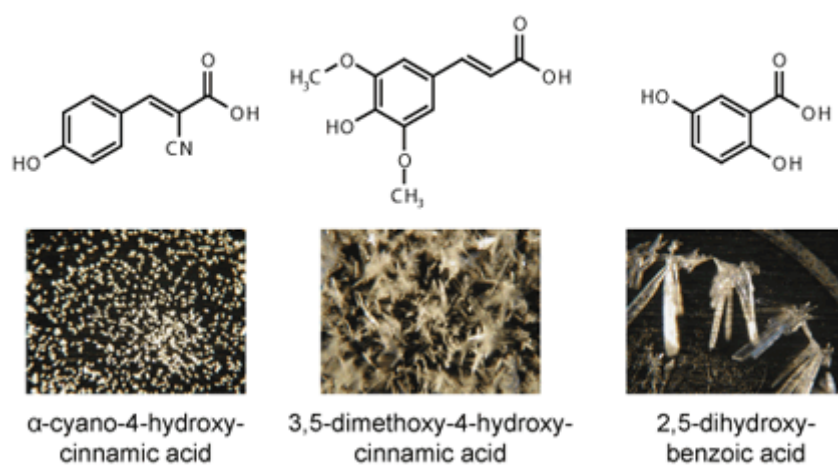
- Molekula rezonančně absorbuje při vlnové délce laseru, to znamená, že energie fotonů laseru je rovna energii potřebné k vybuzení dané molekuly a tím i k její ionizaci.
- Přenos energie se děje ve velmi krátkém čase, řádově v jednotkách až desítkách nanosekund [46].

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. Ion 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 [47].

Při použití metody Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) se nechá studovaná látka (nebo směs látek) vykristalovat na kovové podložní desce s tzv. maticí (obr. 7). Tou bývají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin, které mohou absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti [47].



Obrázek 7. Ukázky nejčastěji používaných typů matrice [47].

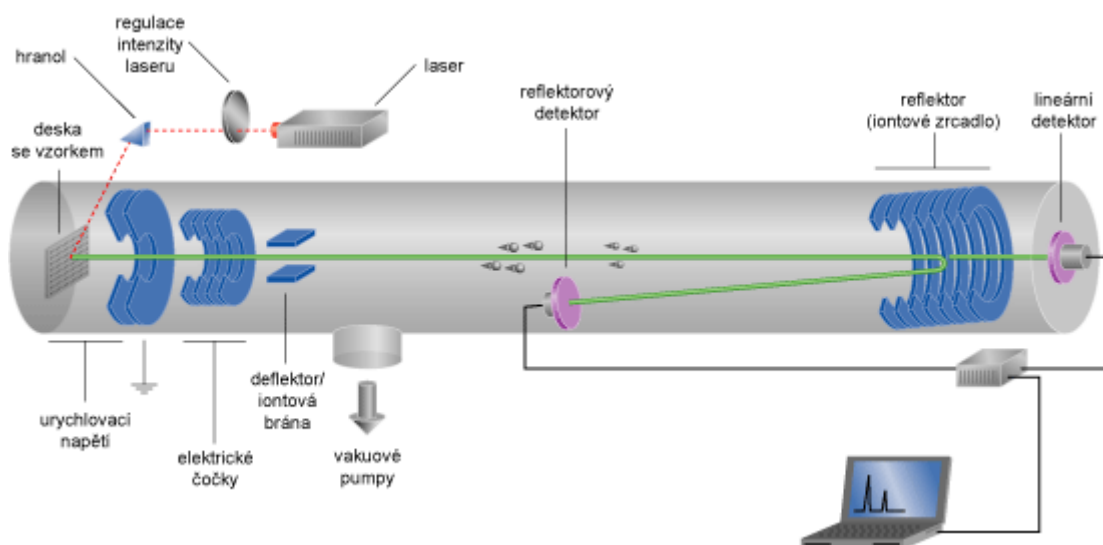
Po ozáření krystalů zábleskem laseru se látky prudce odpaří do vakua. Ionty studovaných látek se pak pohybují samostatně a jsou urychleny stejnosměrným elektrickým polem.

Možné způsoby detekce parametrů iontů, které slouží k určení jejich hmotností:

- Doba letu iontu, který byl urychlen vysokým stejnosměrným elektrickým napětím, od místa ionizace k detektoru (obr. 8). Ionty se stejným nábojem získají při průchodu elektrickým gradientem stejnou energii). Tento způsob určování hmotnosti se nazývá TOF (Time of Flight).
- Zakřivení dráhy v magnetickém poli, kolmém na pohyb iontu. Tento klasický typ detektoru využívá skutečnosti, že dráha nabitě částice se v magnetickém poli zakřivuje

tím více, čím se částice pohybuje pomaleji, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost. V nejmodernějším provedení vytváří magnetické pole supravodivý magnet; hledají se pak takové parametry pole, při nichž jsou jednotlivé druhy iontů uvedeny na stacionární kruhovou dráhu.

- Charakteristiky pohybu iontů v prostoru, tvořeném čtyřmi nabitými tyčemi. Hledá se takové rozložení elektrického pole, při němž ionty přecházejí do stacionárního vlnění; z parametrů pole lze pak určit poměr m/z jednotlivých iontů.
- Zachycení iontů v tzv. iontové pasti, tvořené prstencovou elektrodou (na kterou je přivedeno střídavé napětí) a vstupní a výstupní elektrodou (na které je přivedeno stejnosměrné napětí). Po nahromadění iontů v pasti se postupně zvyšuje střídavé napětí, což vede k postupnému vypuzení iontů o vzrůstající m/z [48].



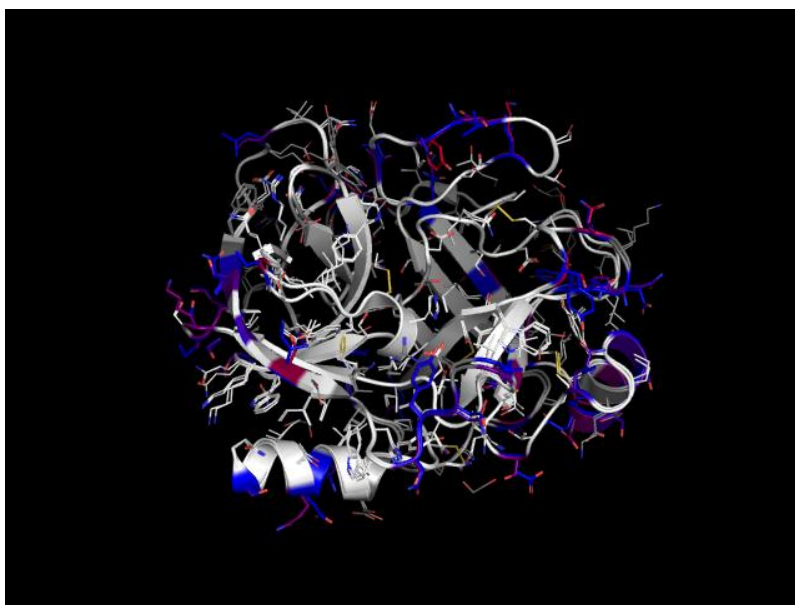
Obrázek 8. Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF [47].

Elektrická čočka a deflektor umožňují zaostřit ionty stejného poměru m/z a odklonit ty ionty, které nás v daném pokusu "nezajímají". Reflektor má stejnou elektrickou polaritu jako deska se vzorkem a obrací let iontů směrem k druhému detektoru; umožňuje zvýšit přesnost měření tím, že prodlužuje dráhu letu, a také soustředěním stejných iontů v duté části prstencovitých elektrod [47].

2.5.3 Peptidové mapování

Pouhé stanovení molekulové hmotnosti proteinu není dostačující pro jeho přesné určení. S vysokou přesností a relativně spolehlivě a snadno můžeme identifikovat proteiny pomocí peptidového mapování (PMF). Tato metoda je známá již od roku 1956, kdy stanovil první peptidové mapy profesor Vernon M. Ingram [49]. Analyzovanou bílkovinu je nutné rozštěpit na menší fragmenty. Aby proběhlo úplné a reprodukovatelné štěpení, musíme většinou bílkovinu denaturovat, čímž se rozštěpí její disulfidové můstky a alkylují se thiolové skupiny. Po té lze provést štěpení buď enzymaticky nebo chemickými činidly. Nejčastěji využívanými enzymy jsou trypsin, pepsin, chymotrypsin atd.

- Trypsin (EC 3.4.21.4) (obr. 9) je pankreatická serinová proteáza, která štěpí proteiny za lysinem a argininem. Tato reakce neprobíhá, pokud je následující zbytek prolin. Trypsin není inaktivován přítomností vápníku ani jiných kovů [50]. Štěpení bílkoviny trypsinem probíhá při pH 7–9 [51].



Obrázek č. 9. Schématické zobrazení prostorového uspořádání trypsinu [52].

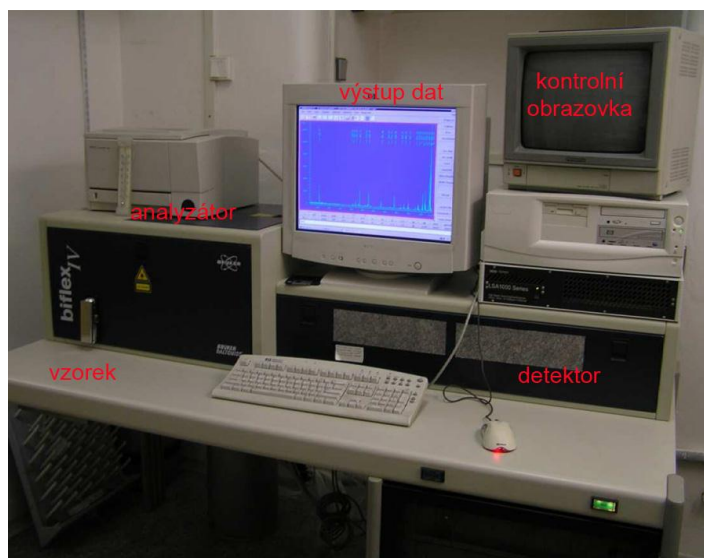
- Pepsin (EC 3.4.23.1) je proteolytický enzym složený z 306 aminokyselin. Tvoří se v buňkách žaludeční stěny obratlovců jako proenzym pepsinogen [53]. Tento enzym

hydrolyzuje peptidové vazby za aromatickými aminokyselinovými zbytky a leucinem. Následuje-li prolin, není vazba štěpena [49]. Optimální pH reakce je 1,5–2,5 [51].

- Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) je serinová proteináza vylučovaná slinivkou břišní a působící v tenkém střevě. Tento enzym štěpí peptidy a bílkoviny na karboxylové straně tryptofanu, tyrosinu, fenylalaninu, leucinu a metioninu. Jako u předešlých enzymů ani zde nenastává štěpení vazeb, následuje-li prolin [49]. Reakce probíhá při pH 7,8 [51].

Po naštěpení bílkovin je potřeba peptidové štěpy izolovat. To je možné například pomocí mikrokolon Zip Tip, což jsou vlastně speciální 10 µl špičky (nástavce) na automatické pipety, které obsahují reverzní fázi C18. Na reverzní fázi se zachycují hydrofobní biomakromolekuly a ostatní látky zůstávají v roztoku. Z mikrokolony se dají nežádoucí látky vymýt. Chromatografické médium se nakonec promyje elučním roztokem a tím se uvolní izolované peptidové štěpy [54].

Směs peptidových štěpů se poté analyzuje například hmotnostní spektrometrií pracující na principu MALDI-TOF (obr. 10). Hmotnosti peptidů odečtené ze spektra se zanesou do tabulky a porovnájí se s daty obsaženými v proteinových databázích pomocí speciálních programů [55].



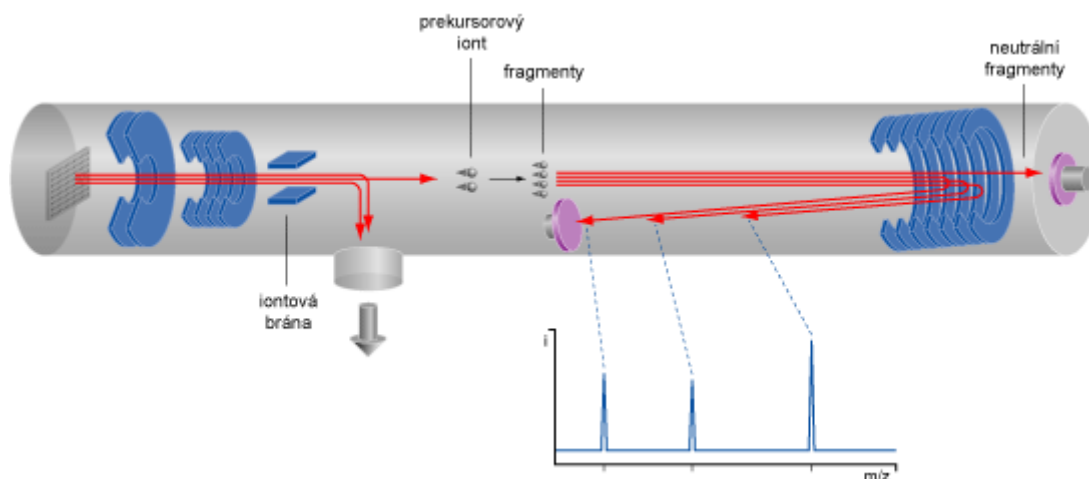
Obrázek 10. Fotografie hmotnostního spektrometru MALDI-TOF typ Biflex IV na VŠCHT (autor: Štěpánka Kučková).

2.5.4 Sekvenování bílkovin a peptidů

Relativně přesné určení hmotnosti peptidů nebo bílkovin také nic nevyovídá o jejich kovalentní struktuře. Tu lze zjistit sekvenováním polypeptidu (obsahují více než 25 aminokyselin) pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) tak, že peptidu, jehož sekvenci chceme určit, je dodána energie, která vyvolá fragmentaci, a následně je změřeno hmotnostní spektrum fragmentů. Protože většina peptidů a proteinů jsou lineární polymery, přerušením jediné kovalentní vazby v řetězci vznikají různé typy iontů v závislosti na místě přerušení peptidového řetězce. Vznikají tak samozřejmě dvě částice, obsahující N- a C-koncovou část peptidu. K tomu, aby byla vzniklá částice detekována, je třeba, aby nesla alespoň jeden náboj.

Při fragmentaci však může dojít k přerušení i více než jedné peptidové vazby; vznikají tak tzv. interní fragmenty. Zvláštním typem interních fragmentů jsou tzv. immoniové ionty, obsahující pouze jedinou aminokyselinu. Přítomnost těchto iontů ve spektru jednoznačně potvrzuje výskyt dané aminokyseliny v sekvenovaném peptidu.

Jednou z možností získání sekvence peptidů je použití spektrometru na principu MALDI-TOF (obr. 11). Ten 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 (iontová brána, ion gate, deflektor), který ze směsi peptidů (prekurzorů) vybere ten, jehož sekvenci chceme určit. K 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 detektoru [56].



Obrázek 11. Schéma sekvenování peptidů spektrometrem MALDI-TOF metodou post-source decay [56].

PSD spektra obvykle obsahují jen některé fragmenty a immoniové ionty jednotlivých aminokyselin. Fragmentace však nebývá úplná, jednotlivé série iontů jsou tedy nekompletní a interpretace spekter poměrně obtížná. K překonání této nesnáze byly vyvinuty nejrůznější metody např. štěpení proteinu v roztoku, do kterého byla přidána deuterovaná voda. Jinou cestou je navázání skupiny nesoucí náboj na N- nebo C-konec peptidů [56].

2.5.5 Studium prostorového uspořádání

Byla popsána řada metodik, které umožňují pomocí hmotnostní spektrometrie studovat jisté charakteristiky prostorového uspořádání bílkovin. Hmotnostní spektrometrie pochopitelně nemůže poskytnout tak komplexní informace, aby bylo možno vytvořit trojrozměrný model neznámé bílkoviny, lze však poměrně jednoduše získat některé velmi cenné, byť dílčí strukturální údaje; zejména lze poměrně spolehlivě zjistit, které aminokyselinové zbytky jsou na povrchu bílkovinné globule a zmapovat tak její povrch.

Díky velké přesnosti určování molekulových hmotností lze sledovat rychlost výměny vodíku za deuterium v případě, že je do roztoku přidána těžká voda. Opět se předpokládá, že k této výměně dochází jen u těch skupin, které jsou v kontaktu s rozpouštědlem a nejsou

pohřbeny uvnitř bílkovinné částice. Informaci o kvarterní struktuře bílkovin lze získat přímým měřením molekulové hmotnosti nativní bílkoviny. Využívá se zde většinou ionizace metodou ESI, která umožňuje měřit molekulové hmotnosti makromolekulárních látek přímo z roztoku [57].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie a pomůcky

Trypsin TPCK	Promega Corporation
Trifluoroctová kyselina	Sigma
2,5-dihydroxybenzoová kyselina	Sigma
ZipTip C18	Millipore Corporation

3.1.2 Složení promývacích roztoků

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

3.1.3 Referenční materiál

Želatina (PedF UK, původ neznámý), králičí kliš (Deffner&Johann, spol. s.r.o.), kasein (Deffner&Johann, spol. s.r.o.), CaCO₃ (Reachim, p.a.), TiO₂ (PedF UK, původ neznámý), As₂S₃ (PedF UK, původ neznámý), CdS (PedF UK, původ neznámý), HgS (PedF UK, původ neznámý), Fe₂O₃ (Lachema Brno), Cr₂O₃ (Polskie Od CZYnniky Chem-Gliwice), Cu(CH₃COO)₂.H₂O (Lachema Brno), Cu(CH₃COO)₂.3Cu(AsO₂)₂ (Deffner&Johann, spol. s.r.o.), CaSO₄.2H₂O (Lachema Brno), KAl(SO₄)₂.12H₂O (Lachema Brno), lněný olej (UMTON Barvy, Děčín).

3.1.4 Příprava modelových vzorků

3.1.4.1 Příprava podkladové vrstvy

Podklad v modelových vzorcích barevných vrstev byl připraven smícháním dvou objemových dílů boloňské křídly ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a jednoho objemového dílu roztoku vzniklého rozpuštěním želatiny (80 g) ve vodě (1000 ml). Pak byly provedeny dvě vrstvy nátěru na smrková dřívka o rozměrech 10,5 x 3,5 x 1,5 cm. Po zaschnutí byl podklad zbroušen a na podklad byla nanесena izolační vrstva z 235 ml želatinové vody (4%) a 2,3 g kamence ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Izolační vrstvu bylo nutné aplikovat ještě vlažnou. Izolace byla nanесená ve dvou vrstvách [1].

3.1.4.2 Příprava kaseinové olejové tempery

100 objemových dílů vody	100 ml
40 objemových dílů kaseinu	24,4 g
40 objemových dílů lněného oleje	40 ml
3,2 objemových dílů 24% vodného roztoku čpavku	3,2 ml

Tuto směs bylo nutné zahřát a propasírovat přes sítko. K základní směsi kaseinové tempery byly přidány jednotlivé pigmenty (tab. I), tak aby připravené směsi měly vhodnou konzistenci a bylo možné s nimi dále pracovat. U měděnky a železité červeně bylo nutné temperu naředit malým množstvím vody. Tempera s měděnkou ještě utvořila hrudky, které byly rozetřeny v třecí misce. Na podkladovou vrstvu na dřívkách byly pětkrát nanесeny barevné vrstvy [1].

Tabulka I. Příprava modelových barevných vrstev s kaseinovou olejovou temperou.

Pigmenty	Navážka pigmentu (g)	Navážka kaseinové olejové tempéry (g)
CaCO_3	2,5	6,0
$2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb(OH)}_2$	2,5	10,0
TiO_2	2,5	10,0
As_2S_3	2,5	10,0
CdS	2,5	10,0
HgS	2,5	10,0
Fe_2O_3	2,5	10,0
Cr_2O_3	2,5	7,0
$\text{Cu(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,5	10,0
$\text{Cu(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot 3\text{Cu(AsO}_2)_2$	3,0	10,0

3.1.4.3 Příprava klišové tempery

Králičí kliš (20 g) se nechal bobtnat v destilované vodě (200 ml) do druhého dne, kdy se rozpustil ve vodní lázni. Následně byl rozpuštěný kliš smíchán s pigmenty (tab. II), a takto připravená vlašná tempera se nanasla na podkladovou vrstvu na dřívkách [58].

Tabulka II. Příprava modelových barevných vrstev s klišovou temperou.

Pigmenty	Navážka pigmentu (g)	Navážka klišové tempery (g)
CaCO_3	3,0	18,0
$2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb(OH)}_2$	3,0	18,0
TiO_2	3,0	18,0
As_2S_3	3,0	18,0
CdS	3,0	18,0
HgS	3,0	18,0
Fe_2O_3	3,0	18,0
Cr_2O_3	3,0	18,0
$\text{Cu(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,0	18,0
$\text{Cu(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot 3\text{Cu(AsO}_2)_2$	3,0	18,0

3.2 Zahušťování a přečištění peptidových štěpů na reversní fázi

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

3.3 Analýza vzorků pomocí MALDI-TOF MS

Štěpení proteinů trypsinem bylo provedeno za použití štěpícího roztoku (2,0 μl trypsinu o koncentraci 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ve 100 μl 50 mmol/l roztoku NH_4HCO_3 o pH přibližně 7,5). Ke vzorkům bylo přidáno 10,0 μl štěpícího roztoku tak, aby v něm byly ponořeny. Štěpení probíhalo v uzavřených mikrozkuřkách po dobu dvou hodin.

2,4 μl naštěpeného vzorku bylo smícháno 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). 1,2 μl takto upraveného vzorku bylo nanášeno na dva spoty na ocelové vzorkovací destičce. Na destičce se nechaly vzorky vykřystalizovat. Po zaschnutí se vzorkovací destička umístila do hmotnostního spektrometru Bruker-Daltonics Biflex IV MALDI-TOF. Tento přístroj je vybaven dusíkovým laserem (337 nm) a měření probíhalo v reflektorovém modu. Přístroj byl pro každé měření externě kalibrován peptidovou směsí Mh Pepmix (2 μl Mh Pepmix + 4 μl DHB). Každé hmotnostní spektrum bylo vytvořeno alespoň 270 laserovými pulzami. Spektra byla zobrazena pomocí softwaru Bruker Flex III a Bruker XTof.

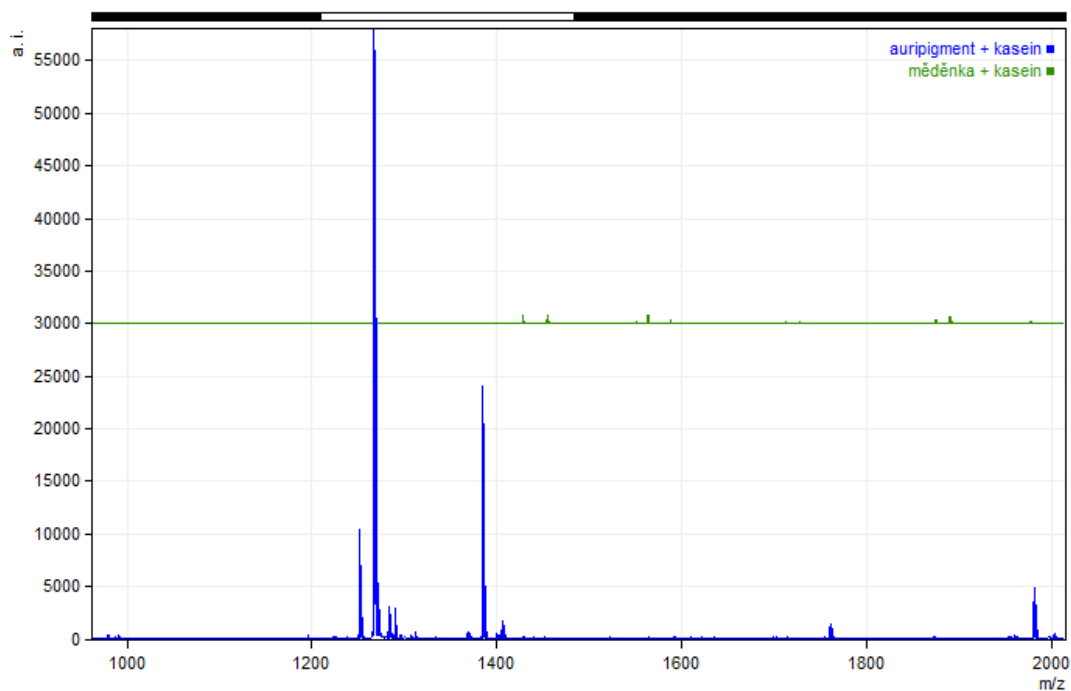
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Modelové vzorky, které byly připraveny smícháním kaseinové olejové tempery a klišové tempery s deseti různými anorganickými pigmenty, byly zkoumány metodou peptidového mapování. Po zaschnutí temper s pigmenty byly odebrány vzorky, které se nechaly dvě hodiny štěpit enzymem trypsinem. Peptidové štěpy byly izolovány pomocí mikroextrakce na reverzní fázi (TipTip C18) a analyzovány hmotnostní spektrometrií pracující na principu MALDI-TOF. Naměřená spektra byla vyhodnocena pomocí programu mMass. U všech vzorků byly hodnoty m/z naměřeny alespoň pětkrát. Z naměřených hodnot byly získány relativní intenzity m/z . Veškeré hodnoty relativní intenzity u jednotlivých peptidů a pigmentů byly zaneseny do tabulek. Z těchto tabulek byly posléze eliminovány hodnoty m/z , které se vyskytovaly v méně než 80 % (tabulky III a IV).

Tabulka III. Píky vyskytující se v hmotnostních spektrech kaseinové tempery. Nalezené hodnoty m/z peptidových štěpů s přiřazenými intenzitami nalezených v barevných vrstvách pojených kaseinovou olejovou temperou. Hodnoty m/z jsou uvedeny s přesností $\pm 0,2$ Da. (x – nízká intenzita, xx – střední intenzita, xxx – vysoká intenzita signálu).

Pigmenty m/z	2PbCO₃. Pb(OH)₂	CaCO₃	CdS	Cu(CH₃COO)₂. H₂O	Fe₂O₃	Cr₂O₃	Cu(CH₃COO)₂. .3Cu(AsO₂)₂	As₂S₃	HgS	TiO₂
979,6	x	xx	x		x	x	x	xx	x	
987,1	x	x	x		x	x		x	x	x
1137,6	x	x		x	xx	x	xx	x	xx	
1195,6	xx	x	xx	xx	xx	x	xx	xx	xxx	xx
1251,7	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx
1267,7	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1283,7	xx	x	xxx	x	xx	xx	xx	xxx	xx	xx
1289,7		x	xx		xx	xx	x	xxx	xx	xx
1307,7	x	x	x		x	x		x	x	x
1367,7	x	x	xx		xx	x	x	xx	x	x
1384,7	xxx	x	xxx	xx		xxx	xxx	xxx		xxx
1400,8	x	x	x	x	x	x		x		x
1406,7	x	x	xx			x	x	xx	xx	xx
1592	x	x	xx	x	xx	xx	x	xx	x	xx
1760	xxx		xxx	x	xxx	xx	xx	xxx	xxx	xxx
1952	xx	x	xx		xx	xx	x	xx	xx	xx
1980	xx	xx	xxx	x	xxx	xx	xx	xxx	xxx	xxx

Z tabulky III jednoznačně vyplývá, že nejméně kvalitní spektra s kaseinovou olejovou temperou poskytl pigment měděnky $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{Cu}(\text{OH})_2]$ a svinibrodské zeleně $[\text{Cu}(\text{CHCOO})_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2]$. Nejvyšší kvalitu spektra naopak má auripigment (As_2S_3) a kadmiová žluť (CdS). Pro porovnání kvality hmotnostních spekter měděnky a auripigmentu s kaseinovou olejovou temperou je přiložen obrázek číslo 12.

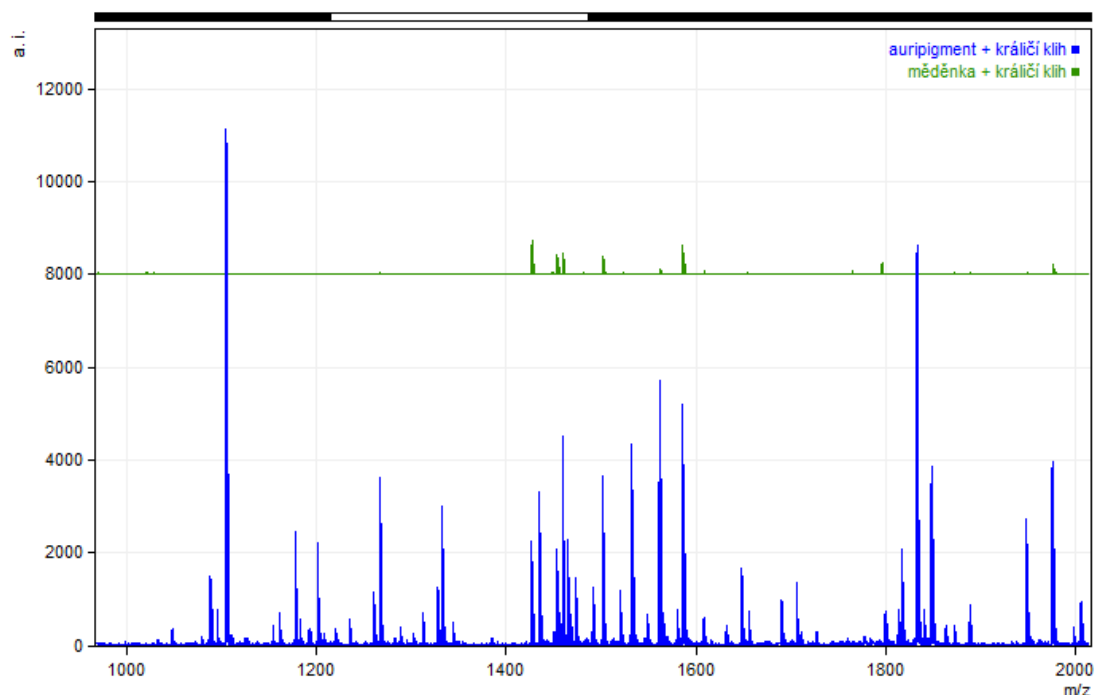


Obrázek 12. Spektra kaseinové olejové tempéry smíchané s As_2S_3 (modré spektrum) a $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{Cu}(\text{OH})_2]$ (zelené spektrum).

Z tabulky IV je patrné, že měděnka $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{Cu}(\text{OH})_2]$ s klišovou temperou opět poskytuje nejméně kvalitní spektra. Výrazně lepší spektra poskytuje klišová tempera s plavenou křídou (CaCO_3), kadmiovou žlutí (CdS), auripigmentem (As_2S_3) a titanovou bělobou (TiO_2). Porovnání kvality hmotnostních spekter klišové tempéry s měděnkou a auripigmentem je vidět na obrázku číslo 13.

Tabulka IV. Píky vyskytující se v hmotnostních spektrech klišové tempery. Nalezené hodnoty m/z peptidových štěpů s přiřazenými intenzitami nalezených v barevných vrstvách pojených kaseinovou olejovou temperou. Hodnoty m/z jsou uvedeny s přesností $\pm 0,2$ Da. (x – nízká intenzita, xx – střední intenzita, xxx – vysoká intenzita signálu).

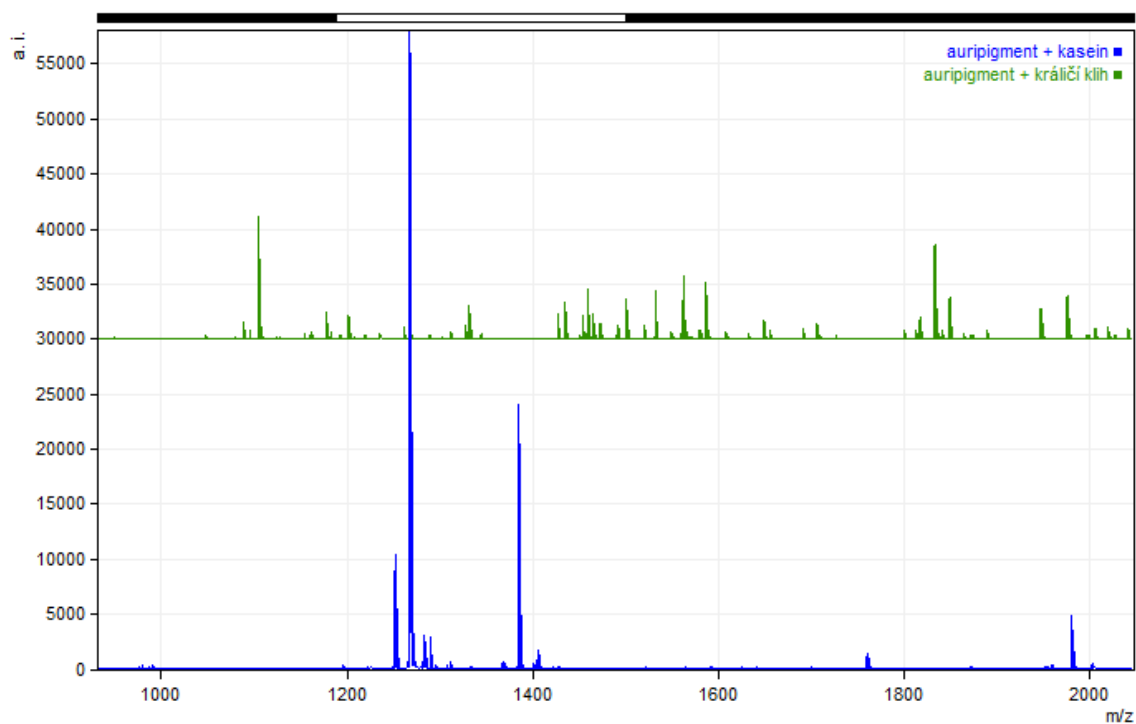
Pigmenty m/z	2PbCO₃ · Pb(OH)₂	CaCO₃	CdS	Cu(CH₃COO)₂ · H₂O	Fe₂O₃	Cr₂O₃	Cu(CH₃COO)₂ · 3Cu(AsO₂)₂	As₂S₃	HgS	TiO₂
1105,4	x	x	x	x		x		x	x	xxx
1267,4	x	x	x	xx	xxx	xxx	xx	x	x	xx
1312,4	x	x	xx		x	xx	x	xx	x	x
1328,4	x	x	xx		x	xx	x	xx	x	x
1427,6	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1453,6	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1469,6	x	xx	xx		x	xx	xx	xx	xx	xx
1562,6	xx	xxx	xxx	xx	xx	xxx	xx		xx	xxx
1586,6		xxx	xxx	xx	xx	xxx	xx	xxx		xxx
1710,6	xxx	xxx	xxx	x	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1726,6	xxx	xxx	xxx		xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1872,7	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1888,7	xxx	xxx	xxx	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
1975,7	x	xx	x	xxx	x	xx		xx	xx	xxx



Obrázek 13. Spektra klišové temperry smíchané s As_2S_3 (modré spektrum) a $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{Cu}(\text{OH})_2]$ (zelené spektrum).

Na obrázku číslo 14 je vidět srovnání nejlepších hmotnostních spekter kaseinové a klišové temperry a auripigmentem (As_2S_3). Jednotlivá spektra se od sebe navzájem liší nejen pozicí píků, ale také množstvím píků. V pozici s hodnotou m/z , po zaokrouhlení na celá čísla, dochází k překryvu v místě 1267. Proto tento pík nemůžeme považovat za charakteristický ani pro jedno proteinové pojivo. Podle umístění charakteristických píků lze rozlišit proteinová pojiva v temperách. Větší počet průkazných peptidových štěpů u kaseinu (17 píků) než u králičího klišu (14 píků) může být způsoben menší reaktivitou kaseinových proteinů s kovovými ionty, které jsou obsaženy v anorganických pigmentech, a tím pádem nebylo ovlivněno natolik trypsinové štěpení.

S oběma pojivy vychází nejméně výrazná hmotnostní spektra s pigmenty obsahující měďnaté kationty, které podle publikace Michaela Greena a Hanse Neurtha [59] působí jako enzymové inhibitory trypsinu. Také mé výsledky u kvalitních spekter dvojmocných kationtů kovů (Cd^{2+} , Ca^{2+}) se shodují s touto prací, podle níž tyto kationty kovů zvyšují aktivitu trypsinu [59].



Obrázek 14. Spektra kaseinové olejové tempéry smíchané s As_2S_3 (modré spektrum) a křehové tempéry smíchané s As_2S_3 (zelené spektrum).

5. ZÁVĚR

Hlavním úkolem této diplomové práce bylo připravení modelových vzorků barevných vrstev kaseinové olejové tempéry a klišové tempéry s deseti anorganickými pigmenty (plavenou křídou, olovnatou bělobou, titanovou bělobou, auripigmentem, kadmiovou žlutí, rumělkou, železitou červení, chromoxidem bezvodým, měděnkou a svinibrodskou zelení). Dále pak získat hmotnostní spektra modelových vzorků za pomoci metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Tato spektra poté vyhodnotit metodou peptidového mapování a přiřadit jim relativní intenzitu m/z .

Z těchto výsledků je patrné, že kasein je charakterizován šestnácti peptidovými štěpy (979,6; 987,1; 1137,6; 1195,6; 1251,7; 1283,7; 1289,7; 1307,7; 1367,7; 1384,7; 1400,8; 1406,7; 1592,0; 1760,0; 1952,0; 1980,0), zatímco pro králičí kliš je průkazných třináct píků (1105,4; 1312,4; 1328,4; 1427,6; 1456,6; 1469,6; 1562,6; 1586,6; 1710,6; 1726,6; 1872,7; 1888,7; 1975,7). Na základě rozdílnosti charakteristických hodnot m/z lze touto metodou s jistotou rozlišit mléčné a kolagenové pojiva používané v barevných vrstvách uměleckých děl. Naměřené hodnoty m/z také rozšířily knihovnu referenčních spekter proteinových pojiv na VŠCHT.

Při analýze modelových vzorků bylo zjištěno, že měďnaté kationty (Cu^{2+}) nejvíce ovlivnily štěpení mléčného i kolagenového pojiva. Nejmenší vliv na štěpení králičího klišu a kaseinu měly překvapivě kationty těžkých kovů a to kadmínové (Cd^{2+}) a arsenité (As^{3+}).

V budoucnu by bylo zajímavé tyto výsledky ověřit na reálných vzorcích z uměleckých děl a snížit vliv měďnatých kationtů na trypsinové štěpení kaseinu a králičího klišu, které je nezbytné ke správné identifikaci proteinového pojiva v barevných vrstvách metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Tento vliv by mohl být snížen například přidáním chelatačního činidla (EDTA) ke vzorku.

6. LITERATURA

- [1] Slánský B.: Technika malby, díl I: Malířský a konzervační materiál. Paseka, Praha, 2003.
- [2] www.geology.cz (17. 8. 2011, autor: Česká geologická služba)
- [3] Šimůnková E., Bayerová T.: Pigmenty. Společnost pro technologie opravy památek - STOP, 1999.
- [4] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kokolitky> (4. 2. 2012)
- [5] Štengl V.: Kouzelný oxid titaničitý. Jak se zbavit toxických látek. *Vesmír* 87, 402, (2008/6).
- [6] Ziegler V.: Základy mineralogie a petrologie pro studenty Pedagogické fakulty. Praha, 2003.
- [7] Jirásek J., Vavro M.: Nerostné suroviny a jejich využití. Ostrava: Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy ČR & Vysoká škola báňská-Technická univerzita Ostrava, 2008.
- [8] Smith R.: Encyklopedie výtvarných technik a materiálů. Praha, Slovart 2000.
- [9] Plinius Starší: Kapitoly o přírodě. Svoboda, 1974.
- [10] Kodíček M.: Biochemické pojmy: výkladový slovník. Praha: VŠCHT Praha, 2007.
- [11] Walzem R. L.: Health enhancing properties of whey proteins and whey fractions. In *Manuals, Guides & Monographs*. Arlington: U. S. Dairy Export Council, 1999.
- [12] <http://futurologie.czweb.org/archiv2003/spektrum1a.htm> (25. 1. 2012, autor: Miloslav Kaláb)
- [13] <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92329> (30. 10. 2011, autor: Informační centrum bezpečnosti potravin)
- [14] <http://www.hypro.cz/hyRubrIn.aspx?intRubrKis=1251&intLang=0> (29. 11. 2011, autor: Hypro Otrokovice, s.r.o.)
- [15] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kolagen#Vy.C5.BEit.C3.AD> (29. 11. 2011)
- [16] <http://www.naturalpigments.com/education/article.asp?ArticleID=111> (13. 1. 2012)
- [17] <http://www.patentstorm.us/patents/5780047/fulltext.html> (13. 1. 2012, autor: Kao Corporation)
- [18] Dobrovolný B., Andrlík K., Hoch A. A.: Malý technický naučný slovník. Praha, SNTL 1959.

- [19] Losos L.: Pozlacení a polychromie. Grada Publishing a.s., 2005.
- [20] Kubička R., Zelinger J.: Výkladový slovník, str. 320, Grada 2004.
- [21] http://fast10.vsb.cz/odk/prednasdk/ODPK_AL_04.pdf (28. 3. 2011, autor: Doc. Ing. Antonín Lokaj, Ph.D.)
- [22] Hrabě J., Březina P., Valášek P.: Technologie výroby potravin živočišného původu. Zlín: UTB, 2008.
- [23] Březina P., Komár A., Hrabě J.: Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin 2. Vyškov, 2001.
- [24] Slánský B.: Technika malby, díl II: Malířský a konzervační materiál. Paseka, Praha, 2003.
- [25] Grzywacz C. M.: Identification of proteinaceous binding media in paintings by amino-acid-analysis using 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization and reversed-phase high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr. A* 676, 177–183 (1994).
- [26] 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).
- [27] Mateo-Castro R., Gimeno-Adelantado J.V., Bosch-Reig F., Doménech-Carbó A., Casas-Catalán M.J., Osete-Cortina L., De la Cruz-Canizares J., Doménech-Carbó M.T.: Identification by GC-FID and GC-MS of amino acids, fatty and bile acids in binding media used in works of art. *Fresenius J. Anal. Chem.* 369, 642–646 (2001).
- [28] Colombini M.P., Modungo F.: Characterisation of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques. *J. Sep. Sci.* 27, 147–160 (2004).
- [29] 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).
- [30] 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).
- [31] 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).

- [32] Ciliberto E., Spoto G.: *Modern Analytical Methods in Art and Archeology*. Willey-Interscience, New York, 2000.
- [33] Kůrková H.: Příprava modelových vzorků s organickými barvivy podle historických receptů. Diplomová práce, Praha, 2004.
- [34] http://www.techartis.cz/TA_2006/6_Domenech/6_Domenech.htm (6. 7. 2008, autor: María Teresa Doménech-Carbó, Antonio Doménech-Carbó, Laura Osete-Cortina, Juana de la Cruz-Cañizares)
- [35] http://www.techartis.cz/TA_2006/3_Hradil/3_Hradil.htm (6. 7. 2008, autor: David Hradil, Igor Fogaš, Constanza Miliani, Claudia Daffara)
- [36] <http://www.labo.cz/sl/vy14.htm#p205> (25. 2. 2012, autor: agentura REMION)
- [37] <http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/specplib.html> (10. 11. 2008, autor: Department of Chemistry – University College London)
- [38] Nevin A., Osticioli I., Anglo D., Burnstock A., Cather S., Castellucci S.: Raman Spectra of Proteinaceous Materials Used in Paintings: A Multivariate Analytical Approach for Classification and Identification. *Anal. Chem.* 79, 6143–6151 (2007).
- [39] Nevin A., Comelli D., Valentini G., Anglos D., Burnstock A., Cather S., Cubeddu R.: Time-resolved fluorescence spectroscopy and imaging of proteinaceous binders used in paintings. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 1897–1905 (2007).
- [40] Tokarski C., Martin E., Rolando C., Olivé C., Identification of Proteins in Renaissance Paintings by Proteomics. *Anal. Chem.* 78, 1494–1502 (2006).
- [41] Chromý V.: *Bioanalytika: analytická chemie v laboratorní medicíně*. Masarykova univerzita, Brno 2002.
- [42] 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), 89–105 (2006).
- [43] Hynek R., Kuckova S., Hradilova J., Kodicek 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 Commun. Mass Spectrom.* 18, 1–5 (2004).
- [44] Kuckova S., Grygar T., Hradil D., Hradilova J.: *J. Solid State Electr.* 7, 706–713 (2003).

- [45] Ma Y., Lu Y., Zeng H., Ron D., Mo W., Neubert T.A.: Characterization of phosphopeptides from protein digests using matrix-assisted laser desorption/ionization Time of flight mass spectrometry and nanoelectrospray quadrupole time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1693–1700 (2001).
- [46] Havliš, J.: Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* 78, 448, (1999/8).
- [47] <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php> (10. 11. 2008)
- [48] Kaš J., Kodíček M., Valentová O.: Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. VŠCHT v Praze, Praha 2006.
- [49] Vaňková H.: Peptidové mapy. *Chem. Listy* 93, 120–127 (1999).
- [50] <http://195.178.65.132/images/files/MCK/Pribram08/kuckova.pdf> (1. 11. 2008, autor: Ing. Mgr. Štěpánka Kučková, Ph.D)
- [51] 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).
- [52] http://www.pymolwiki.org/index.php/Color_By_Mutations (24. 2. 2012)
- [53] <http://www.biopro.cz/Diagnostika/Pepsin/> (7. 11. 2011 autor: O. K. SERVIS BioPro, s.r.o.)
- [54] <http://www.millipore.com/userguides.nsf/docs/p36110> (18. 11. 2007)
- [55] <http://chemi.muni.cz/~preisler/courses/Lab%20Cv%20MALDI.pdf> (15. 10. 2011)
- [56] <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/sequencing.php> (10. 11. 2008)
- [57] <http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/3dstructure.php> (10. 11. 2008)
- [58] Massey R.: *Formulas for painters*. Watson-Guption Publications, 1967.
- [59] Green M., Neurath H.: The effect of divalent cations on trypsin. *J. Biol. Chem.* 342, 379–390 (1953).

7. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
ESI	Electrospray Ionization (metoda tvorby iontů)
ELISA	Enzyme-Linked Imuno Sorbent Assay (enzymová imunoanalýza s vázaným enzymem na imunosorbent)
FTIR	Fourier-Transform Infrared (infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací)
GC	Gas Chromatography (plynová chromatografie)
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionisation Detektor (plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem)
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry (plynová chromatografie)
HDL	High Density Lipoproteins (lipoproteiny s vysokou hustotou)
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
IFM	Immunofluorescence Microscopy (imunofluorescenční mikroskopie)
LDL	Low Density Lipoproteins (lipoproteiny s nízkou hustotou)
LIV	Laser Induced Fluorescence (laserem indukovaná fluorescence)
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight Mass Spectrometry
PCA	Principal Component Analysis (metoda hlavních komponent)
PMF	Peptide Mass Fingerprinting (peptidové mapování)
PSD	Post Source Decay (pozdní rozpad)
Py-GC-MS	Pyrolysis-Gas Chromatography Mass Spectrometry (pyrolýzní plynová chromatografie)
RP-HPLC	Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tzv. obrácenými fázemi)
TBP	Thyroxin Binding Prealbumin (transportní protein)
TLC	Thin Layer Chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
TOF	Time Of Flight (doba letu částice)
VLDL	Very Low Density Lipoproteins (lipoproteiny o velmi nízké hustotě)