

FORUM / 2022 / ROČ. XII / Č. 1

PRO KONZERVÁTORY-RESTAURÁTORY FORUM FOR CONSERVATORS-RESTORERS

2022 / Vol. XII / No. 1
Peer-reviewed open access journal

Chief editor: Ing. Alena Selucká
Editors: Mgr. Pavla Stöhrová, Mgr. Jana Fricová

Editorial Board:

Ing. Ivo Štěpánek (Head of Editorial Board)
doc. Dr. Ing. Michal Ďurovič
akad. mal. Igor Fogaš
Ing. Pavel Jirásek
Ing. Jan Josef
doc. akad. soch. Petr Kuthan
prof. RNDr. Jiří Příhoda, CSc.
Ing. Radka Šefců
Mgr. Pavla Stöhrová (Secretary)

Open access since 2019 available for free
on <https://mck.technicalmuseum.cz/casopis-fkr/>
The journal is indexed and abstracted in EBSCO.

Published by:

Technické muzeum v Brně
Purkyňova 105, 612 00 Brno, Czech Republic

Contact for communication:

fricova@tmbrno.cz / stohrova@tmbrno.cz / selucka@tmbrno.cz

© Technické muzeum v Brně, 2022
ISSN (Online) 2571-4384
ISSN (Print) 1805-0050



ANALÝZA KREVNÍCH NÁTĚRŮ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

Tadeáš Matěcha¹ • Tomáš Dostál² • Luděk Dvořák²
Štěpánka Kučková^{1,3}

1 Katedra chemie a didaktiky chemie, Pedagogická fakulta UK
2 Národní muzeum v přírodě, Valašské muzeum v přírodě
3 Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Bc. Tadeáš Matěcha je studentem Univerzity Karlovy, konkrétně 1. ročníku magisterského studia učitelství chemie a matematiky pro 2. stupeň základní školy a střední školy, školského managementu. Mimo jiné je vášnivým popularizátorem vědy. (tadeasmatecha@gmail.com)

Krevní nátěry byly v minulosti často užívaným materiálem, který byl však v mnoha písemných pramenech opomíjen z důvodu jeho všednosti. Vzhledem k absenci souvislých historických poznatků vývoje v této oblasti není příliš známé, ve kterých lokalitách a na jakých konkrétních historických objektech se krevní nátěry nachází. Z těchto důvodů je klíčová jejich analýza. Cílem této práce bylo zjistit proteinové složení 24 modelových vzorků nátěrů na dřevě pomocí nanokapalinové chromatografie spojené s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu (nano-LC-ESI-Q-TOF MS). Výsledky analýz byly porovnány s proteinovou databází rostlinných a živočišných proteinů (UniProt) a identifikované charakteristické proteiny byly konfrontovány s původními látkami, ze kterých byly krevní nátěry připraveny. Stejnou metodou byl analyzován i vzorek krevního nátěru z chalupy z Horní Bečvy z konce 18. století.

Klíčová slova: historické objekty, hmotnostní spektrometrie, krev, krevní nátěry, proteiny

ANALYSIS OF BLOOD COATINGS BY MASS SPECTROMETRY

In the past, blood coatings were often used not only for aesthetics but also as a functional material, which, however, was neglected in many written sources as a consequence of their mundaneness. The clarity of the location and historical objects blood coatings are on, is hindered due to the absence of historical knowledge in this field. For these reasons, their analysis is crucial. The goal of this work was to analyse the protein composition of 24 model blood coatings on wood using nano-Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Quadrupole – Time of Flight Mass Spectrometry (nano-LC-ESI-Q-TOF MS). The results were compared with a worldwide protein database of plant and animal proteins (UniProt), and the obtained particular proteins, were compared to the original substances from which the blood coatings were prepared. Using the same procedure, a sample from historical object at Horní Bečva from 18th century was analysed.

Key words: blood, blood coatings, historical objects, mass spectrometry, proteins

KREV A JEJÍ POUŽITÍ V HISTORICKÝCH OBJEKTECH

Krev, jakožto životodárná tekutina, má své specifické chemické složení i transcendentní hodnotu. Díky tomuto spirituálnímu významu a praktickým vlastnostem se jednalo o běžně užívanou, ale významnou složku směsi, jež našly svoje opodstatněné využití například jako lazury v malířství, pojiva nátěrů na dřevě (například částí mlýnů), konzervační nátěry stropních trámů, stěn či podlah mlátů a mnohé další [Schießl, 1981; Wenzel, 1914; Války, 2006; Vondráček, 1959]. Česká literatura se o krevních nátěrech jako takových zmiňuje minimálně, a proto autoři čerpali především z německé, ale také anglické či italské literatury. Již v paleolitu se objevovaly první známky krevních nátěrů v uměleckých malbách v jeskyních. Jedním z hlavních problémů průzkumu takto starých artefaktů krevních nátěrů jsou příliš malé vzorky, které bývají často kontaminované dalšími bílkovinami (nebo DNA). Z analytického hlediska stačí již mírná kontaminace krevního vzorku proteiny pocházejícími například z rukou osob, které přišly se vzorkem do kontaktu, která následně znemožňuje objektivně prokázat, zdali krev a jiné identifikované proteiny pocházejí z doby vzniku artefaktu. Tento fakt činí organickou analýzu obtížnější [Walter, 1996]. Jedno z prvních užití krve jakožto součásti krevního nátěru se datuje mezi lety 221–206 př. n. l. do Číny [ZHAO et al., 2015]. Krev se zde používala jako pojivo, společně s vápnem či jiným pojivovým materiálem (například tungovým olejem) pro přípravu kvalitních podkladových vrstev odolných vůči vlhkosti. Tato receptura se velmi často vyskytuje v různých obměnách napříč historickými texty [Cröker, 1982; Florinus, 1722; Vondráček, 1959]. Její používání se rozšířilo i do Evropy, což potvrzuje přítomnost směsi krve a vápna v podkladových vrstvách čínských lakovaných trámů, nacházejících se ve vídeňském barokním zámku Schönbrunn [Miklin-Kniefacz et al., 2016]. V České republice byly nátěry krevního typu prokazatelně identifikovány pouze ve dvou lokalitách, a to v obci Horní Bečva a Korouhev. Předpokládá se však, že krevní nátěry (ve směsi s vápnem) byly na území České republiky běžně používány. Lze tak očekávat, že v návaznosti na současné probíhající výzkumy v této oblasti dojde k rozšíření počtu lokalit, ve kterých bude krevní nátěr identifikován. Jeho identifikace je totiž možná i s velkým časovým odstupem, neboť k degradaci vysokého obsahu bílkovin v krevním nátěru dochází v malé míře, a to i přes vyšší hodnotu pH, způsobenou přítomností hydroxidu vápenatého (z vápna). Důkazem mohou být identifikované červené krvinky, kolagen a fragmenty vlasů na deseti 90 000 let starých kamenných nástrojích v jeskyni zvané Tabun v Izraeli [Loy – Hardy, 1992; Metheny – Beaudry, 2015].

Samotný nátěr složený pouze z krve není dostatečně odolný vůči povětrnostním vlivům a vlhkosti. Takový nátěr je obecně náchylnější k degradaci, neboť může snadněji podlehnout například napadení plísněmi apod. Kvůli nepřítomnosti vápna také v čerstvé krvi probíhá proces srážení krve, směs tak tuhne a po chvíli už není dobře roztíratelná [Schießl, 1981; Cröker, 1982]. Nicméně tento typ nátěru je proveditelný – čerstvá krev se při rychlém zužitkování výborně roztírá a lze dosáhnout lazurujícího efektu například ve vnitřních prostorách při moření trámů. Zpočátku je nátěr lesklý a zářivě rudý, později však nevzhledně zhnědne. Z výše uvedených důvodů Schießl [1981] upozorňuje, že je třeba brát informace o užívání čistě krevního nátěru v období baroka a rokoka s rezervou. Mnohé literární zdroje a receptury krev popisují jako nedílnou součást nátěrových směsí, ne však jako jedinou samostatnou složku [Cröker, 1982; Fröde, 1910]. Podle novodobého experimentu Luboše Vokouna z roku 2008 samotná krev časem podléhá hnilobným procesům, a proto doporučuje užít krev s vápennou vodou maximálně v rovném poměru, a nepřevážit tak objem krve nad objemem vápenné vody [Vokoun, 2008]. Nutno podotknout, že Vokoun ve svém experimentu nepoužívá vápennou kaši, nýbrž vápennou vodu (nasycený roztok $\text{Ca}(\text{OH})_2$), která tak obsahuje podstatně méně $\text{Ca}(\text{OH})_2$ než vápenná kaše či vápenné mléko. Významnou vlastností krve je její pojivost a lepidlost. Velmi používaná hovězí či přímo volská krev obsahuje – stejně jako krev všech obratlovců – vysoký podíl bílkovin. Krev mimo tělo koaguluje (sráží se) a tvoří houbovitý krevní koláč, který je složen z pevné složky krve a vodného, nažloutlého až bezbarvého séra. Vazebný efekt se projevuje jak u čerstvé krve (upravené mícháním na jatkách ihned po zabití zvířete po dobu cca 20–30 minut, dokud se krev nesráží), tak i v séru vzniklém po několika hodinovém odstavení (umíchaná krev se nechá odstát do příštího dne – v horní části zůstane průhledná nažloutlá tekutina – sérum, ve spodní části zůstává červená tekutina). Pojivého efektu, který lze podpořit přidáním čerstvé krve, se využívalo například při budování poustev a umělých přírodních jeskyní tmely, jejichž obvyklým složením byla krev, lněný olej a nehašené vápno [Schießl, 1981]. Některé pozdější recepty nahrazují krev vaječným bílkem či mléčným kaseinem, poněvadž pojivovou vlastnost velmi dobře zajistí i proteiny ovalbumin či kaseiny. Pro zajímavost lze zmínit recept krevního nátěru z roku 1910, který zveřejňuje Fröde ve své praktické příručce: „Bílek či hovězí krev se rozmíchá se čtyřmi díly čerstvého tvarohu, přidá se jeden díl práškového nehašeného vápna, vše se kvalitně promíchá a okamžitě čerstvě zpracuje“ [Fröde, 1910]. U tohoto zdroje, obdobně jako z většiny zdrojů, není zcela jasné, o jaký poměr ingrediencí se jedná, zdali hmotnostní či objemový. Většina historických receptů neuvádí exaktní či úplné složení krevních nátěrů, což znesnadňuje jejich opětovnou realizaci a při snaze recept novodobě aplikovat na rekonstrukci krevních nátěrů, je nutné vycházet ze zkušeností experimentátorů. Receptury se napříč zdroji různí především v poměrech a přidávaných ingrediencích, základem však zůstává vápno v různých podobách a konzistencích a krev, jejímž různě zvolenými poměry se docílí rozličných barev. Například směs 1 dílu hovězí krve s 20 díly vápna vyvolává zelenavý tón barvy [Schießl, 1981]. Záleží však na poměrném zastoupení vápna a vody v často užívané vápenné kaši (hašeném vápně), neboť například Tomáš Dostál a Luděk Dvořák dosahují ve svých experimentech odstínů zelené barvy až v poměru 1 dílu hovězí krve ku 5 dílům hašeného vápna. Krev oproti ostatním proteinovým složkám ve směsích dominuje, za čímž může být snaha zužitkovat veškerý i odpadní materiál z často konaných jatek a zabíjaček.

Za zmínku stojí jedna z odzkoušených receptur krevních nátěrů, která vznikla a byla realizována v roce 2017 v rámci workshopu projektu NAKI II. Historické dřevěné konstrukce: typologie, diagnostika a tradiční opracování dřeva DG16P02M02 ve Valašském muzeu v přírodě v Rožnově pod Radhoštěm [Dostál et al., 2019]:

- 400 ml hovězí krve,
- 50 ml odtučněného mléka,
- 20 ml žluči,
- 20 ml vápenného mazu.

Při vhodných poměrech¹ krve a vápenného mazu lze docílit různě barevných odstínů, s výjimkou transparentního bílého odstínu, který byl docílen směsí krevní vody a bílého pigmentu (zinkové běloby, ZnO) (obr. 1).



Obr. 1 Barevné odstíny krevních nátěrů / Colour shades of blood coatings. Photo: Luděk Dvořák

Barevné odstíny však nejsou světlostálé, například z červené barvy se časem stává hnědočervená až černohnědočervená, tmavě zelené tóny ale zůstávají. Za změnou barvy z červené na černohnědočervenou s největší pravděpodobností stojí degradace hemoglobinu. Ten ve své struktuře obsahuje ionty železa (Fe^{2+}), které se během jeho postupné degradace dostávají do kontaktu se vzdušným kyslíkem a oxidují se na oxid železnatý (FeO), který má černou barvu. Za zelenou barvou stojí pravděpodobně železnaté sloučeniny obsahující komplex $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Svoji roli zde hraje i materiál, na který je krevní nátěr nanášen. Například v případě dubového podkladu s vysokým obsahem třísloviny dochází k výrazné změně barvy díky působení taninů – krevní nátěr tak postupně dosahuje odstínů červenohnědočerné až černé barvy.

ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ K IDENTIFIKACI KRVE

Před samotnou analýzou sofistikovanými analytickými metodami je potřebné identifikovat, zdali materiál obsahuje, či neobsahuje krev. To lze zjistit nejčastěji používanými testy, které využívají pseudoperoxidasové aktivity hemové skupiny hemoglobinu. Pseudoperoxidasová aktivita urychluje rozklad peroxidu vodíku, čímž dochází k oxidaci činidla, které mění svůj oxidační stav i svoji barvu [De Wael et al., 2008]. Výhodou těchto testů je snadné použití, vysoká citlivost (detekce v řádech ng) a možnost použití v místě nálezů zkoumaného materiálu. Testy však vykazují vysokou náchylnost na výskyt falešně pozitivních výsledků, a proto se používají jen jako preprimární indikátory přítomnosti krve, jejichž výsledky je nutné posléze ověřit [Webb et al., 2006; Butler et al., 2019].

V současné době lze velmi snadno potvrdit přítomnost krve analytickými metodami. Z tohoto důvodu se nyní věda zaměřuje na analýzu konkrétního živočišného původu krevního vzorku. Při zaměření na samotnou krev se obvykle vychází z rozpoznání živočišného druhu na základě rozdílnosti jejich hemoglobinu. Jedná se především o metodu HPLC (vysokoučinnou kapalinovou chromatografii), vibračně spektroskopické techniky infračervenou nebo Ramanovu spektroskopii či hmotnostní spektrometrii [Bai et al., 2017; Zhang et al., 2017; Dong et al., 2019]. Využití hemoglobinu jako identifikačního marker je výhodné primárně proto, že proteiny vykazují poměrně vysokou stabilitu.

Technika infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) umožnila například rozlišit živočišný původ modelových vzorků samotné krve člověka, kočky a psa se 100% úspěšností [Mistek – Lednev, 2015; Zhang et al., 2016]. Nespornou výhodou vibračně spektroskopických

metod je možnost rychlé, nedestruktivní analýzy, což je výhodné, zejména pokud je k dispozici jen malé množství vzorku. Nevýhodou je silná interference signálu substrátu se signálem vzorku, kde signál substrátu, na kterém se krevní materiál nachází, může být i vyšší, než je samotný signál biologického vzorku.

Mezi metody, které nevyužívají hemoglobin k tomu, aby identifikovali krevní vzorek, patří například DNA analýza či imunochemické metody. V současné době je DNA profilování a následné porovnávání výsledků s databázemi nejhojněji využívaná metoda identifikace živočišného původu krevního vzorku. Tato metoda je ovšem dost časově i finančně náročná, a proto jsou velké snahy o objevení novějších, levnějších a rychlejších metod. Další nevýhodou DNA analýzy je ovšem omezené použití v případech archeologických nálezů. U molekuly DNA starší než 10 000 let hovoříme o tzv. ancientDNA (aDNA) [Mai et al., 2005], u níž velmi často dochází k degradaci molekul nukleové kyseliny. Rozsah poškozování vzorku závisí na jeho geografickém umístění, intenzitě UV záření, teplotě prostředí a aktivitě hmyzu a masožravců [Capelli et al., 2003]. Postupem času dochází ke zničení většiny molekul DNA [Pääbo et al., 1990; Lindahl, 1993; Höss et al., 1996]. Při uchování vzorku krevní skvrny při teplotě do 45 °C a relativní vlhkosti do 93 % se uvádí možnost správné identifikace DNA pouze v řádech měsíců [Dissing et al., 2010]. Dalším eventuálním rizikem je kontaminace cizí DNA, která může mít původ z bakterií, hub a z populace lidí či zvířat tzv. moderní DNA [Mai et al., 2005].

Imunochemické testování je založeno na reakci antigenu se specifickou protilátkou, nejčastěji imunoglobulinem IgG [Parson et al., 2000]. Řádný průběh reakce je podmíněn alespoň předběžnou vědomostí o možném živočišném původu krve a dispozicí specifické protilátky pro každý zvířecí druh. Následujícím limitujícím činitelem této metody je fakt, že tyto protilátky mají pouze omezenou stabilitu.

O vědecké identifikaci krve používané v uměleckých dílech či krevních nátěrech a pojivových materiálech zejména o určení původu jejího živočišného druhu je publikováno výrazně méně prací. Jednou z nejvíce používaných metod je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a různé chromatografické metody spojené s hmotnostní spektrometrií. Například pyrolyzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Py-GC/MS) byla použita ke stanovení prasečí krve, klišu a vaječ, které se všechny běžně používají jako pojiva ve starověkých čínských uměleckých dílech a historických předmětech [Wang et al., 2020]. Přítomnost krve byla potvrzena charakteristickými produkty pyrolyzy. Kombinace FTIR a kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) byla použita pro analýzu tří malt odebraných z čínských památek (pocházejícími z poloviny 17. až počátku 20. století) [Rao, 2015]. FTIR v tomto případě indikovala přítomnost proteinů, které byly poté pomocí LC-MS/MS identifikovány jako různé organické přísady (pšeničná mouka a krev). V publikaci [Granzotto et al., 2021] autoři detekovali krev na povrchích dvou afrických soch pomocí FTIR, Py-GC/MS a LC-MS/MS. Autoři se pokusili identifikovat živočišný původ krve pomocí tzv. shotgun proteomiky.² V naší práci využíváme techniku hmotnostní spektrometrie nano-LC-ESI-Q-TOF (ionizace elektrospřejem – kvadrupólový analyzátor – analyzátor doby letu) ke zjištění proteinových materiálů, které byly použity k přípravě 24 modelových vzorků krevních nátěrů a také ke zjištění proteinových materiálů obsažených ve vzorku krevního nátěru pocházejícího z konce 18. století.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Charakteristika vzorků

Modelové vzorky

Vzorky byly zhotoveny v roce 2019 v dílně restaurátorů Mgr. Tomáše Dostála, DiS., a Ludka Dvořáka ve Valašském muzeu v přírodě (tab. 1). Jako podklad bylo zvoleno smrkové dřevo, jelikož v minulosti bylo na dřevěný podklad aplikováno mnoho nátěrů na bázi krve. Složení vytvořených nátěrů bylo inspirováno historickými recepturami (např. Schießl, 1981), ale namíchané byly také další receptury z historicky dostupných materiálů. Vzorky č. 1, 2, 3 a 4 byly pouze samostatné látky nanášené na dřevěný podklad. Ty slouží jako referenční vzorky pro jednotlivé materiály.

Jednotlivé směsi byly namíchané a nanášené na dřevěný podklad pomocí štětce. Při práci byly používány jednorázové gumové rukavice, aby při nanášení nedošlo ke kontaminaci vzorků.

Cílem bylo vytvořit širokou paletu krevních nátěrů (obr. 2) připravených na podrobnou analýzu a výslednou komparaci zjištěných hodnot s původními recepturami (tab. 1), podle kterých byly vzorky připraveny. Užitými materiály obsahujícími proteiny, a tudíž těmi, které by měly být rozpoznatelné metodou nano-LC-ESI-Q-TOF MS, byly: krev, mléko, kaseinový maz, vaječný bílek, žitná mouka, kliš a žluč.

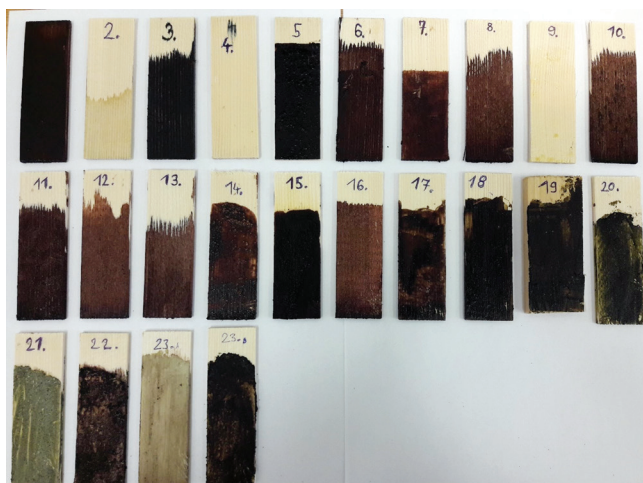
U vzorků č. 16–23 se jedná o totožný recept nanášený s časovou prodlevou. Dochází zde ke změně barevnosti na zelené či hnědavé odstíny. Tuto změnu způsobuje přidání vápna nebo opětovné přidání krve, kdy lze ze zeleného odstínu získat zpět hnědý až hnědočervený či černohnědočervený odstín. Záměrem těchto vzorků bylo zjistit, zdali se barevné odstíny v různých časových prodlevách odrazí ve výsledcích analýzy. Barevné změny způsobené změnou poměrů vápna jsou podrobněji popsány výše či viz pozn. č. 1.

Tab. 1 Složení modelových vzorků krevních nátěrů. Kamenec ($KAl(SO_4)_2 \cdot 10 H_2O$) / Composition of model samples of blood coatings. Alum ($KAl(SO_4)_2 \cdot 10 H_2O$)

Číslo vzorku	Složení nátěrů
1	Krev zpracovaná mícháním za současného chlazení krve ve vodní lázni se studenou vodou, ihned po zabíjení zvířete na jatkách po dobu cca 20–30 min
2	Žluč filtrovaná přes filtrační papír
3	Dřevní těr – neředěný
4	Kamenec – nasycený roztok
5	Krev 400 ml, vápenné „mléko“ (poměr na líčení stěn) 24 ml a žluč 10 ml
6	Krev 500 ml, kaseinový maz (vyrobený z odtučněného tvarohu 1 ml a hašeného vápna 19 ml), vaječný bílek (1/3 bílku z jednoho vejce)
7	Krev, vápno, kamenec (nasycený roztok), mouka žitná a kliš (poměry materiálu neuvádíme z důvodu podání užitého vzoru v připravovaném projektu)
8	Recept vzorku č. 6 (50 ml) + kaseinový maz 2,5 ml a amoniak (24%) 0,5 ml
9	Kaseinový maz (vyrobený z nízkotučného tvarohu – 200 ml a hašeného vápna – 10–15 ml)
10	Krev 400 ml, dřevní těr 2 ml, žluč 5 ml, vápno 20 ml a amoniak 1 ml (24% roztok)
11	Krev 400 ml, vápno 32 g a tanin 8 g
12	Krev 400 ml, vápno (20 ml), kamenec 30 g a kliš (klišová voda 24 g)
13	Recept č. 6 (50 ml) + kamenec 4 g (nasycený roztok)
14	Recept č. 6 (50 ml) + tanin 1 g
15	Recept č. 6 (50 ml) + tanin 1 g, lněný olej 5 g a žluč 1 g
16	Krev 400 ml, žluč 20 ml, mléko (odtučněné) 50 ml, vápenný maz 20 ml (o hustotě plnotučné hořčice)
17	Recept č. 16 (490 ml) a po 1/2 h přidání vápno – 80 ml
18	Recept č. 16 nanášen po 2 h
19	Recept č. 16 nanášen po 4 h
20	Recept č. 16 nanášen po 17 h
21	Recept č. 16 (490 ml) nanášen po 18,5 h a přidání vápenná voda 100 ml
22	Recept č. 16 (490 ml) nanášen po 19 h a přidání krev 50 ml
23 a	Recept č. 16 (490 ml) nanášen po 4 h s přidáním vápennou vodou 50 ml
23 b	Recept č. 16 (490 ml) + krev 40 ml

Historický vzorek

K analýze byl připraven také vzorek z historického objektu chalupy z Horní Bečvy. Jednalo se o údajný krevní nátěr ze stropu z konce 18. století. Majitel upozornil autory tohoto článku na strop, o němž se traduje, že byl natírán krví. Vzorek byl odebrán ze stropního trámu záklopového stropu chalupy dendrochronologicky datované do roku 1790.



Obr. 2 Dvacet čtyři vzorků krevních nátěrů aplikovaných na dřívka
Twenty four samples of blood coatings applied to the wood boards

Příprava vzorků pro samotnou analýzu

Z krevních nátěrů aplikovaných na dřívka byly odebrány malé vzorky o rozměrech cca 0,2 × 0,1 × 0,1 mm. Tyto vzorky byly ponořeny do 15 µl roztoku trypsinu (o koncentraci 1 mg/ml v 50 mM NH₄HCO₃) a vystaveny enzymovému štěpení po dobu dvou hodin při teplotě 20 °C. Po štěpení vzorků následovalo jejich přečištění a zakonzentrování na reverzní fázi C₁₈. Pro analýzu hmotnostní spektrometrií bylo použito 8 µl takto připraveného roztoku.

Hmotnostně-spektrometrická analýza pomocí LC-ESI-Q-TOF

Měření probíhalo na hmotnostním spektrometru typu ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker Daltonics) ve spojení s kapalinovým chromatografem Ultimate3000 RSLC (Dionex). Nejprve byly přečištěné krevní vzorky odpařeny a následně rozpuštěny v 10 µl 3% (V/V) acetonitrilu a 0,1% (V/V) mravenčí kyseliny. Krevní vzorky byly analyzovány za použití dvou typů mobilní fáze. Mobilní fáze A se skládala z roztoku vody a 0,1% roztoku kyseliny mravenčí a mobilní fáze B tvořila směs acetonitrilu a 0,1% roztoku kyseliny mravenčí. Z připravené směsi vzorků byly odebrány 2 µl a tento objem byl nanesen na zachytávací kolonu Acclaim PepMap 100 (100 µm × 2 cm, Dionex) při průtoku 5 µl·min⁻¹ 3 % fáze B po dobu 7 min. Následně proběhla separace peptidů na analytické koloně Acclaim PepMap RSLC C18 (75 µm × 150 mm, Dionex) pomocí gradientu acetonitrilu s následujícím průběhem: 0–5 min 3% B, 5–35 min 3–35% B, 35–50 min 90% B, 50–60 min 3% B. Eluce peptidů byla vedena do elektrosprejového zdroje Captive Spray. Fragmentační spektra byla sbírána v Data dependent analysis modu (DDA mód) a spektra byla ukládána v módu čárovém. Prekurzory pro fragmentaci byly vybírány v rozsahu 400–1400 m/z³ a hmotnostní spektra byla zaznamenána každé tři sekundy. Detekce fragmentů probíhala v rozsahu 50–2200 m/z.

Tab. 2 Identifikované proteiny ve vzorku č. 6 / Identified proteins in sample No. 6

Protein	Počet peptidů	Materiálový původ
Hemoglobin podjednotka beta	25	krev
Hemoglobin podjednotka beta-A	21	krev
Hemoglobin podjednotka alfa	14	krev
Hemoglobin podjednotka beta-A	12	krev
Hemoglobin podjednotka beta	8	krev
Ovalbumin	5	vaječný bílek
Kapa-kasein	3	mléko / mléčný produkt
Alfa-S2-kasein	3	mléko / mléčný produkt
Beta-laktoglobulin	3	mléko / mléčný produkt
Beta-kasein	2	mléko / mléčný produkt

Digitální zpracování dat

Program DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltonics) extrahoval peaklisty, které byly následně nahrány do programu Proteinscape 3.1. Konkrétní proteiny byly později identifikovány díky in-house Mascot serveru 2.4 (Matrix Science). Pro tuto identifikaci byla použita celosvětová veřejně dostupná proteinová databáze UniProt, která byla stažena z www.uniprot.org a doplněna o časté laboratorní kontaminanty (například keratiny). Variabilními modifikacemi pak byly určeny oxidace methioninů. Při přiřazování prekurzorů byla určena tolerance 10 ppm a fragmentů 0,05 Da.

VÝSLEDKY A DISKuze

Modelové vzorky krevních nátěrů

Metodou nano-LC-ESI-Q-TOF MS byly častěji nalezené živočišné proteiny než rostlinné, což je ve shodě se složením vzorků uvedeném v tab. 1, které rovněž obsahují mnohem více materiálů živočišného než rostlinného původu. Je nutné zdůraznit, že použitá metoda cílí na identifikaci proteinových materiálů, ne však na jejich kvantifikaci. Z omezených prostorových důvodů zde ukážeme typ výsledků jen pro jeden z analyzovaných vzorků, ale výsledky ostatních 23 analýz je možné na vyžádání získat od autorů článku.

Výsledek proteinové analýzy pro vzorek č. 6 je uveden v tab. 2. Z identifikovaných proteinů lze usoudit, z jakého proteinového materiálu pochází. Pro krev jsou typické hemoglobiny, pro vaječný bílek ovalbumin a chybějící vitelogenin (protein typický pro vaječný žloutek), kaseiny a laktoglobuliny pro mléko, respektive mléčné produkty zahrnující i kasein. Z rozboru vyplývá, že se tento krevní nátěr skládá z krve, vaječného bílku a mléka (mléčného materiálu). V komparaci s původními recepturami v tab. 1 se potvrdila správnost analýzy, neboť původní nátěr vzorku č. 6 byl zhotoven z krve (500 ml), kaseinového mazu (20 ml) a vaječného bílku (1/3 bílku z jednoho vejce).

Ve skutečnosti ale výsledková tab. 2 pro vzorek č. 6 není kompletní, nýbrž disponuje pouze deseti vybranými proteiny, které jsou pro zjištění původní receptury klíčové. Konkrétně byla pro tento vzorek zjištěna přítomnost přibližně 180 proteinů. K výběru relevantních proteinů je klíčový počet peptidů. Užitá analytická metoda nano-LC-ESI-Q-TOF MS je velmi citlivá a sofistikovaná přizpůsobená k detekci peptidů, které vznikly enzymovým štěpením proteinů. Za relevantní považujeme ty proteiny, které byly detekovány s dostatečným peptidovým zastoupením, tedy minimálně dvěma peptidy shodnými s aminokyselinovou sekvencí daného proteinu uvedenou v databázi UniProt. Dva peptidy jsou vědci považovány za dostačující pro spolehlivou identifikaci proteinů dle nepsané celosvětové proteomické konvence. Drtivá většina proteinů nalezených ve vzorku byla zastoupena pouze jedním peptidem, tudíž nebyly považovány za věrohodně prokázané.

Obdobným způsobem proběhl výběr proteinů, určení materiálového složení a komparace identifikovaného složení nátěrů s původní recepturou u všech zbývajících 23 vzorků. Ve vzorcích byly například nalezeny kolageny, které poukazovaly na přítomnost klíhu/želatiny, nebo zásobní rostlinné proteiny či proteiny spojené s metabolismem zásobních polysacharidů prokazující přítomnost žitné mouky. V této fázi výzkumu jsme se dále nezaměřovali na rozlišení mezi jednotlivými druhy mléčných produktů (mléka, kaseinu nebo tvarohu), a proto jsou označeny jako mléko / mléčný materiál. V tab. 3 je uvedeno kompletní shrnutí a porovnání analýzou nalezeného složení nátěrů. Jsou zde uvedeny konkrétní přísady, z nichž pocházely identifikované proteiny. Vzorky č. 2, 3 a 4 byly tvořeny pouze jednou ingrediencí, a to v pořadí žlučí, dřevním térem a kamencem. V případě těchto nátěrů nemohlo dojít k identifikaci (Ø) žádných specifických proteinů, které by poukazovaly na přítomnost užitého materiálu bílkovinového původu, protože žádné proteiny neobsahují. V tab. 3 lze tedy zaznamenat fajfky (√) v případě správné identifikace materiálu a křížek (×), který značí buď nalezení specifického proteinu, kvůli kterému vyhodnocujeme použití určitého materiálu, který ale použit na přípravu vzorků nebyl, anebo nenalezení specifického proteinu identifikujícího materiál, který v originální receptuře použit byl.

Tab. 3 Celkové shrnutí a porovnání identifikovaného složení nátěrů
A summary and comparison of the identified coatings ingredients

Číslo vzorku	Identifikované složení	Identifikace	Kontaminace/nenalezeno
1	krev	×	mléko / –
2	∅	✓	–
3	∅	✓	–
4	∅	✓	–
5	krev	✓	–
6	krev, kaseinový maz, vaječný bílek	✓	–
7	krev, žitná mouka, klijh	✓	–
8	krev, kaseinový maz, vaječný bílek	✓	–
9	kaseinový maz	×	krev/–
10	krev	×	mléko/–
11	krev	✓	–
12	krev	×	mléko/klijh
13	krev, kaseinový maz, vaječný bílek	✓	–
14	krev, kaseinový maz, vaječný bílek	✓	–
15	krev, kaseinový maz, vaječný bílek	✓	–
16	krev, mléko	✓	–
17	krev, mléko	✓	–
18	krev, mléko	✓	–
19	krev, mléko	✓	–
20	krev, mléko	✓	–
21	krev, mléko	✓	–
22	krev, mléko	✓	–
23 a	krev, mléko	✓	–
23 b	krev, mléko	✓	–

∅ – vzorky neobsahovaly proteinové materiály, ✓ – všechny proteinové materiály byly správně identifikovány, × – proteinové materiály, které byly ve vzorku použity, buď nebyly nalezeny všechny, nebo naopak byl zaznamenán materiál navíc (kontaminace) – identifikace proběhla v pořádku

Ze sumarizující tab. 3 lze vyčíst, že u čtyř vzorků došlo buď k jejich kontaminaci, či se naopak nepodařilo odhalit všechny materiály použité k jejich přípravě. U vzorku č. 1 byly chybně detekovány mléčné proteiny, které v originální receptuře užity nebyly. Totožná chyba nastala i u vzorku č. 10 a č. 12. U vzorku č. 9 byla detekována krev, která nebyla součástí původní receptury. Tyto materiály, které byly nalezeny navíc, se mohly dostat do výsledného složení nátěrů jakožto kontaminace, ke kterým mohlo dojít během přípravy nátěrů nebo při následné manipulaci se vzorky. U vzorku č. 12 nebyl naopak detekován žádný kolagen, který by dokázal přítomnost klijh, který se ale při výrobě vzorku č. 12 použil. Kolagen nebyl detekován pravděpodobně kvůli prokřivení bílkovin, které znesnadnilo štěpení proteinů trypsinem. Tento jev mohl nastat kvůli vzniku tzv. nerozpustného klijhu [Slánský, 1976], který vzniká smícháním klijhu s kamenem ($KAl(SO_4)_2 \cdot 10H_2O$). Některé vzorky obsahovaly příměs žluči, avšak v žádném z analyzovaných vzorků nebyla její přítomnost prokázána. Nejspíše z důvodu, že žluč primárně obsahuje žlučové kyseliny, které nejsou proteinové povahy, a proto nemohly být touto metodou identifikovány. Na závěr je nutno poznamenat, že časové intervaly nanášení jednotlivých nátěrů popsanych v tab. 1 neměly vliv na výsledky provedené analýzy.

Historický vzorek krevního nátěru

V případě historického krevního nátěru lze vyčíst z tab. 4, že obsahoval krev s vysokým zastoupením specifických krevních proteinů, které byly identifikovány dostatečným počtem peptidů (≥ 2). V případě sérového albuminu nelze jednoznačně určit původ ryze krevní přísady, neboť sérový albumin se ve stopovém množství může objevit i v moči, kterou ale též jednoznačně neidentifikuje. Obdobně jako u vzorků modelových i ve vzorku historickém bylo nalezeno větší množství proteinů. Vybráno bylo autory ale jen deset s největším peptidovým zastoupením, které ale podávají dostatečně přesnou informaci o původu historické receptury. Ve vzorku nebyl nalezen jiný proteinový materiál než krev.

Tab. 4 Identifikované proteiny v historickém vzorku / Identified proteins in historical sample

Protein	Počet peptidů	Materiálový původ
Hemoglobin podjednotka beta	31	krev
Hemoglobin podjednotka beta-A	24	krev
Hemoglobin podjednotka alfa	21	krev
Hemoglobin podjednotka beta-A	14	krev
Alfa-2-makroglobulin	14	krev
Hemoglobin podjednotka alfa	13	krev
Hemoglobin podjednotka beta	12	krev
Hemoglobin podjednotka beta	11	krev
Sérový albumin	10	krev
Hemoglobin podjednotka alfa	2	krev

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo ověřit, zda je pomocí hmotnostní spektrometrie nano-LC-ESI-Q-TOF možné zjistit celkové proteinové (respektive materiálové) složení 24 vzorků modelových krevních nátěrů. Kompletní a správné materiálové složení se podařilo zjistit u 20 z 24 analyzovaných vzorků. U třech z nich byly nalezeny látky, které nebyly součástí původní receptury, tudíž se jednalo s velkou pravděpodobností o kontaminace. U jednoho vzorku se nepodařilo zjistit přítomnost klijhu (kolagenového materiálu), a to pravděpodobně z důvodu jeho interakce s kamenem.

Metoda byla dále použita k analýze historického vzorku z konce 18. století, ve kterém byla nalezena jen samotná krev. Podezření na použití žluči se v tomto vzorku a ani v žádném modelovém nátěru nepodařilo potvrdit ani přes její živočišný původ, kvůli kterému se očekávala přítomnost pro žluč charakteristických proteinů (například mucinů) [Hanzlová – Hemza, 2006]. Přítomnost samotné krve by ale poukazovalo na pravdivost doložených receptur [SCHIEßL, 1981], které zmiňují použití samotné krve k ošetření trámů v období baroka až rokoka, které je v českých zemích datované až zhruba do 80. let 18. století až už s příměsí vápna, či nikoliv.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři článku děkují Ing. Adéle Loukotové za dodání pojednání o analytických metodách používaných pro analýzu krve. Dále pak grantovému projektu DG16P02M026 „Historické dřevěné konstrukce: typologie, diagnostika a tradiční opracování dřeva“, programu NAKI II, což je program na podporu aplikovaného výzkumu a vývoje národní a kulturní identity, jehož poskytovatelem je Ministerstvo kultury České republiky. V rámci tohoto programu proběhly experimenty s nátěry na bázi krve.

POZNÁMKY

- ¹ Bližší vhodné poměry za účelem docílení různých barevných krevních nátěrů lze dohledat mimo tento text také například v publikaci: Dostál, T. – Baar, J. – Kučková, Š. – Hurtová, A. – Čoban, J. – Dvořák, L. Nátěry hovězí krvi na dřevě: Představení dosavadních výsledků projektu a boření některých mýtů, které se s nátěry krvi tradují. In: Svorník. Praha: Unicornis, 2019, s. 159–160 či v textu: Schießl, U. „Ochsenblut“ — ein Farbbindemittel und ein Farbname. Denkmalpflege in Baden-Württemberg–Nachrichtenblatt der Landesdenkmalpflege, 1981, s. 122–126.
- ² „Shotgun proteomics“ je nepřímé měření proteinů prostřednictvím zjištění specifických peptidů. Typickým příkladem je analýza pomocí metody LC-MS/MS.
- ³ Podíl hmotnosti iontu a nábojového čísla / mass-to-charge ratio.

LITERATURA

- Bai, P. – Wang, J. – Yin, H. – Tian, Y. – Yao, W. – Gao, J. Discrimination of human and nonhuman blood by Raman spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. *Analytical Letters*, 2017, vol. 50, no. 2, s. 379–388.
- Butler, J. – CHaseling, J. – Wright, K. A comparison of four presumptive tests for the detection of blood on dark materials. *Journal of Forensic Sciences*, 2019, vol. 64, no. 6, s. 1838–1843.
- Capelli, C. – Tschentscher, F. – Pascali, V. L. “Ancient” protocols for the crime scene?: Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Science International*, 2003, vol. 131, no. 1, s. 59–64.
- Cröker, J. M. – Schiessl, U. Der wohl anführende Mahler. Dotisk. *Mäander*, 1982. ISBN 9783882192001. s. 118.
- De Wael, K. – Lepot, L. – Gason, F. – Gilbert, B. In search of blood—Detection of minute particles using spectroscopic methods. *Forensic Science International*, 2008, vol. 180, no. 1, s. 37–42.
- Dissing, J. – Søndervang, A. – Lund, S. Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2010, vol. 17, no. 7, s. 392–396.
- Dong, J. – Hong, M. – Xu, Y. – Zheng, X. A practical convolutional neural network model for discriminating Raman spectra of human and animal blood. *Journal of Chemometrics*, 2019, vol. 33, no. 11, s. 3184–3195.
- Dostál, T. – Baar, J. – Kučková, Š. – Hurtová, A. – Čoban, J. – Dvořák, L. Nátěry hovězí krví na dřevě: Představení dosavadních výsledků projektu a boření některých mýtů, které se s nátěry krví tradují. In: *Svorník*. Praha: Unicornis, 2019, s. 153–162.
- Flornius, F. P. *Oeconomus prudens et legalis: Oder allgemeiner Klug und Rechts-verständiger Haus-Vatter*. Nürnberg: Riegels, 1722, s. 913.
- Fröde, F. W. Das Konservieren der Baumaterialien sowie der alten und neuen Bauwerke und Monumente: Technische Praxis. *Waldheim*, 1910, s. 508.
- Granzotto, C. – Sutherland, K. – Goo, Y. A. – Aksamija, A. Characterization of surface materials on African sculptures: new insights from a multi-analytical study including proteomics. *Analyst*, 2021, vol. 146, no. 10, s. 3305–3316.
- Handt, O. – Höss, M. – Krings, M. – Pääbo, S. Ancient DNA: Methodological challenges. *Experientia*, 1994, vol. 50, no. 6, s. 524–529.
- Hanzlová, J. – Hemza, J. *Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní*, 2006.
- Loy, T. – Hardy, B. Blood residue analysis of 90,000-year-old stone tools from Tabun Cave, Israel. *Antiquity*, 1992, vol. 66, no. 250, s. 24–35.
- Mai, L. L. – Young Owl, M. – Kersting, M. P. *The Cambridge dictionary of human biology and evolution*, 2005.
- Metheny, K. B. – Beaudry, M. C. *Archaeology of Food: An Encyclopedia*. 1. Rowman & Littlefield, 2015. ISBN 9780759123663. s. 432.
- Miklin-Kniefacz, S. – Pitthard, V. – Parson, W. – Berger, C. – Stanek, S. – Griesser, M. – Kučková, Š. Searching for blood in Chinese lacquerware: zhu xie hui. *Studies in Conservation*, 2016, vol. 61, no. 3, s. 45–51.
- Mistek, E. – Lednev, I. K. Identification of species’ blood by attenuated total reflection (ATR) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, vol. 407, no. 24, s. 7435–7442.
- Pääbo, S. – Irwin, D. M. – Wilson, A. C. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, vol. 265, no. 8, s. 4718–4721.
- Parson, W. – Pegoraro, K. – Niederstätter, H. – Föger M. – Steinlechner, M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 2000, vol. 114, no. 1, s. 23–28.
- Pegoretti, G. *Manuale pratico per l’estimazione dei lavori architettonici, stradali, idraulici e fortificazione*, Editore Librajolo Angelo Monti, Milano, 1843.
- Rao, H. – Li, B. – Yang, Y. – Ma, Q. – Wang, C. Proteomic identification of organic additives in the mortars of ancient Chinese wooden buildings. *Analytical Methods*, 2015, vol. 7, no. 1, s. 143–149.
- Schießl, U. „Ochsenblut“ — ein Farbbindemittel und ein Farbname. *Denkmalpflege in Baden-Württemberg–Nachrichtenblatt der Landesdenkmalpflege*, 1981, s. 122–126.
- Slánský, B. *Technika v malířské tvorbě: malířský a restaurátorský materiál*. 2., nezn. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1976, s. 62–63.
- Války, M. *História, súčasnosť a moderné trendy v povrchovej úprave dreva*. Diplomová práce na Univerzite Konštantina Filozofa v Nitre. Vedoucí diplomové práce PaedDr. Jana Depešová, 2006, s. 21.
- Vokoun, L. Experiment s ošetřením dřevěné konstrukce hovězí krví. In: *Sanace dřevěných konstrukcí staveb*. Praha: Společnost pro technologie ochrany památek, 2008, s. 43–46.
- Vondráček, O. Zprávy o lištování stěn ve Zlaté Olešnici v okrese semilském. In: *Věštník národopisné společnosti československé*. Praha: Národopisná společnost československá, 1959, s. 10.
- Walter, P. Pigments with or without organic binder? A survey of wall painting techniques during Antiquity. In: *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics, 1996, s. 503–515.
- Wang, N. – Gu, A. – Min, J. R. – Li, G. H. – Lei, Y. Identification of protein binding media used in Chinese cultural relics by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, vol. 48, no. 1, s. 90–96.
- Wenzel, F. *Handbuch für Maler. Praktisches Nachschlage und Auskunftsbuch über das gesamte Technische Wissen des Dekorationsmalers, Anstreichers, Lackierers, Vergolders und verwandter Berufsangehöriger*. Leipzig: Jüstel & Göttel, 1914.
- Zhang, L. – Zhang, S. – Sun, M. – Li, H. – Li, Y. – Fu, Z. – Guan, Y. – Li, G. – Lin, L. Noncontact discrimination of animal and human blood with vacuum blood vessel and factors affect the discrimination. *Infrared Physics & Technology*, 2017, vol. 81, s. 210–214.
- Zhao, P. – Jackson, M. D. – Zhang, Y. – Li, G. – Monteiro P. J. M. – Yang, L. Material characteristics of ancient Chinese lime binder and experimental reproductions with organic admixtures. *Construction and Building Materials*, 2015, vol. 84, s. 477–488.