

古代エジプト壁画の彩色層に含まれる 有機化合物の質量分析

川崎英也^{*,**} 河原一樹^{***} 中沢 隆^{***} アフメド・シュエイブ^{****}
アーデル・アカリシュ^{*****} 吹田 浩^{*****} 荒川隆一^{**,**}

Characterization of Organic Binding Media used in Paint Layers of Ancient Egyptian Murals by Mass Spectrometry

Hideya KAWASAKI^{*,**} Kazuki KAWAHARA^{***} Takashi NAKAZAWA^{***}
Ahmed Shoeib^{****} Adel Akarish^{****}
Hiroshi SUITA^{*****} Ryuichi ARAKAWA^{**,**}

1 研究の背景

近年、文化財保護における科学技術の役割は急速に大きくなっており、文化財保存に対する科学技術の促進が求められている。文化財の表面分析法として、電子線マイクロアナリシス (EPMA)、ポータブル型蛍光 X 線や X 線回折、TOF-SIMS (飛行時間型二次イオン質量分析法)、走査型電子顕微鏡 (SEM) などが用いられている。貴重な文化財分析は表面分析手法の応用例のひとつとして興味深い。また、文化財の保存においては、生物劣化 (カビなど) とその対策が求められており、今後、表面科学や表面分析技術の貢献が期待される。本研究では、質量分析を中心とした文化財試料中に含まれる有機化合物の化学分析についての、以下の研究を行った。

- (1) エジプト壁画中に残存する膠のコラーゲンの MALDI 質量分析法による同定
- (2) ガスクロマトグラフィー質量分析による壁画中の有機化合物の分析

上記、各項目についての詳細を下記に述べる。

2 エジプト壁画中に残存する膠のコラーゲンの MALDI 質量分析法による同定

2.1 はじめに

エジプトの遺跡に見られる色彩豊かな壁画 (Fig. 1) は、乾燥した環境下において紀元前三千年紀以降に制作されたものが、現在も色材の剥離を免れており、その材質や製作技法の解明は文化財保護の観点から重視されている。これまでの調査報告から、

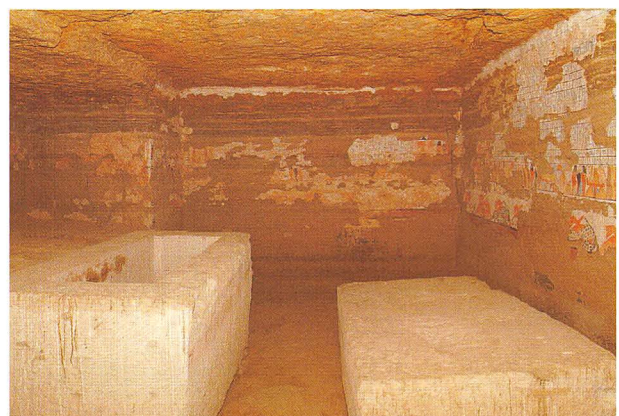


Fig. 1 彩色が残るイドゥートの地下埋葬室の壁画

* 関西大学国際文化財・文化研究センター (Center for the Global Study of Cultural Heritage and Culture, Kansai University, Japan)

** 関西大学化学生命工学部 (Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Japan)

*** 奈良女子大学理学部 (Faculty of Science, Nara Women's University, Japan)

**** カイロ大学考古学部 (Faculty of Archeology, Cairo University, Egypt)

***** エジプト国立研究センター (National Research Centre, Egypt)

***** 関西大学文学部 (Faculty of Letters, Kansai University, Japan)

色材の接着に際して用いられた接着剤原料として、アラビアゴム、膠、卵の白身（卵白）など、タンパク質、あるいは部分的にタンパク質を含有するものが候補として挙げられている。しかし、材料の科学分析にあたって、文化財の重要性のため非破壊的な方法が望まれることや、様々な環境要因から生じる不純物の混入のため、学術的な検証例は少ない。本研究では、プロテオミクスで微量タンパク質の分離・同定に利用されている電気泳動法とマトリックス支援レーザー脱離／イオン化（MALDI）質量分析法を併用することで、サッカラ遺跡のイドウトのマスターバで発見された壁画に使用された接着剤原料の特定を試みた。

2.2 試料と分析方法

(1) 試料

イドウトの地下埋葬室内にある壁画の剥落片の一部を試料とした（Fig. 2）。試料表面には白色と黒色の二種類の顔料が塗布されているが、本実験では白色部に主眼をおき、そこに使用されている接着剤の原料の抽出と同定を行った。また、接着剤原料の同定に際し、比較のため、膠の標準試料としてウシ（*Bos taurus*）由来I型コラーゲン（Sigma Aldrich）、卵白に含まれるアルブミンの標準試料としてウシ（*Bos taurus*）血清アルブミン（Sigma Aldrich）、及びアラビアゴムの標準試料としてスーダン産のアラビアゴム（ホルベイン工業株式会社）をそれぞれ購入し、標準試料として用いた。

(2) 試料調製

分析試料表面には、採取・保存環境から多くの不

純物が付着していることが予想されるため、まず剥落片の表面を1 mLの純水で洗った。得られる洗浄液をエッペンドルフチューブに移し、13,000gで5分間、遠心分離し、上澄み液を試料溶液1（Fig. 3、Sample #1）とした。次に、洗浄後の壁画表面の白色顔料（約10 mg）をスパーテルで削り取り、エッペンドルフチューブ中で1 mLの0.1% トリフルオロ酢酸（TFA）と混合させ、15分間超音波抽出した。その後、13,000gで5分間、遠心分離し、上澄み液を試料溶液2とした（Fig. 3、Sample #2）。また、残った壁画片を乳鉢中で2 mLの0.1% TFAに浸し、表面に残存する顔料をスパーテルで削り取った。乳鉢から壁画片を取り除いた後、得られる残存液をエッペンドルフチューブに移し、13,000gで5分間、遠心分離した後に得られる上澄み液を試料溶液3とした（Fig. 3、Sample #3）。以上の各行程の模式図をFig. 3に示した。

(3) 酵素消化

壁画表面の不純物による汚染の状況を調べるため、試料溶液1は不純物の分離等の前処理を行わず直接酵素消化に用いた。その際、試料溶液1を一度凍結乾燥し、100 μ Lの0.1M 重炭酸アンモニウム（ NH_4HCO_3 ）に溶解させた。得られる液を1時間60°Cで静置した後、室温に冷却させ、5 μ Lのトリプシン溶液（0.2 μ g/ μ L）を加えて、37°Cで24時間、酵素消化した。酵素消化後の溶液10 μ Lに40 μ Lの0.5%トリフルオロ酢酸水溶液を加えて酸性（pH 4.0）にし、ZipTip-C18で濃縮・脱塩した。ZipTip-C18での溶出は、50% アセトニトリル/0.05% TFA溶液で行った。同様の作業を市販のウシI型

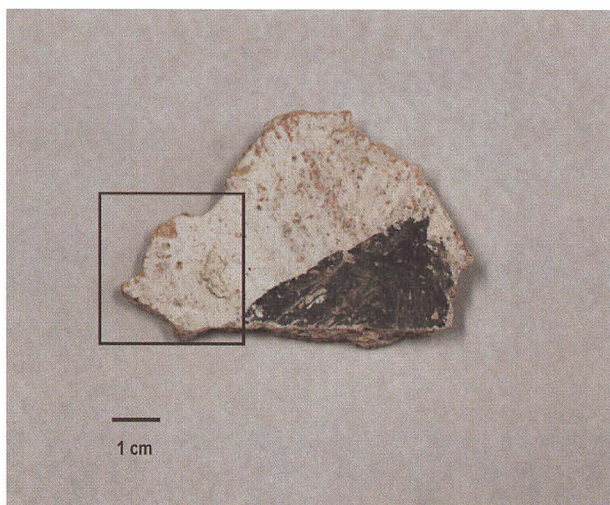


Fig. 2 イドウトの地下埋葬室の壁画小片（四角箇所より試料採取）

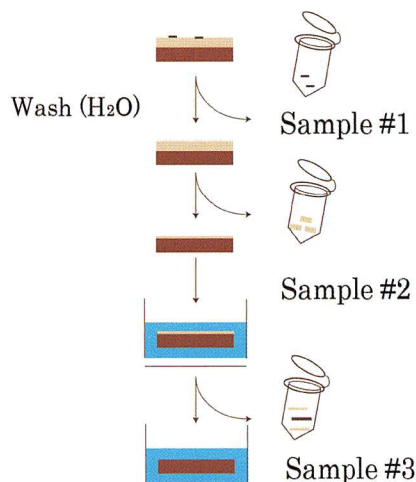


Fig. 3 試料調整の手順

コラーゲン、ウシ血清アルブミン、アラビアゴムの各々に対しても実施し、標準比較試料とした。

(4) ゲル内酵素消化

壁画片に混入している不純物を考慮し、試料溶液 2 および 3 に関しては、酵素消化前にポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) をすることで有機物の分離を行い、その後、各成分をゲル内でトリプシン消化した。分離は、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用い Laemmli 法 [Laemmli 1970] に基づいて実施した。

まず、試料溶液 2 および 3 を凍結乾燥し、各々を 12 μ L のサンプルバッファー [100 mM トリス—塩酸 (pH 6.8)、20% (v/v) グリセロール、4% (w/v) SDS、100 mM DTT、0.1% (w/v) プロモフェノールブルー (BPB)] に溶解させ、60 $^{\circ}$ C で 20 分間加熱し可溶化させた。溶解後の液 5 μ L を、10% アクリルアミドゲルを用いて作成した分離ゲルの各ウェルに添加し、1 μ L の分子量マーカーとともに泳動を行った。分子量マーカーには、市販の Prestained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE (ナカライテスク株式会社) を用いた。電気泳動は 25 mA の定電流下で行った。

分離後の各有機物成分の検出は、銀染色法 (Silver Stain II Kit Wako、和光純薬工業株式会社) を用いて行った。まず、SDS-PAGE が終了したゲルを、純水で洗浄しながらプラスチックケースに回収し、固定液 (33.3% (v/v) エタノール、10% (v/v) 酢酸) に浸し、一晚振とうした。固定後のゲルは、20% (v/v) エタノール中で 20 分間振とうした後、純水に 10 分間浸透させ、ゲルの洗浄を行った。その後、増感液 (0.02% (w/v) チオ硫酸ナトリウム) 中で 10 分間振とうした。増感の終了したゲルは純水で 20 秒間、3 回振とうし、洗浄した。洗浄後のゲルを、銀染色キット付の硝酸銀を含む染色液に 15 分間浸し、振とうさせながら純粋でゲルを洗浄した後、クエン酸およびホルムアルデヒドを含む現像液に浸した。

銀染色後のゲルから、目的のスポットを含む小片を各々切り出し、30 mM フェリシアン化カリウムと 100 mM チオ硫酸ナトリウムを 1:1 で混合した溶液 50 μ L に浸し、染色に用いた銀を除いた後、ゲルの周囲の溶液を捨て、50 μ L の 10 mM DTT / 100 mM NH_4HCO_3 を加え 50 $^{\circ}$ C で一時間振とうさせることで蛋白質中のシステイン残基間で形成される S-S 結合を還元させた。その後、50 μ L の 50 mM ヨードアセトアミド / 100 mM NH_4HCO_3 を加え、室温で 40 分間、遮光条件下で振とうさせ蛋白質中のシ

ステイン残基のアルキル化を行った。還元・アルキル化後の各ゲルに対して、30 μ L のトリプシン溶液 (0.01 μ g / μ L) を加え、37 $^{\circ}$ C で 24 時間放置し酵素消化した後、各試料溶液を 1% の TFA 溶液を加えて酸性 (pH 4.0) にし、Ziptip で濃縮・脱塩した。

(5) MALDI 質量分析

酵素消化後の試料溶液 1 μ L を MALDI サンプルプレート上で 0.5 μ L のマトリックス溶液 (α -シアノ-p-ヒドロキシ桂皮酸のアセトニトリル溶液) と混ぜた後、乾燥させ分析を行った。質量分析は、MALDI タンデム飛行時間型 (MALDI-TOF/TOF) 質量分析装置 (Axima Performance; Shimadzu/Kratos, Manchester, UK) を使用し、MALDI-TOF スペクトル及び MALDI-TOF/TOF スペクトルを測定した。MALDI-TOF スペクトル中に検出された各ペプチドのアミノ酸配列は、MALDI-TOF/TOF スペクトルの測定によって得られた開裂パターンを手動で解釈することによって推定した。

2.3 結果と考察

(1) 壁画の最表層から調製した試料 (試料溶液 1) の MALDI 質量分析

壁画の剥落片表面を 1 mL の純水で洗った際の洗浄液を、タンパク質分解酵素トリプシンで処理し、質量分析した結果得られた MALDI-TOF スペクトルを Fig. 4 (a) に示した。比較として、壁画に含まれる接着剤の原料と想定される市販のウシの腱より抽出した I 型コラーゲン (b) とその対照としてウシ血清由来アルブミン (c)、さらに何らかのタンパク質が含まれる可能性のあるアラビアゴムについても同様にトリプシン消化した試料について得られたスペクトル (d) をあわせて示した。

壁画片から得られた MALDI-TOF スペクトル中に観測されたピークの大部分は、各種ケラチンなどの不純物に由来するものであり、比較試料として用いた I 型コラーゲンおよびカゼインのスペクトル中に観測されたピークとは、分解酵素トリプシンの自己消化ペプチドを除いてほとんど一致しなかった。また、壁画片由来のスペクトルには、 m/z 44 の間隔を持つ一連の特徴的なピーク群が観測されており、合成ポリマーであるポリエチレングリコール (化学式: $-(\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_n-$) の混入が認められた。この結果は、石室内の壁画表面が、見学の際の人為的要因による汚染や、採取時に多数の人の手に触れることから混入する毛髪や皮膚の主要成分であるケラチン、空気中の細菌で汚染されてお

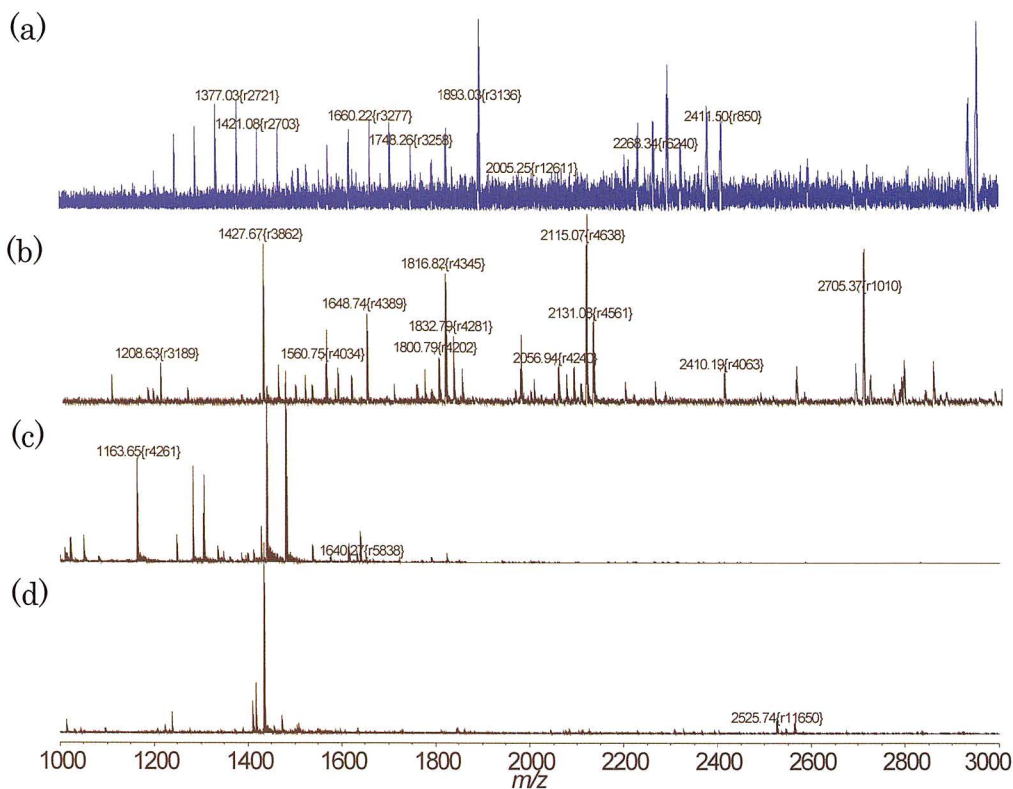


Fig. 4 MALDI-TOF MS スペクトル (a) 試料溶液1のトリプシン分解物、(b) ウシI型コラーゲン、(c) ウシ血清由来アルブミン、(d) アラビアガム

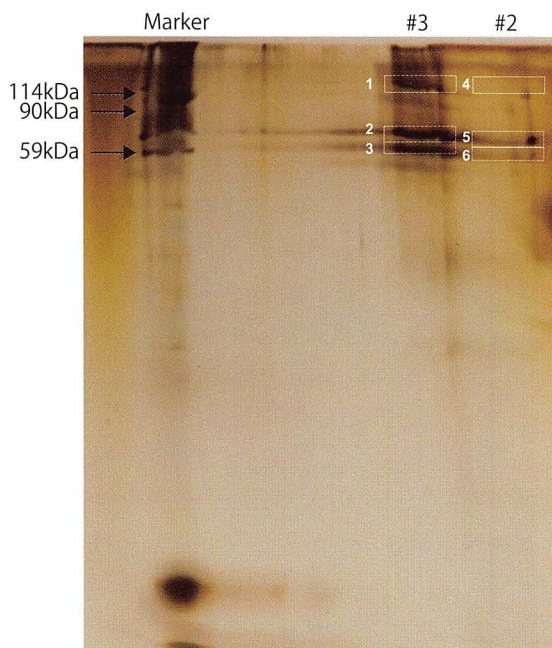


Fig. 5 SDS-PAGE による有機物成分の分離結果

り、さらに化粧品クリームなどの添加剤や保存に用いたビニルケースなどに含まれるポリエチレングリコールが混入していることを明確に示している。特に、ポリエチレングリコールのピークはMALDI-MSの感度が非常に高いためにしばしば観測されているので、さらに微量の文化財資料の分析には注意が必

要である。

そのため、表面部に接着剤成分がたとえ分解されずに存在していたとしても検出することは非常に困難であると考えられる。次項では、不純物の分離に対する我々のアプローチを紹介する。

(2) 電気泳動法 (SDS-PAGE) による不純物の分離と質量分析

壁画の最表面から抽出した試料において顕著な不純物の汚染が認められたため、試料溶液2および試料溶液3に関しては、予め電気泳動法 (SDS-PAGE) により、有機物成分を分離した (Fig. 5)。

得られたゲル中で、明確なバンドが見られる領域 (Fig. 5、1-6) を切り取り、ゲル内で酵素消化したペプチド試料をMALDI-TOF MS分析した (Fig. 6)。市販のウシI型コラーゲンのスペクトルに比べて、ゲル内消化で得られた壁画由来のスペクトルは、非常にノイズが大きく、またピーク強度が小さい。これは、試料中のペプチド濃度が薄いことに対応している (比較的感度の高い銀染色法を用いて漸く存在が確認できる程度である)。

Fig. 4 中には、Fig. 5 のSDS-PAGEゲルの内、1~3の四角で囲った部分から抽出したペプチドのMALDI-TOF スペクトルを示している。興味深いこ

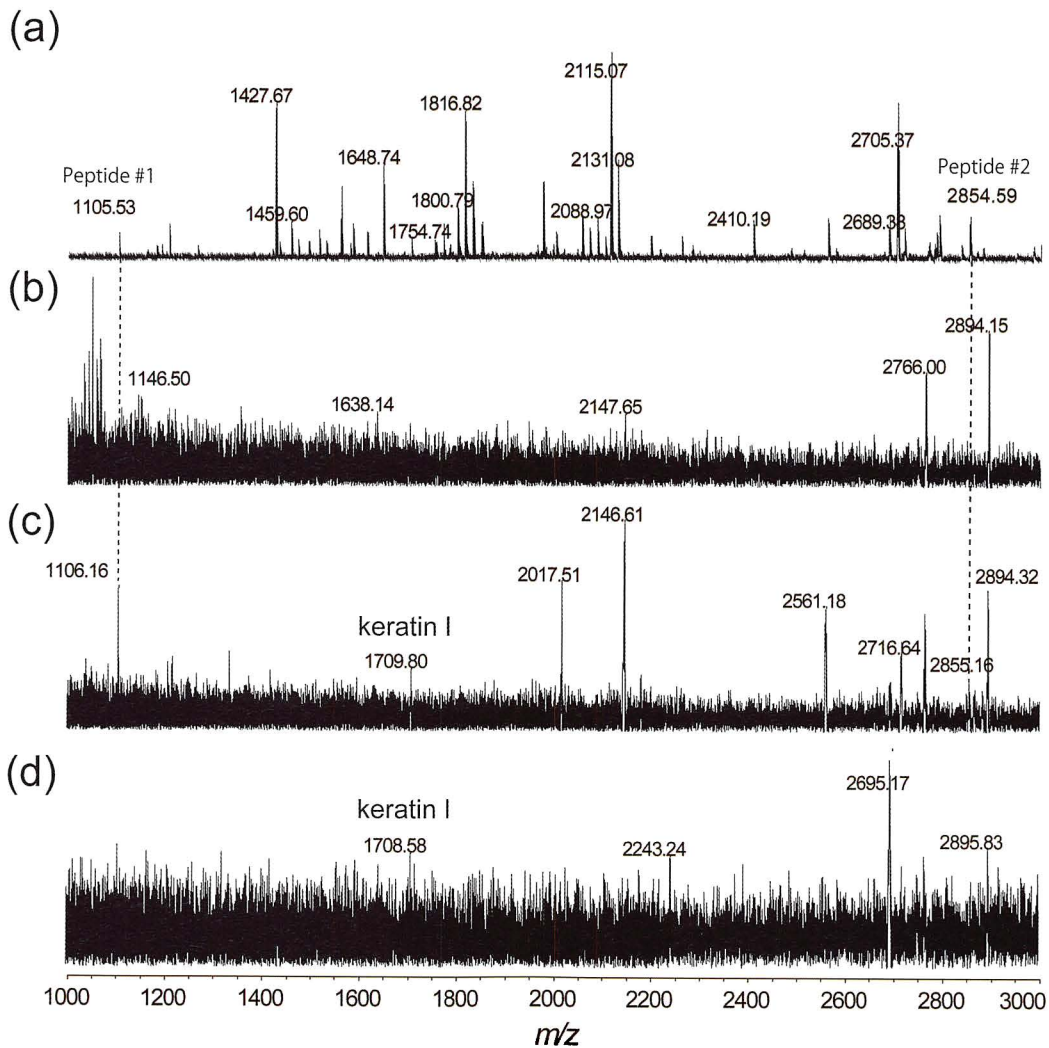


Fig. 6 ペプチド試料トリプシン分解物のMALDI-TOF MS スペクトル (m/z 1000-3000)
 (a) ウシI型コラーゲン、(b-d) SDS-PAGE ゲル内のペプチド

	m/z 1106			m/z 2855		
Egyptian Painting	-----G	VQGPPGPAGP	R-----	-----GLT	GPIGPPGPAG	APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Donkey	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGSNGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGEGTP SGPAGPTGAR
Bos taurus	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGANGAPGND	DAGPKGADGA	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Canis familiaris	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGANGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Elephant	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGSNGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGPRGLT	GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Gorilla	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGANGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGESGP SGPAGPTGAR
Rabbit	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGSNGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGEGTP SGPAGPTGAR
Mouse	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGNGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Rat	GERGFPPGERG	VQGPPGPAGP	RGNGAPGND	DAGPKGADGS	PGKDGVRLT	GPIGPPGPAG APGDKGEGTP SGPAGPTGAR
Gallusgallus	GERGFPPGERG	VQGPPGPQGP	RGANGAPGND	DPGPKGADGA	PGKDGLRGLT	GPIGPPGPAG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Frog	GERGFPPGERG	AQGPPGPQGA	RGSNGAPGND	DQGVKGSDDT	PGKDGVRLT	GPIGPPGG APGDKGEAGP SGPAGPTGAR
Danioererio	GDRGFPPGERG	APGPAGPVGA	RSPSGSAGND	DQGAKGADGA	AGKDGIRGMT	GPIGPPGPAG APGDKGESGP SGPAGPTGAR
Rainbowtrout	GDRGFPPGERG	APGPSGPAGA	RSPSGSAGND	DQGVKGADGA	GKDGVRGMT	GPIGNPAG SPGDKGEGTA PGAVGPPSGAR

Fig. 7 主な動物種のコラーゲンのペプチド配列との比較

とに、2の四角で囲った部分からウシI型コラーゲンに由来するピークが確認された (m/z 1106および2855)。続く、MALDI-TOF/TOF スペクトルの手動による解釈によって、それらのアミノ酸配列を同定することができ、それぞれGVQGP (O) PGPAGPR (m/z 1106) と GLTGPIGPPGP (O) AGAP (O) -GDKGEAGPSGPAGPTGAR (m/z 2855) と判明した。1と3の四角で囲った部分からはそのようなピ

ークは検出されなかった。

今回、同定された二種類のペプチド配列を現在データベースに登録されている主な動物種のコラーゲンの配列と比較した図を Fig. 7 に示す。各動物種の内、当該ペプチド配列を含む動物は、ウシ (*Bos taurus*)、イヌ (*Canis familiaris*)、ゾウ (*Elephant*)、マウス (*Mouse*) が当てはまる。但し、種の特定には、今後、抽出法等を再検討し、より多くのペプチ

ドを同定していく必要があるだろう。また、Fig. 7 (b) ~ (d) には、コラーゲンに由来するピーク以外にもいくつかのピークを含んでおり、今後同定していく必要がある。例えば、四角2には、ヒト Keratin 1 中の配列 (FSSC- GGGGGSFGAGGGFSGSR) に相当するペプチドが m/z 1709.80 に観測されている。ヒト Keratin 1 は主に表皮に存在するタンパク質で、分子量がおおよそ 66 kDa である。分子量マーカーと比較すると四角2の場所から検出されても不思議ではない。

今回検出された m/z 1106 のペプチドのアミノ酸配列は、8 千年前の恐竜の骨から検出されたコラーゲンの GVQGP (O) PGPQGPR (1162 Da) と一残基 (Q) の違い、 m/z 2855 のペプチドとも GLTGPIGPP (O) GPAGAP (O) GDKGEAGPSGPPGPTGAR (2878 Da) と一残基 (P) の違いを、それぞれ示すに過ぎない [Schweitzer *et al.* 2009]。これらのペプチドが存在する部分は、コラーゲン分子の中でも安定な部位に存在するとする報告例もあり、数千年の時が経過し分子の劣化が進行したにもかかわらず、試料中に残存したと考えられる [San Antonio 2011]。今後さらに分析を進めるとともに、古代エジプトにおける膠の利用について考える上での有力な視点を提供したい。

3 ガスクロマトグラフィー質量分析による壁画中の有機化合物の分析

3.1 はじめに

エジプトの色彩豊かな壁画において、その顔料は壁表面から剥離しないように接着剤を用いて固定されている。その接着剤として一般にアラビアゴム、膠または卵の白身 (卵白) が用いられたと考えられている。アラビアゴムは、アフリカのナイル地方原産のネムノキ科アカシア属アラビアゴムノキの樹皮を傷つけ、その傷口からの分泌物を乾燥させたもので、その主成分は多糖類である。膠は牛や豚の皮膚や骨、腱などのコラーゲンに熱を加え、抽出したタンパク質である。古代エジプトの壁画に膠の製造過程を示すものが描かれ、ツタンカーメンの墓から膠を用いた家具や宝石箱が出土しているため、その使用の可能性は高いと思われる。卵白は、水と油と一緒に混ぜ合わせてエマルジョンにすることができるので、中世以降は油彩画の剥落を修復するために用いられている。現在では、パラロイド B-72 というメタクリル酸エチルを主成分とするアクリル共重合体の合成高分子樹脂が用いられる。これは、文化財、美術品の修復に使用されており、イギリスの大英博

物館の要請により開発されたすぐれた接着剤で市販されている。

しかしながら、これらアラビアゴム、膠または卵の白身 (卵白) を顔料の接着剤として使用した学術的な検証はまだ少なく、その理由は、文化財としての重要性のために破壊的な分析手法が適用できないこと、高温乾燥の雰囲気下で 3000 年以上もの長い間放置されてきたので、接着剤の構成有機物が分解または菌類などに捕食されて消失した可能性などである。当時の塗装技術の知見を得るために熱分解 (Py)-GC-MS と FT-IR 法により、エジプトの棺やカートネッジ (麻、パピルス を石こうで固めた物) に使用されている色材とその接着剤を分析した報告 [Chiavari *et al.* 1995] や大理石や練りガラスなどを表面分析した報告 2 [Ribechini *et al.* 2009] がある。これらによると、蜜蝋と膠の混合物、ヤニマツ由来の植物ゴムを使用したと推定されている。他にもマケドニア人の墓と宮殿の壁画を GC-MS で分析し、植物ゴム由来のアルドース (単糖類) やウロン酸を検出した報告 [Bonaduce 2007] もある。

本報告では、有機物の高感度分析が可能なガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS) の 3 種類の測定手法、①液体注入法、②熱分解法および③反応熱分解法を用いて、壁画の接着材として使用されている可能性のある脂肪酸の検出、同定を検討した。検出感度の向上のため、今回の液体注入法では、誘導体化試薬と抽出条件を変更し、BSTFA を誘導体化試薬に用い試料を TMS 化することにより、検出感度の向上を目指した。②熱分解法では、壁画表面から削り取った試料そのものの測定を行った。最後に、検出感度の高かった TMAH (TetraMethylAmmoniumHydride) を用いた反応熱分解 (THM)-GC-MS 測定を行った。この③反応熱分解法では、熱分解法と同様に試料をそのまま用い、TMAH を誘導体化試薬として熱分解炉の中で直接メチルエステル化することにより接着成分の検出を目指した。

3.2 実験

(1) 試料及び試薬

試料は、エジプトのツナ・エル・ガバルの葬祭施設から採取した壁画小片を用いた。メタノール、*n*-ヘキサン、ジエチルエーテル、KOH、NaCl、TMAH は和光純薬製を使用した。BSTFA はシグマアルドリッチ製を使用した。

(2) 試料調製

壁画試料の赤色、白色、黒色そして緑色表面を 1.5

mg程度ずつ削り取り、マイクロテストチューブ中で10 w % KOHメタノール溶液/10 w % KOH水溶液(2/3 v/v) 1 mLを加え、60℃で3時間攪拌し、アルカリ加水分解を行った。抽出の際、エマルジョンを形成しないように、5-10%程度のNaClを添加した。n-ヘキサンで抽出したものの上澄み液に、BSTFAを20 μL添加し、60℃で3時間かけて誘導体化を行った。これを液体注入GC-MSの測定試料とした。n-ヘキサン抽出の水層をジエチルエーテルで抽出した上澄み液も同様にBSTFAで誘導体化し、測定した。コンタミネーションを確認するため、空試験(ブランク)も同様の操作で試料を調製した。

熱分解(Py)-GC-MS測定では壁画試料の表面をそのまま使用した。反応熱分解(THM)-GC-MS測定については、壁画試料にTMAHを2 μL添加したものを使用した。

(3) GC-MS測定条件

イオントラップ型のガスクロマトグラフ-質量分析計(ITQ1100-MS、ThermoFisher Scientific製)を用いた。質量校正にはPFTBA(perfluorotetrabutylamine)を用いた。測定手法は、試料を2 μL注入した液体注入法のほか、試料導入部に熱分解装置(PY-2020iD、Frontier Lab製)を設置し、削り取った壁画試料をそのまま使用した熱分解法と壁画試料にTMAHを添加した反応熱分解法を用いた。

1) 液体注入法

GC条件は、TG-5 MS(ThermoFisher Scientific製)のGCカラムを用い、GCオーブンを50℃で1分保持した後、300℃まで1分間に10℃で昇温し、300℃で15分間保持した。また、注入口温度は250℃とし、スプリットレス法により2 μL注入した。キャリアーガスの流量は1 mL/min、インターフェイス温度は300℃とした。MS部は、イオン源温度を240℃、イオン化エネルギーを70 eV、イオン化電流を250 μAとしてFull Scan MS法(m/z 50-1000)で測定を行った。

2) 熱分解法・反応熱分解法

熱分解装置は、加熱炉温度を640℃として1分間保持した。GC条件は、TG-5 MS(ThermoFisher Scientific製)のGCカラムを用い、GCオーブンを50℃で1分保持した後、320℃まで1分間に10℃で昇温し、320℃で10分間保持した。また、注入口温度は300℃とし、スプリット法により注入した。キャリアーガスの流量は1 mL/min、インターフェイス温度は300℃とした。MS部は、イオン源温度を250

℃、イオン化エネルギーを70 eV、イオン化電流を250 μAとしてFull Scan MS法(m/z 35-1000)で測定を行った。

3.3 結果と考察

(1) 液体注入法

Fig. 8に液体注入法で得られたGC-MSのトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示す。Fig. 8 a)はブランク、b)は赤色、c)は白色、d)は黒色、そしてe)は緑色の壁画表面のTICである。

得られたそれぞれのピークは、NISTライブラリーにより同定を行った。n-ヘキサンで抽出した試料溶液では、保持時間(RT)5、78、8、14、10、59、12、79 minに、GCキャピラリーカラムから溶出する環状シロキサン類が観測された。RT 14、29 min、18、26 minにフタル酸エステル類、RT 15、34 minにアジピン酸エステルの工業用添加剤と思われる汚染ピークが観測された。e)緑色の試料のみ、RT 14、95 minに3-アミノキノリン、RT 16、19 minにミリスチン酸が検出された。ジエチルエーテルで抽出した試料溶液では、GCキャピラリーカラムから溶出する環状シロキサン類のみ検出され、脂肪酸は検出されなかった。この原因としては、無極性溶媒で抽出、誘導体化を行ったため、脂肪酸のような極性成分がn-ヘキサンやジエチルエーテル溶媒層に移行しにくかったことが考えられる。

(2) 熱分解法

Fig. 9に熱分解法で得られたGC-MSのパイログラムを示す。Fig. 9 a)はブランク、b)は赤色、c)は白色、d)は黒色、そしてe)は緑色の壁画表面の測定結果を示す。

壁画試料中の成分が熱分解により炭化水素化したものや、コンタミネーションと思われるピークが観測されたが、脂肪酸を検出することはできなかった。極性をもつ脂肪酸を検出するには、ヒドロキシ基をメチル化することにより、低極性化し揮発性を上げる必要があると考えられる。

(3) 反応熱分解法

Fig. 10-1に反応熱分解法で得られたGC-MSのパイログラムを示す。Fig. 10-1 a)はブランク、b)は赤色、c)は白色、d)は黒色、そしてe)は緑色の壁画表面の測定結果である。Fig. 10-2はe)緑色の結果のRT 19、5-33 minの拡大図を示す。

ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸や、ステアリン酸など直鎖のモノカルボン酸の

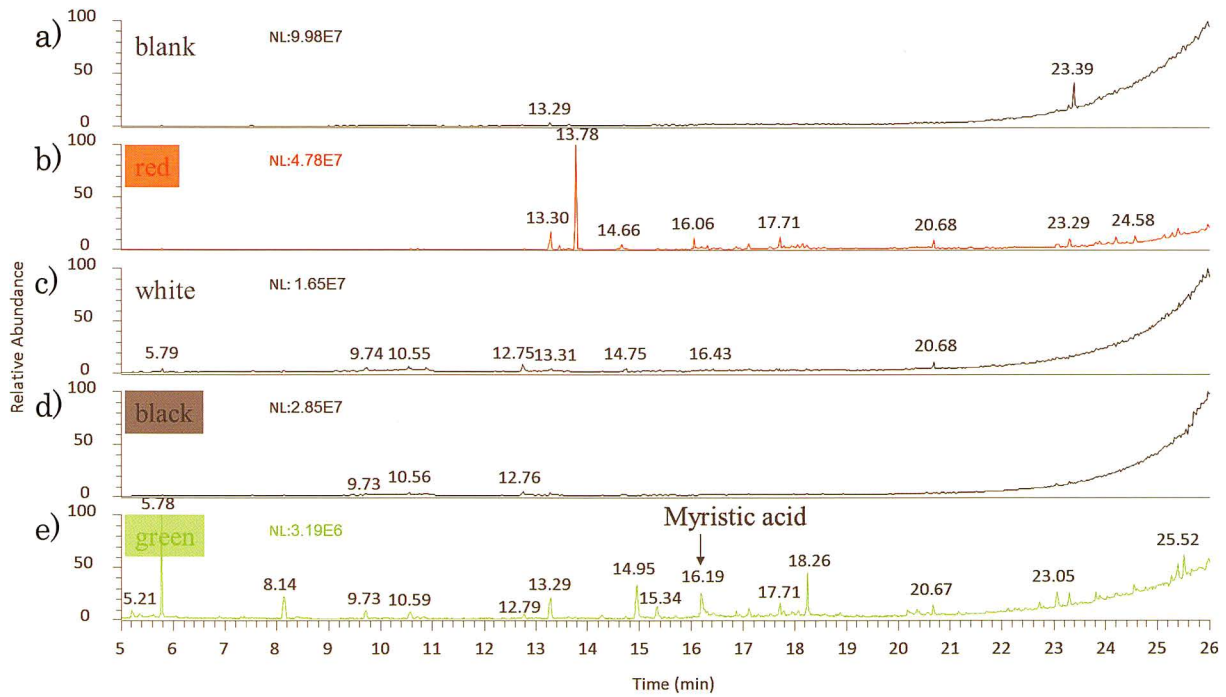


Fig. 8 GC/MS(液体注入法)によるツナ・エル・ガバル葬祭施設壁画(n-ヘキサン抽出)のクロマトグラム(TIC)

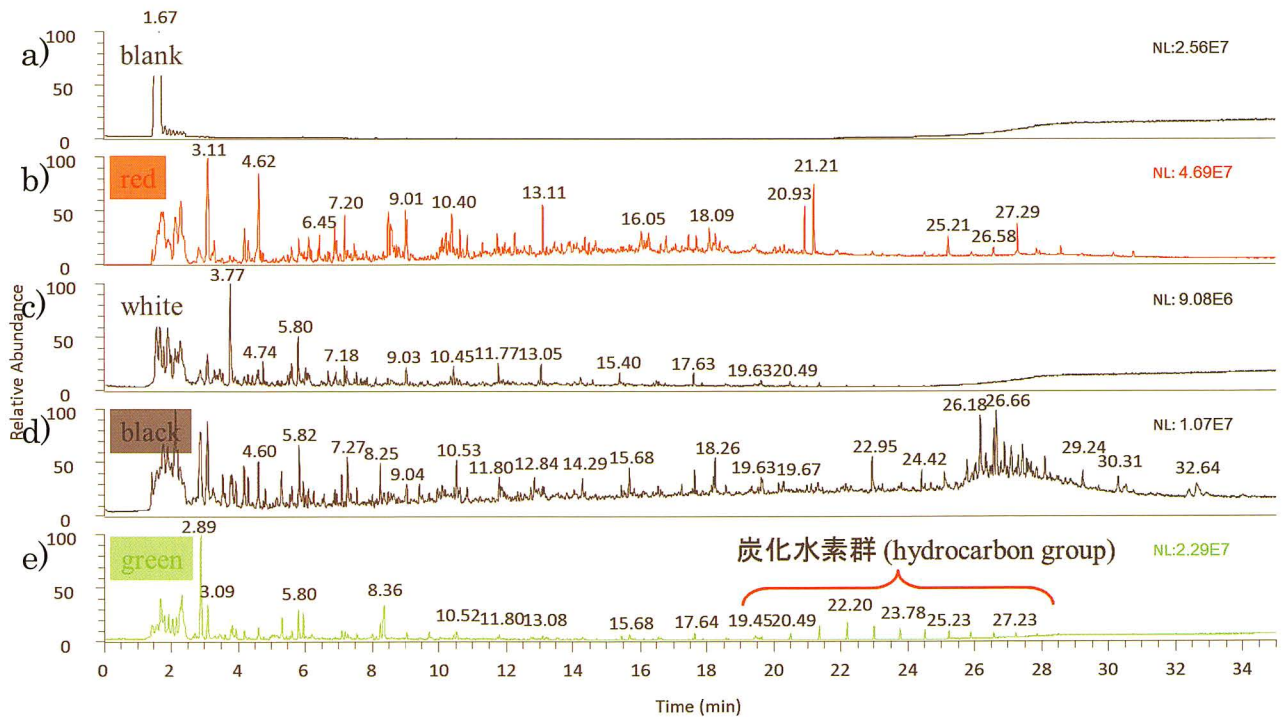


Fig. 9 Py-GC/MSによるツナ・エル・ガバル葬祭施設壁画のピログラム

メチルエステル体が主に検出されたほか、ジカルボン酸もメチルエステル体として観測された。

これらのモノカルボン酸のマスクロマトグラムにおける、各ピーク面積値をそれぞれの試料量で割り、その数値をブランク（壁画裏面の土を削り取りTMAHを入れたもの）の同じもので割って、各試料の比率を算出した。Table 1に計算結果を示す。同じプラスチック袋に試料を入れて保管しているので

あれば、ブランク比がほぼ1.0程度になると思われるので、黒色の試料はプラスチック袋由来のコンタミネーションをしている可能性がある。ラウリル酸、ミリスチン酸が多く検出している傾向が見られ、それらに共通に有するものが使用されていた可能性があると思われる。しかし、これらのモノカルボン酸類は動物性脂肪や植物油中によく含まれ、接着成分の特定はできなかった。

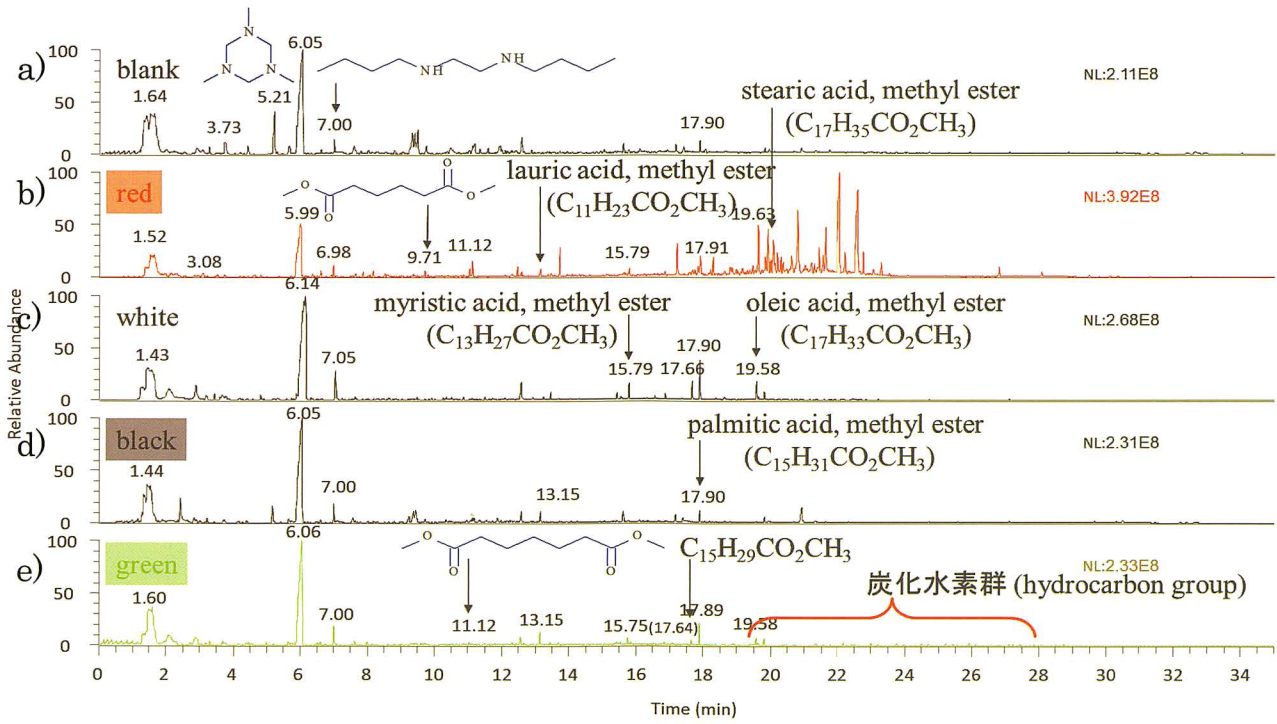


Fig. 10-1 THM-GC/MSによるツナ・エル・ガバル葬祭施設壁画のピログラム

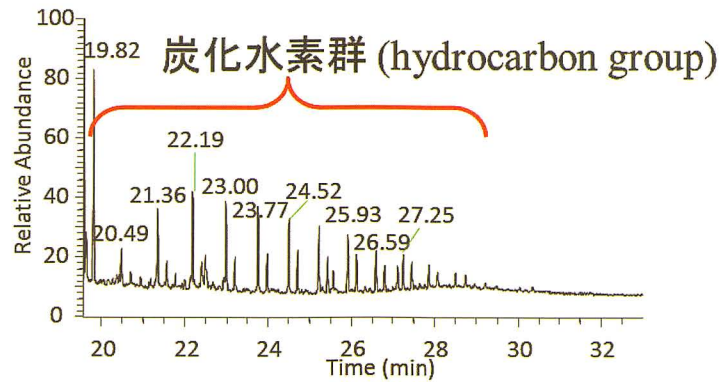


Fig. 10-2 THM-GC/MSによるツナ・エル・ガバル葬祭施設壁画のピログラム。e) greenのRT 19.5-33 minの拡大図。

Table 1 モノカルボン酸のピーク面積値比較

Fatty-acid methyl ester	赤色/ブランク	黒色/ブランク	白色/ブランク	緑色/ブランク
$C_{11}H_{23}CO_2CH_3$ (lauric acid)	12.0	2.0	16.9	6.4
$C_{13}H_{27}CO_2CH_3$ (myristic acid)	9.5	1.0	13.7	5.7
$C_{15}H_{29}CO_2CH_3$	N.D.	N.D.	-	-
$C_{15}H_{31}CO_2CH_3$ (palmitic acid)	3.0	1.1	3.8	2.5
$C_{17}H_{33}CO_2CH_3$ (oleic acid)	N.D.	N.D.	-	-
$C_{17}H_{35}CO_2CH_3$ (stearic acid)	2.2	1.7	2.1	1.5

3.4 結言

今回 GC-MS の 3 種類の測定手法を検討したが、加水分解による抽出を行った GC/MS (液体注入法) と Py-GC/MS 測定では、ほとんど何も検出されなかった。THM-GC/MS では脂肪酸メチルエステルが検出され、なかでもラウリル酸およびミリスチン酸メチルエステルが各色の壁画表面から多く検出された。しかし、これらが壁に顔料を接着している成分と断

定することはできず、接着剤に用いられた成分の識別はできなかった。いずれの測定法においてもコンタミネーションの検出が目立ったので、接着成分の検出感度を向上させるには、試料採取時などにおける人為的汚染をなくす必要があるといえる。3 種類の測定法のなかでは、反応熱分解 (THM) -GC-MS が脂肪酸の検出に対して感度が高く、最も適していた。

参考文献

- Bonaduce, I., H. Brecoulaki, M. P. Colombini, A. Lluveras, V. Restivo, and E. Ribechini 2007. "Gas Chromatographic-mass Spectrometric Characterisation of Plant Gums in Samples from Painted Works of Art." *J.Chromato. A* 1175, 275-282.
- Chiavari, G., D. Fabbri, G. C. Galletti and R. Mazzeo. 1995. "Use of Analytical Pyrolysis to Characterize Egyptian Painting Layers" *Chromatographia* 40, 594-600.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature* 227, 680.
- Mary, H. Schweitzer, W. Zhengl, C. L. Organ, R. Avci, Z. Suo, L. M. Freimark, V. S. Lebleu, M. B. Duncan, M. G. V. Heiden, J. M. Neveu, W. S. Lane, J. S. Cottrell, J. R. Horner, L. C. Cantley, R. Kalluri and J. M. Asara. 2009. "Biomolecular Characterization and Protein Sequences of the Campanian Hadrosaur *B. Canadensis*," *Science* 324, 626.
- Ribechini, E. S. Orsini, F. Silvano and M. P. Colombini. 2009. "Py-GC/MS, GC/MS and FTIR investigations on Late Roman-Egyptian adhesives from opus sectile: new insights into ancient recipes and technologies." *Anal. Chim. Acta* 638, 79-87.
- San Antonio, J. D. 2011. "Dinosaur Peptides Suggest Mechanisms of Protein Survival," *PLoS One* 6, 20381.
- 久富広隆、浅井重博、川崎英也、アフメド・シュエイブ、吹田浩、荒川隆一 2010 「ガスクロマトグラフィー質量分析による壁画中の有機化合物の分析」『Semawy Menu (セマウイ・メニュー) (関西大学文化財保存修復研究拠点紀要)』、Vol. 2、103-109。