

文章编号:1005-1538(2024)06-0103-08
DOI: 10.16334/j.cnki.cn31-1652/k.20230302846

基于气相色谱-质谱联用法研究考古土壤老化 对文物中蛋白胶结材料鉴定的影响

马珍珍^{1,2,3}

[1. 陕西省考古研究院, 陕西西安 710109;

2. 考古发掘现场文物保护国家文物局重点科研基地(陕西省考古研究院), 陕西西安 710109;

3. 陕西省考古现场文物保护重点实验室(陕西省考古研究院), 陕西西安 710109]

摘要: 蛋白胶结材料历经土壤埋藏老化, 会流失明显、降解严重, 氨基酸含量或多或少地发生改变, 以致影响气相色谱-质谱联用法(GC-MS)对蛋白胶料的鉴定。为提高该分析方法的准确性, 本研究通过模拟文物绝氧、避光、低温的考古埋藏环境, 对动物胶原、蛋类和牛奶这3类常见蛋白胶料进行为期一年的土壤老化, 利用GC-MS测试11种氨基酸含量变化并分析其箱式图、主成分聚类(PCA)图的分布特点。结果表明, 3类胶的脯氨酸(Pro)、天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)含量增高, 丝氨酸(Ser)含量降低; 猪皮胶的甘氨酸(Gly)和羟脯氨酸(Hyp), 蛋类、牛奶的异亮氨酸(Ile)和苯丙氨酸(Phe)含量减少。上述变化导致3类胶的氨基酸箱式图分布、PCA图聚类位置出现一定改变, 但可辨识度依旧很强。基于上述研究结果鉴定出西安郭杜唐墓壁画、彩绘陶器颜料层中存在动物胶原。该研究提高了GC-MS鉴定彩绘文物蛋白胶料的准确性, 为后期探讨彩绘文物劣化机理、选择合适保护修复材料提供科学依据。

关键词: 彩绘文物; 考古土壤老化; 蛋白胶料; GC-MS; 鉴定

中图分类号: K876.9 **文献标识码:** A

0 引言

蛋白胶料是我国古代彩绘文物的一种传统天然胶粘剂, 对色彩的保留至关重要。准确辨别蛋白胶料种类不仅可丰富研究者对文物材料的认知, 更是践行“原材料、原工艺”文物保护原则、选择合适加固剂的基础。目前, 国内外文物分析研究者已经将微量化学试验法、免疫法、光谱分析法、质谱法和色谱法等方法用于胶结材料的分析。微量化学试验法简单易操作, 但特异性较差, 无法细分同一类别物质; 免疫法具有特异性高、灵敏度高的特点, 但易受老化影响, 对实验室配置、环境洁净度等要求极高; 红外、拉曼等光谱分析法前处理简单, 但不能细分胶料种类, 需要和其他仪器配合使用以互相验证, 且无机物常常会干扰有机物的吸收; 质谱(MS)技术不仅可检测到样品分子的结构信息, 且不需要前处理, 成为胶结材料分析和表征的重要手段。但文物样品成分十分复杂, 常给质谱分析带来较多干

扰, 因此, 常将质谱同气相色谱(GC)或液相色谱(LC)这些分离方法联用, 虽然联用方法的样品前处理相对复杂, 但因其极优的分离效能和极高的灵敏度仍然是目前常见的胶料分析手段^[1]。其中, GC-MS可定性、定量测定氨基酸含量, 是区分动物胶原、蛋类和牛奶(氨基酸含量分布特征不同)等常见蛋白胶料的国际通用方法^[2-4]。课题组前期方法学实验表明, GC-MS法对11种氨基酸的分离效果较好, 氨基酸定量标准曲线线性关系良好, 相对标准偏差2.7%~6.3%, 检出限0.066~0.676 μg/g, 对蛋白胶料鉴定准确性高, 适用于文物蛋白胶料的氨基酸定量分析^[5]。

我国出土的大量彩绘文物历经千百年地下土壤埋藏后, 蛋白胶料流失明显、降解严重, 氨基酸含量或多或少地发生了改变, 但目前GC-MS鉴定文物蛋白胶料多采用新鲜样本作为参考标准^[6-8], 这将影响分析的准确性。Bonaduce^[9]、Regert^[10]等指出新鲜标准有机物的地下模拟老化是研究考古

收稿日期:2023-03-14; 修回日期:2024-01-11

基金项目:国家自然科学基金资助(52072228), 国家重点研发计划资助(2022YFF0903805), 四川省科技计划项目资助(2022YFS0558)

作者简介:马珍珍(1990—), 女, 副研究员, 考古出土现场文物保护与分析, E-mail: mazhenhappy1990@163.com

出土未知有机物的重要前提,因此,对已经土壤埋藏老化后的胶料进行准确分析,是彩绘文物蛋白胶料 GC-MS 分析的瓶颈问题。然而,由于蛋白胶料地下降解与自身材质、埋藏环境等因素密切相关^[11-12],研究比较复杂,国内相关报道十分匮乏。因此,对常见蛋白胶料土壤埋藏老化前后各种氨基酸含量变化的研究尤为迫切。我国大多数考古遗址几乎均深埋,位置处于底土层,该层一般位于土体表面 50~60 cm 以下,土体紧实,物质代谢缓慢,可利用的营养物质少,且地表气候很难影响到该层^[13]。整个环境几乎绝氧、避光、低温,成为一个相对稳定的密闭系统。因此,本研究以绝氧、避光、低温的密闭考古土壤埋藏环境(选用韩休唐墓墓葬土)为典型代表进行实验。利用 GC-MS 法探索猪皮胶、全蛋、蛋清、蛋黄和牛奶 5 种常见蛋白胶料在上述考古埋藏环境下老化一年后氨基酸含量的变化,该工作将为准确鉴定考古出土的文物蛋白胶料及后期探讨彩绘文物劣化机理、选择合适的保护修复材料提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 仪器与材料

7890A-5975C GC-MS(美国安捷伦科技公司),KQ-50E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Anke LXJ-IIB 型离心机(上海安亭科学仪器厂),Bond Elut OMIX 100 μ L SPE C4 柱(美国安捷伦科技有限公司),100 μ L 手动移液器(北京卓信伟业科技有限公司),MDS-8G 型微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司),TB-215D 电子天平(美国丹佛仪器公司)。

GC-MS 所需试剂同文献[14]所述,依据《齐民要术》传统制胶技术熬制实验所需猪皮胶^[15]、市售全蛋、蛋清和蛋黄(机械分离全蛋获得)、银桥全脂牛奶,陕西韩休唐墓墓葬土若干、铁粉(天津东丽区天大化学试剂厂,分析纯)、蜡、二次蒸馏水、玻璃密封罐、0.2 mm 孔径筛。

1.2 样品制备

1.2.1 新鲜蛋白胶样的制备 称取不同质量的猪皮胶、全蛋、蛋清、蛋黄和牛奶,使其均含有 0.6 g 蛋白质。其中,猪皮胶使用二次蒸馏水溶解后涂刷于载玻片上,其余 4 种胶直接施于载玻片上,阴干后备用。每种胶制备 4 组平行样,其中 2 组作为新鲜样品(1.3 中新鲜蛋白胶样的目标分析物),2 组用于 1.2.2 考古土壤埋藏老化蛋白胶样的制备。

1.2.2 考古土壤埋藏老化蛋白胶样的制备 选择陕西韩休唐墓墓葬土作为本研究考古土壤埋藏老化实验的土壤(含水率 12%,pH:6.46),取 1.2.1 制备好的 2 组样品,按照胶料种类分别埋入 5 个密封罐内,分 3 层铺置铁粉(总质量的 10%)^[16],压实、罐口蜡封,防止罐内氧气、水分与外界交换。将密封罐遮黑后置于冰箱冷藏室(5 $^{\circ}$ C)保存,使模拟样品处于绝氧、避光、低温的稳定环境。存放一年后,取出罐体,在阴凉、避光处小心、迅速清理胶样(1.3 中考古土壤埋藏老化蛋白胶样的目标分析物),避免环境突变影响样品,置于冰箱中冷藏备用。

1.3 GC-MS 测试方法

分别取 1.2.1 新鲜蛋白胶样和 1.2.2 考古土壤埋藏老化蛋白胶样中 2 个载玻片的 2 处样品,即每种胶样各 4 个样本,按照课题组已发表的 GC-MS 测试条件^[17]以及针对蛋白质复杂性探索出的萃取、SPE C4 排杂、水解、衍生进样的优化步骤进行 GC-MS 的前处理和分析,每个样品连续进样 3 针(低、中、高 3 个浓度,1 μ L、7 μ L、11 μ L 的水解液),即每种胶共计 12 针。获取每种胶新鲜和老化状态下的 12 组 GC-MS 测试结果,计算样品中所含 11 种氨基酸(丙氨酸:Ala,甘氨酸:Gly,缬氨酸:Val,亮氨酸:Leu,异亮氨酸:Ile,丝氨酸:Ser,脯氨酸:Pro,苯丙氨酸:Phe,天冬氨酸:Asp,谷氨酸:Glu,羟脯氨酸:Hyp)的平均质量百分含量(后文统一简称含量)。

2 结果和讨论

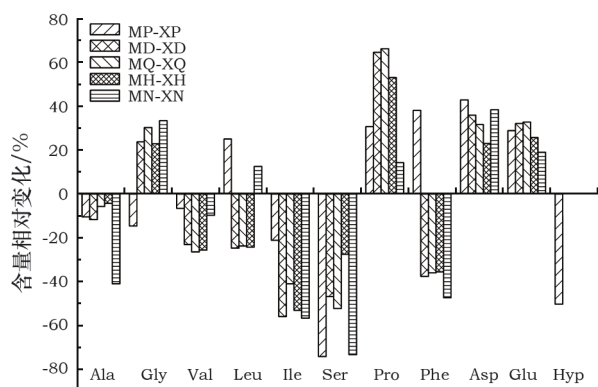
2.1 氨基酸含量变化的规律

为了直观地观察每种胶料在考古土壤埋藏前后各氨基酸含量的变化趋势,计算含量的相对变化差(图 1),可得如下规律:1)相同点:5 种胶的 Pro、Asp 和 Glu 含量均升高,平均相对增量分别为 45.74%、34.37% 和 27.69%;Ser 含量呈降低趋势,平均相对减少 54.88%;Ala、Val 含量无明显变化。2)不同点:猪皮胶 Gly 及特征 Hyp 含量降低,前者减少了 14.69%,后者降幅超过 50%;蛋类和牛奶的 Ile 和 Phe 含量减少。

考古土壤埋藏老化一年后,5 种胶料的各氨基酸含量发生了变化,其原因探讨如下:

1) 所有胶料的 Asp、Glu 含量升高。脱酰胺是蛋白质老化无需酶参与的一种自发化学反应^[18],含有酰胺基的天冬酰胺(Asn)和谷氨酰胺(Gln)

会自发转变为相应的氨基酸 Asp 和 Glu,使后两者含量升高。国外已发表了文物的相关老化研究,如 Bonaduce 等^[19]利用蛋白质组学从分子层面发现比萨纪念墓园壁画蛋白胶中 Asn 和 Gln 发生脱酰胺作用后的肽段,指出这是蛋白胶料地下埋藏老化的重要标志。Welker 等^[20]使用肽质量指纹图谱法量化了 Gln 脱酰胺成为 Glu 的程度,指出法国屈安塞 Châtelperronian 旧石器及全新世早期遗址中 543 个残留骨样 Gln 的脱酰胺程度有明显的地域特征。



MP: 老化猪皮胶; XP: 新鲜猪皮胶; MD: 老化全蛋;
XD: 新鲜全蛋; MQ: 老化蛋清; XQ: 新鲜蛋清; MH: 老化蛋黄;
XH: 新鲜蛋黄; MN: 老化牛奶; XN: 新鲜牛奶(后文同)

图1 5种蛋白胶料考古土壤埋藏老化前后的氨基酸含量变化图

Fig. 1 Variation of the amino acid contents of the five binders before and after aging in soil

2) 所有胶料的 Pro 含量升高。由于存在吡啶环,Pro 构象变化小^[21]、结构非常稳定,不易产生物理、化学和生物降解。因此,在其他氨基酸含量降低的情况下,归一化后的 Pro 含量呈相对升高趋势。

3) 所有胶料的 Ser 含量降低。Ser 分子中含有亲水性极高的 -OH,在土壤埋藏过程中,极易出现水解使得 Ser 含量降低,同时也削弱所形成的氢键作用^[22]。

4) 猪皮胶的 Gly、Hyp 含量明显降低。胶原多肽链基本由重复出现的 Gly - X - Y 三肽段构成, Gly 残基位于螺旋中心轴位置,Pro 多处于 X 位, Hyp 基本处在 Y 位,Pro 和 Hyp 与外界环境更接近^[23]。因此,Pro、Hyp 更易受到土壤中水、酸、碱、盐、微生物等的侵蚀。但因 Pro 自身的强稳定性,所受影响小;而 Hyp 侧链的 -OH 使其亲水性极强,降解的速度快。随着表面 Hyp 等亲水性氨基酸的流失, Gly 逐渐暴露,与其他疏水性氨基酸相比, Gly 的疏水性指数最低^[24],与外界更容易产生交换,进而导致其

含量降低。

5) 蛋类、牛奶的 Ile、Phe 含量有不同程度的减少。蛋清所含卵清蛋白有高达 50% 的疏水性氨基酸^[25];蛋黄的卵黄脂磷蛋白具有强疏水性,卵黄高磷蛋白核心为亲水区域、两端则为典型疏水平面^[26];牛奶的主要酪蛋白胶束是由少量亲水性氨基酸和大量疏水性氨基酸组成的嵌段型共聚物,具有很强疏水性^[27]。从上述结构特征看出,蛋类和牛奶大量分布在外侧的疏水性氨基酸将会首先受到外部侵蚀,因此,强疏水性氨基酸 Ile、Phe^[24]含量降低。

2.2 氨基酸箱式图分布特征的变化规律

由 5 种胶的氨基酸箱式图(图 2)可清晰看出,虽然氨基酸含量出现变化,但没有明显影响种间差异分布特征,其规律如下:1) Ala 含量为猪皮胶和蛋类 > 牛奶, Val 含量为牛奶 > 蛋类 > 猪皮胶。2) 虽然猪皮胶老化后 Gly 含量降低,但依旧领先于蛋类和牛奶, Leu 含量分布特征恰好相反。3) 蛋类高 Ser、Phe、Asp、低 Pro,猪皮胶、牛奶低 Ser、Phe、Asp、高 Pro 的含量特征依旧存在。4) Glu 基本相同的增幅使得相对分布(牛奶 > 蛋类 > 猪皮胶)规律未变,且牛奶高含量 Glu 特征更加凸显。5) 老化前后,仅猪皮胶含有 Hyp,它是鉴定动物胶原的标志性特征。6) 受到老化影响, Ile 含量的分布规律变得不明显。

2.3 对胶料主成分分析鉴定的影响研究

主成分分析(Principal Component Analysis,缩写 PCA)是一种对数据进行降维处理的统计学方法,已广泛应用于文物蛋白胶料的鉴定中^[28-29]。将实验所得 5 种新鲜和老化蛋白胶料的氨基酸含量导入 SPSS 中,采用因子分析法进行处理,提取因子特征根 > 1 的前两个因子,累积贡献率 80.62%,做散点图 3。由图可见,土壤埋藏老化后 5 种胶的 PCA 位置出现了一定改变,但聚类特征依旧明显。

由因子载荷矩阵图(图 4)可知:1) 高含量 Gly、Hyp 是引起 Factor 1 轴负方向移动的主要原因, Leu、Ile 反之;2) Pro 含量高,引起 Factor 1、2 轴负方向移动, Ser、Phe、Asp 反之;3) 高含量的 Glu、Val 引起 Factor 1 轴正向、Factor 2 轴负向的移动, Ala 反之。

结合上述因子载荷矩阵图和 2.1 氨基酸含量变化规律可对几种胶料老化后 PCA 位置的变化进行解释:1) 猪皮胶老化后, Pro、Glu 含量升高, Ser 含量降低导致 PCA 位置向 Factor 2 轴负向(下方)移动, Gly、Hyp 含量降低导致 PCA 位置向 Factor 1 轴正向(右方)移动。因此,猪皮胶老化后 PCA 位置向右下

方移动。2) 蛋类和牛奶老化后, Pro、Glu 含量增加和 Ser、Phe、Ile 含量减少导致 PCA 位置向 Factor 1、

Factor 2 轴负向移动, 即蛋类和牛奶老化后 PCA 位置向左下方移动。

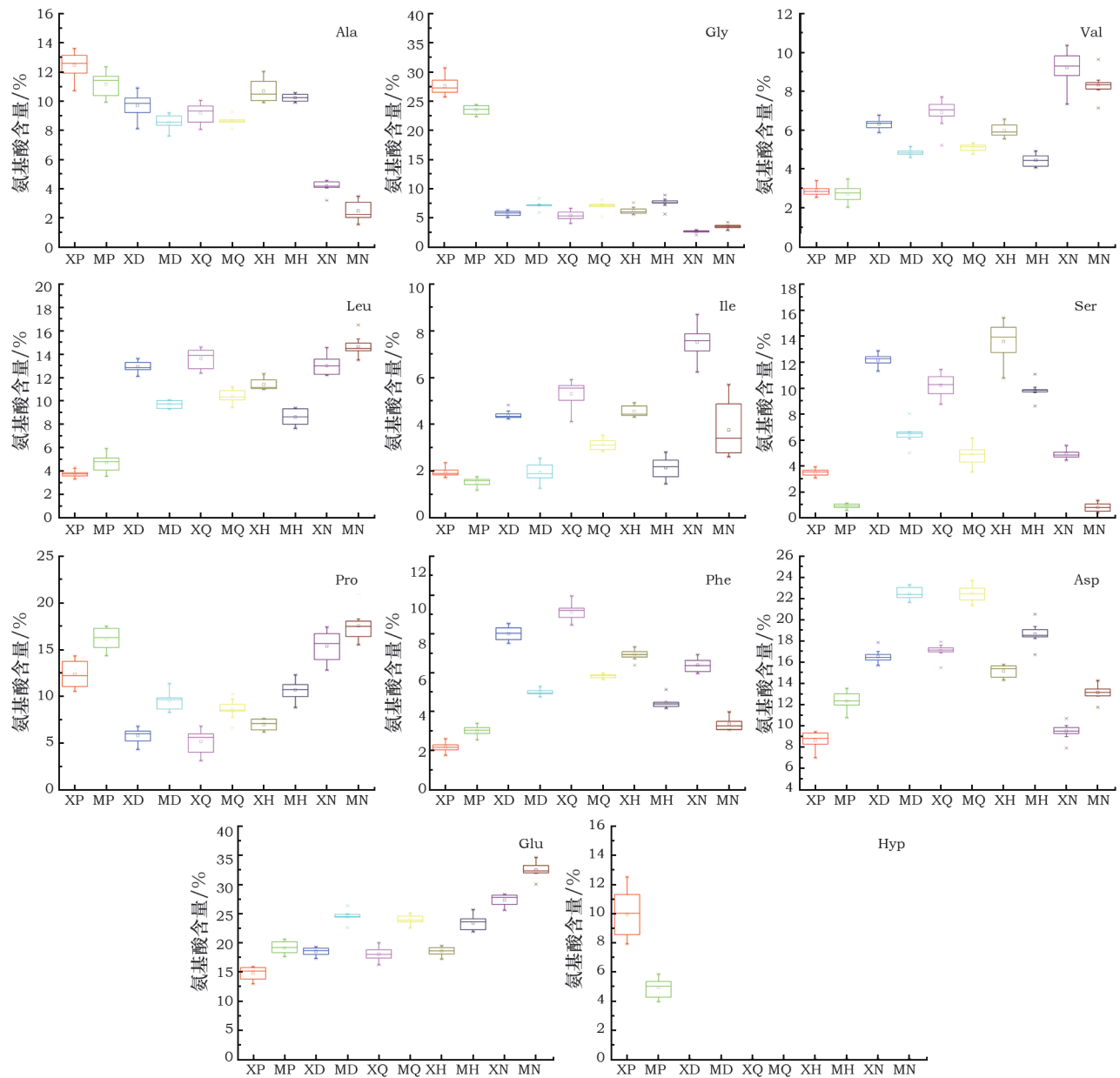


图 2 5 种蛋白胶料考古土壤埋藏老化前后氨基酸含量的箱式图

Fig. 2 Box plots of the amino acid contents of the five binders before and after aging in soil

2.4 文物样品 GC-MS 分析鉴定

基于上述研究,以考古土壤埋藏老化的胶料为标准胶料,利用建立的氨基酸 GC-MS 分析结果对西安 2 处出土唐墓壁画、彩绘陶器样品(表 1)的胶料种类进行了鉴定。表 2 为所得氨基酸含量,可看到它们都含有标志性氨基酸 Hyp,据 2.2 中 5) 讨论可知样品中均含有动物胶原;特别是 WKH-M5 的 Gly 含量高达 26.46%,据 2.2 中 2) 所述,推测其为动物胶原的可能性极大。

由样品的因子作散点图(图 5)可知:1) WKH-M5 恰巧落于土壤老化猪皮胶区域,与初步推断相符,进一步证实了该样品胶料为动物胶原。2) WKL-M6 介于土壤埋藏老化猪皮胶和蛋类之间,可能为两者的混合物;但其更靠近老化猪皮胶,也极可能为动物胶原。由于该样品位于动物胶原和蛋类的土壤埋藏老化方向,推测 1 年时间的埋藏模拟实验可能太短,更长时间的模拟实验探索将有助于文物样品胶料种类的更精准鉴定。

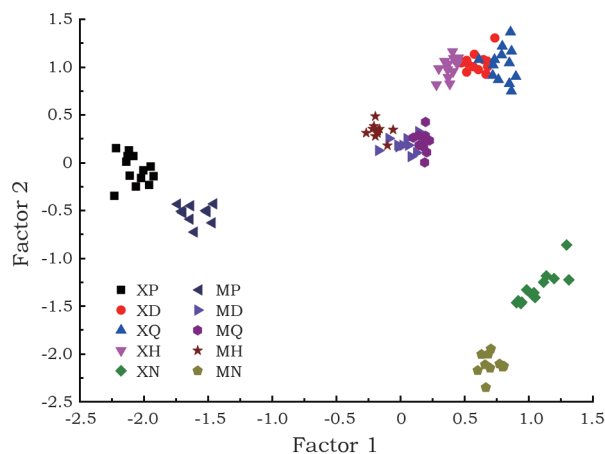


图 3 5 种蛋白胶料考古土壤埋藏老化前后的 PCA 图
Fig. 3 PCA graph of the five binders before and after aging in soil

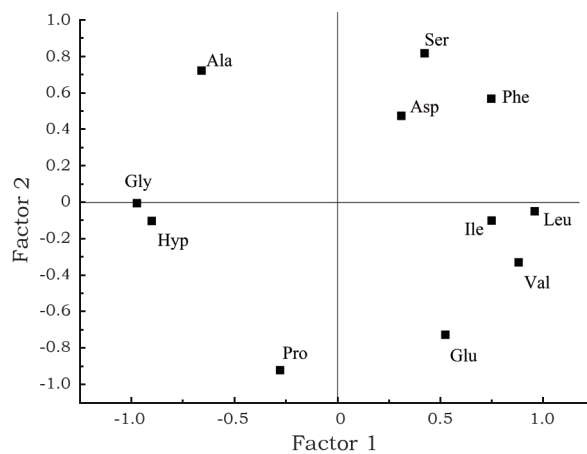


图 4 5 种蛋白胶料考古土壤埋藏老化前后的因子载荷矩阵图
Fig. 4 Factor loading graph of the five binders before and after aging in soil

表 1 文物样品信息

Table 1 Information of the samples


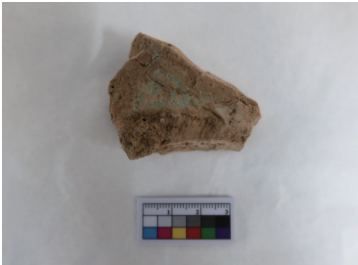
来源	墓葬形制	描述	时代	编号	形貌
西安郭杜万科 M5 壁画	四天井四壁龕砖券单室壁画墓	红色颜料	唐代	WKH - M5	
西安郭杜万科 M6 1#陶片	三天井双壁龕砖券前、后双室壁画墓	绿色颜料	唐代	WKL - M6	

表 2 文物样品氨基酸含量

Table 2 Amino acid contents of the samples

(%)

样品	Ala	Gly	Val	Leu	Ile	Ser	Pro	Phe	Asp	Glu	Hyp
WKH - M5	8.79	26.46	3.18	5.31	2.08	2.61	20.79	2.83	7.99	15.63	4.33
WKL - M6	8.70	16.47	2.85	9.94	2.50	6.02	20.14	4.90	7.13	17.26	4.09

2.5 讨论

《齐民要术》煮胶中指出,古代常将牛皮、猪皮、驴皮、马皮、骡皮这些动物胶原作为胶结材料^[15]、《营造法式》第十四卷彩画调色使用的也是主成分为动物胶原的鳔胶^[30],本研究的 2 个文物样品均采用动物胶原,符合文献记载。另外,样品中可能存在

将动物胶原和蛋类混合在一起使用的做法,这在欧洲壁画等艺术品制作中极为盛行,如皮洛斯 Nestor 宫殿中迈锡尼文明壁画彩绘^[31]和 15 世纪意大利著名帕尔马教堂壁画^[32]的胶结材料均由动物胶原和蛋类构成,两者混合胶在我国兵马俑、建筑壁画等彩绘文物中也有发现^[8,33]。动物胶原具有十分稳定的

三螺旋结构,粘接强度大;蛋类包含多种脂类物质,干燥后可形成具有防水性的弹性薄膜;食品领域同样报道,脂类富含疏水性物质,可有效阻止水分的迁移,通过与蛋白质复合,可明显改善蛋白膜的阻湿性^[34];且蛋黄中的卵磷脂是一种功效强大的稳定剂,可与颜料形成稳定性强、分散良好的乳液,能保证画面长久的色泽鲜亮,颜料保存更为持久^[35]。Daniilia^[36]研究表明,蛋类和少量动物胶的混合物可增强颜料的凝聚力度。因此,混合膜有力结合了动物胶原高强度和蛋类防水性、提亮画面等优点,使得混合膜性能优化,这可能也是古代工匠选择混合胶的奥妙所在。

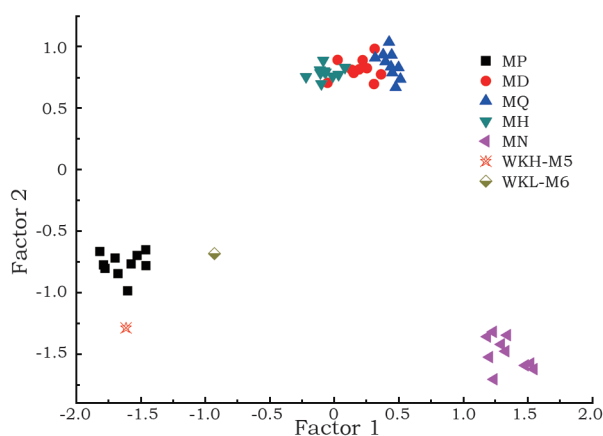


图 5 文物样品的 PCA 图

Fig. 5 PCA graph of the relic samples

值得注意的是,本研究只是考古土壤老化对文物蛋白胶结材料 GC - MS 鉴定影响的初步研究,由于蛋白胶结材料的复杂性,后期应结合扫描电子显微镜、红外光谱、质谱成像等其他分析方法进行微观形貌、官能团、二级结构、蛋白质空间分布等多维度、多角度的联合分析,同时应扩大不同时代的文物样本数,对不同程度被土壤影响的文物进行比较分析,以准确全面评估土壤老化对文物中蛋白胶结材料的影响。

3 结 论

考古土壤埋藏老化对动物胶原、蛋类和牛奶 3 类蛋白胶料 GC - MS 鉴定结果影响的研究发现:1) 蛋白胶料的 Ser、Gly、Hyp 等氨基酸含量降低,Pro、Asp、Glu 含量增加,但 3 类蛋白胶仍具有极强的可辨识度。其中,猪皮胶 Gly 含量高、含特征 Hyp;蛋类 Ser、Asp 含量高;牛奶高 Glu 含量更加突出;蛋类和牛奶 Leu 含量高。3 类蛋白胶料的 PCA 位置出现改变,但聚类特征迥异,可辨识度依旧很强,该结果

一定程度上提高了彩绘文物蛋白胶料 GC - MS 鉴定的准确性。2) 将上述结果用于西安郭杜出土唐墓壁画、彩绘陶器颜料层的鉴定,发现均使用了动物胶原作为胶结材料。3) 本研究是考古土壤埋藏对蛋白胶料 GC - MS 分析影响的有益尝试,不仅加深了对蛋白胶料考古土壤埋藏老化的科学认知,而且为彩绘类文物后期选择合适加固保护材料奠定了理论基础。4) 本研究土壤埋藏模拟实验还存在一定局限性,后期一方面应继续开展蛋白胶料土壤埋藏的阶段分析,厘清劣化规律;另一方面也可建立考古出土不同时代、不同地域蛋白胶料的 GC - MS 数据库,并结合其他分析方法对成分和性质进行联合研究。

参考文献:

- [1] 马珍珍. 中国古代彩绘文物蛋白胶料气质联用鉴定技术的优化研究[D]. 西安:西北大学,2018.
MA Z Z. The optimization of the GC - MS analysis in proteinaceous binding medium of the Chinese ancient polychromy relics [D]. Xi'an: Northwest University, 2018.
- [2] TENORIO A L, NASA J L, FERRIANI B, *et al.* The chemistry of pastels: investigation of the organic materials in a drawing by Umberto Boccioni [J]. *Journal of Cultural Heritage*, 2019, **35**: 235 - 241.
- [3] FILICAIA E G D, EVERSHERD R P, PEGGIE D A. Review of recent advances on the use of mass spectrometry techniques for the study of organic materials in painted artworks[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, **1246**: 340575.
- [4] MA Z Z, WANG L Q, YANG L, *et al.* The influence of the soil aging exerting on the stability of proteinaceous binders in Chinese polychromy artworks [J]. *Microchemical Journal*, 2020, **157**: 104955.
- [5] 王子铭,王丽琴,马珍珍,等. 文物蛋白胶料的气相色谱质谱分析方法探讨[J]. *质谱学报*, 2019, **40**(4): 335 - 341.
WANG Z M, WANG L Q, MA Z Z, *et al.* Methodological study of proteinaceous binders in artworks by GC - MS [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2019, **40**(4): 225 - 241.
- [6] RAIMONDI V, ANDREOTTI A, COLOMBINI M P, *et al.* Test measurements on a secco white - lead containing model samples to assess the effects of exposure to low - fluence UV laser radiation [J]. *Applied Surface Science*, 2015, **337**: 45 - 57.
- [7] 严静,马珍珍,赵西晨,等. 唐武惠妃墓出土疑似胶结材料的分析研究[J]. *文物保护与考古科学*, 2017, **29**(6): 33 - 40.
YAN J, MA Z Z, ZHAO X C, *et al.* Study on the binding medium in the wall paintings of the tomb of Wuhuiwei in Shannxi [J]. *Sciences of Conservation and Archaeology*, 2017, **29**(6): 33 - 40.
- [8] 杨璐,黄建华,申茂盛,等. 秦始皇兵马俑彩绘胶料的气相色谱 - 质谱联用分析[J]. *分析化学*, 2019, **47**(5): 695 - 701.
YANG L, HUANG J H, SHEN M S, *et al.* Analysis of binding media of the polychrome Terracotta and Horses of Qin Shihuang by

- gas chromatography - mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, **47**(5):695 - 701.
- [9] BONADUCE I, RIBECINI E, MODUGO F, *et al.* Analytical approaches based on gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) to study organic materials in artworks and archaeological objects [J]. Topics in Current Chemistry, 2016, **374**(6):291 - 327.
- [10] REGERT M, GARNIER N, DECAVALLAS O, *et al.* Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments [J]. Measurement Science and Technology, 2003, **14**:1620 - 1630.
- [11] COLOMBINI M P, MODUGNO F. Organic mass spectrometry in art and archaeology [M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2009: 256.
- [12] SAKR A A, GHALY M F, ALI M F, *et al.* Biodeterioration of binding media in tempera paintings by *Streptomyces* isolated from some ancient Egyptian paintings [J]. African Journal of Biotechnology, 2013, **12**(14):1644 - 1656.
- [13] 马克伟. 土地大辞典 [M]. 长春: 长春出版社, 1991: 120.
MA K W. The great dictionary of land [M]. Changchun: Changchun Press, 1991: 120.
- [14] 马珍珍, 王丽琴, 杨璐, 等. 固相萃取 C4 技术在文物蛋白胶结气相色谱前处理中的应用 [J]. 分析实验室, 2017, **36**(10): 1127 - 1131.
MA Z Z, WANG L Q, YANG L, *et al.* The study of the SPE C4 technology in the artwork proteinaceous binding medium analysis with gas chromatography [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2017, **36**(10):1127 - 1131.
- [15] 贾思勰. 齐民要术校译 [M]. 缪启愉, 校译. 北京: 中国农业出版社, 1982: 461 - 465.
JIA S X. *Qi Ming Yao Shu* correction [M]. MIAO Q Y. Beijing: China Agriculture Press, 1982: 461 - 465.
- [16] 郭建波, 王丽琴, 韩明, 等. 关中地区土壤含水率对丝织品老化的影响 [J]. 纺织学报, 2013, **34**(11):66 - 70.
GUO J B, WANG L Q, HAN M, *et al.* Effects of soil moisture content in Guanzhong area on ageing of silk fabrics [J]. Journal of Textile Research, 2013, **34**(11):66 - 70.
- [17] MA Z Z, YAN J, ZHAO X C, *et al.* Multi - analytical study of the suspected binding medium residues of wall paintings excavated in Tang tomb, China [J]. Journal of Cultural Heritage, 2017, **24**: 171 - 174.
- [18] ROBINSON E, ROBINSON A. Molecular clocks: deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in peptides and proteins [M]. London: Althouse Press, 2004: 6.
- [19] LEO G, BONADUCE I, ANDREOTTI A, *et al.* Deamidation at asparagine and glutamine as a major modification upon deterioration/aging of proteinaceous binders in mural paintings [J]. Analytical Chemistry, 2011, **83**(6):2056 - 2064.
- [20] WELKER F, SORESSI M A, ROUSSEL M, *et al.* Variations in glutamine deamidation for a Châtelperonian bone assemblage as measured by peptide mass fingerprinting of collagen [J]. Science and Technology of Archaeological Research, 2017, **3**(1):15 - 27.
- [21] SRIPRAPUNDH D, VIEILLE C, ZEIKUS J G. Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site - directed mutagenesis [J]. Protein Engineering, 2000, **13**(4):259 - 265.
- [22] 聂麦茜. 有机化学(环境类专业适用) [M]. 北京: 冶金工业出版社, 2008: 188.
NEI M X. Organic chemistry (for environmental majors) [M]. Beijing: Metallurgical Industry Press, 2008: 188.
- [23] SUN X X, FAN J, HOU Y N, *et al.* Fluorescence characterization of the thermal stability of collagen mimic peptides [J]. Chinese Chemical Letters, 2017, **28**(5):963 - 967.
- [24] 史小红, 范倩. 氨基酸疏水性对蛋白质结构的影响 [J]. 中国科技信息, 2015(22):15 - 18.
SHI X H, FAN Q. The amino acids' hydrophobicity exerting on the proteins' structure [J]. China Science and Technology Information, 2015(22):15 - 18.
- [25] 黄群. S - 卵白蛋白与鸡蛋鲜度相关性及其纯化、性质研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
HUANG Q. Study on the coorelation between S - ovalbumin and egg freshness, and the purification and characteristics of S - ovalbumin [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [26] 马杰, 张士瑾. 卵黄蛋白的结构和功能 [J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2012, **28**(3):252 - 260.
MA J, ZHANG S C. Structure and functions of yolk proteins [J]. Ludong University Journal (Natural Science Edition), 2012, **28**(3):252 - 260.
- [27] 杨敏, 梁琪, 毕阳, 等. 琥珀酰化修饰改善牦牛乳酪蛋白胶束结构及疏水性 [J]. 农业工程学报, 2013, **29**(10):287 - 292
YANG M, LIANG Q, BI Y, *et al.* Succinylation improves structure and hydrophobicity of yak casein micelles [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, **29**(10):287 - 292.
- [28] ISCA C, CASOLI A, LOPES V, *et al.* The painting technique of Konrad Witz: an example of experimentation with innovative materials in 15th century [J]. Microchemical Journal, 2023, **185**: 108236.
- [29] LEE J, BONADUCE I, MODUGNO F, *et al.* Scientific investigation into the water sensitivity of twentieth century oil paints [J]. Microchemical Journal, 2018, **138**:282 - 295.
- [30] 李诚. 营造法式 [M]. 上海: 商务印书馆, 1933: 72.
LI J. Ying Zao Fa Shi [M]. Shanghai: The Commercial Press, 1933: 72.
- [31] BRECOULAKI H, ANDREOTTI A, BONADUCE I, *et al.* Characterization of organic media in the wall - paintings of the "Palace of Nestor" at Pylos, Greece: evidence for a secco painting techniques in the Bronze Age [J]. Journal of Archaeological Science, 2012, **39**(9):2866 - 2876.
- [32] BERSANI D, BERZIOLI M, CAGLIO S, *et al.* An integrated multi - analytical approach to the study of the dome wall paintings by Correggio in Parma cathedral [J]. Microchemical Journal, 2014, **114**:80 - 88.
- [33] LLUVERAS - TENORIO A, BONADUCE I, SABATINI F, *et al.* The organic materials in the Five Northern Provinces' Assembly Hall: disclosing the painting technique of the Qing Dynasty painters in civil buildings [J]. Applied Physics A, 2015, **121**:

- 879 - 889.
- [34] 孟陆丽,梁少华. 脂质对小麦蛋白膜理化特性的影响[J]. 粮油加工,2006(5):62 - 67.
MENG L L, LIANG S H. Effects of lipids on physicochemical properties of wheat protein membrane [J]. Cereals and Oils Processing,2006(5):62 - 67.
- [35] MAYER R. The artist's handbook of materials and techniques [M]. New York:The Viking Pen - guin,1991:484.
- [36] DANILIA S, TSAKALOF A, BAIRACHTARI K, *et al.* The Byzantine wall paintings from the Protaton Church on Mount Athos, Greece: tradition and science [J]. Journal of Archaeological Science,2007,34(12):1971 - 1984.

Influence of archaeological soil burial on GC - MS identification of proteinaceous binders

MA Zhenzhen^{1,2,3}

[1. Shaanxi Academy of Archaeology, Xi'an 710109, China;

2. Key Scientific Research Base of On - site Conservation (Shaanxi Academy of Archaeology),
National Cultural Heritage Administration, Xi'an 710109, China;

3. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Archaeological Conservation (Shaanxi Academy of Archaeology), Xi'an 710109, China]

Abstract: The aging of proteinaceous binders buried under soil environment may cause a change of amino acid content, thus affecting their GC - MS identification. In order to improve the accuracy of this method, the author studied how the amino acids of the commonly used binders (collagen, egg and milk) changed after aging in archaeological soil, using GC - MS box plot and principle component analysis (PCA) graph. The GC - MS results show that the levels of Pro, Asp and Glu increased while that of Ser decreased. Gly and Hyp in pig glue and Ile, Phe in egg and milk decreased. These changes caused variations in the box plot and PCA graph, but they were identifiable. Based on the above research, animal glue, and a mixture of animal glue and egg were identified in the painting layers of murals and pottery of the Tang tomb at Guodu, Xi'an. This study has improved the accuracy of GC - MS identification of proteinaceous binders and could provide a scientific basis for exploring the degradation mechanism and selecting proper conservation materials.

Key words: Polychrome cultural relics; Archaeological soil burial; Proteinaceous binder; GC - MS; Identification
(责任编辑 谢 燕;校对 潘小伦)