

Py-GCMS 和 Py- 全二维 GCMS 分析西藏桑耶寺的古藏纸残片

GCMS-405

摘要： 本文利用热裂解 - 气相色谱质谱联用法以及热裂解 - 全二维气相色谱质谱联用法对西藏第一座藏传佛教寺院——桑耶寺发现的古代藏纸残片进行了分析。两种方法对藏纸残片的纤维成分进行了分析，通过与现代参考纸样在特征标记区色谱峰的比较，确定了此藏纸残片的制作原料为瑞香狼毒纤维。采用热裂解 - 全二维气相色谱质谱法分析残片得到的全二维谱图，谱图分成 4 个区域部分，对其中的二酮哌嗪区域进行分析，证实了该残片中添加的蛋白质来源于牛奶的假设（同时得到蛋白质组学分析结果的印证）。这些研究体现了热裂解 - 气相色谱质谱仪及热裂解 - 全二维气相色谱质谱仪在古纸研究中有着广阔的应用前景。

关键词： 热裂解 - 气相色谱质谱仪 热裂解 - 全二维气相色谱质谱仪 藏纸残片

造纸术的发明对世界文明的发展产生了巨大影响。藏纸是藏族聚居地区所产纸的统称，藏纸不仅是藏文化的载体，也是藏文化的重要组成部分，藏族造纸技艺是 2006 年国家公布的第一批国家级非物质文化遗产。然而，藏纸的起源和发展并不清晰，罕有文字记载和考古实证分析。

古藏纸的科技分析工作主要由欧洲学者开展，包括新疆和田安迪尔古城藏纸和敦煌藏经洞藏纸分析。20 世纪初，斯坦因在新疆和田安迪尔古城盗掘的文物中包含公元 8 世纪的古藏纸，维也纳大学植物学家威斯纳鉴定植物纤维来源为瑞香科植物且涂抹大量未经糊化的大米淀粉。2012 年前后，德国洪堡大学 Agnieszka 等学者对 63 件敦煌藏经洞公元 9~13 世纪（未经测年）藏纸样品进行纤维分析，发现纤维来源可以分为三类：麻类（苕麻、大麻）、瑞香科（瑞香属、结香属）以及构皮。其中，以苕麻和大麻为原料的藏纸被认为是敦煌本地制作，以瑞香属、结香属、构皮纤维为原料的藏纸则源于藏区。显然，已有的藏纸分

析获取的信息并不充分。

中国科学院大学人文学院考古学与人类学系杨益民教授课题组与西藏博物馆娘吉加研究员、中科院古脊椎所饶慧芸博士、以及法国国家自然历史博物馆、日本名古屋大学、龙谷大学等单位的学者合作，对西藏第一座藏传佛教寺院——桑耶寺发现的古代藏纸残片开展了综合分析，主要手段包括 C14 测年技术、显微镜以及电镜 - 能谱、X 射线衍射、热裂解 - 气相色谱质谱联用、热裂解 - 全二维气相色谱质谱联用和蛋白质组学分析等。文章发表在《Journal of Archaeological Science: Reports》，第一作者为中国科学院大学特别研究助理韩宾博士。本文节选并整理了其中热裂解 - 气相色谱质谱以及热裂解 - 全二维气相色谱质谱联用分析藏纸残片的内容，证实了该藏纸残片的制作原料为瑞香狼毒纤维，添加的蛋白质则源于牛奶。该研究体现了热裂解 - 气相色谱质谱仪及热裂解 - 全二维气相色谱质谱仪在古纸研究中有着广阔的应用前景。

■ 实验部分

1.1 仪器

热裂解 - 气相色谱质谱：PY-2020iD+ GCMS-QP2010 Plus

热裂解 - 全二维气相色谱质谱：PY-3030D+ GCMS-QP2010 Ultra + ZOEEX 全二维调制器

1.2 分析条件

热裂解 - 气相色谱质谱条件：

裂解温度：500°C

色谱柱：DB-5 ms (30 m×0.25 mm×0.25 μm)

柱温程序：40°C (3 min)_2°C /min_325°C (25 min)

载气：He

载气控制方式：恒线速度，初始流量 1 mL/min

进样口温度：280°C

进样方式：分流进样

分流比：10:1

离子化方式：EI

离子源温度：200°C

接口温度：300°C

采集方式：Scan

质量范围：42~500 amu

热裂解 - 全二维气相色谱质谱条件:

裂解温度: 500°C

色谱柱一: OPTIMA-5 HT (30 m×0.25 mm×0.25 μm)

色谱柱二: Zebron ZB-50 (2.8 m×0.1 mm×0.1 μm)

柱温程序: 100°C (1 min)₂°C /min₃₂₅°C (25 min)

载气: He

离子化方式: EI

载气控制方式: 恒压 300 kPa

离子源温度: 200°C

进样口温度: 280°C

接口温度: 300°C

调制周期: 9 sec

采集方式: Scan

进样方式: 分流进样

质量范围: 50~500 amu

分流比: 30:1

1.3 样品前处理

称取一定量纸样品 (热裂解 - 气相色谱质谱法为 80~110 μg, 热裂解 - 全二维气相色谱质谱法为 70 μg), 放入裂解杯中热裂解分析。

■ 结果与讨论

2.1 纸样特征标记区分析

东亚纸样热解产生的色谱图大致可分为三个主要部分: 纤维素指纹区域, 一个含有碳氢化合物和脂肪酸衍生物的中间区域, 保留时间超过 45 分钟的部分是植物标记物区域, 称为感兴趣区域 (ROI)。表 1 展示了桑耶寺古藏纸残片的 ROI 区域的化合物。针对 ROI 区域, 将藏纸残片与现代狼毒纤维藏纸纸样进行了比较, 并与三桠 (mitsumata) 纸样和雁皮 (gampi) 纸样 (均属于瑞香科植物科) 进行了扩展比较, 如图 1 所示, 图中两种藏纸样品 (图 1a、b) 具有较高的相似性并与另外两种三桠纸 (图 4c) 和雁皮纸 (图 4d) 有类似的裂解产物组合。为了进一步评估古藏纸样品和瑞香科植物纸样品的相似性, 对古藏纸样品和三桠及雁皮纸纸样品进行了 Py-GCxGC/MS 分析, 如图 2 所示。这三个样品的 ROI 证实了 Py-GC/MS 中观察到的标记化合物分布的相似性。通过与现代瑞香狼毒手工纸的比较, 桑耶寺古藏纸残片具有瑞香狼毒纤维特征指纹, 表明其制作原料为瑞香狼毒纤维。

表 1 Py-GC/MS 分析纸样特征标记区 (ROI) 化合物

No.	保留时间 (min)	碎片离子	分子量	分子式	化合物名称
1	49.11	95/123/93/81/107	412	NA	可能环氧豆甾烷结构
2	51.27	69/81/95/93/121	410	C ₃₀ H ₅₀	角鲨烯
3	53.21	81/145/105/95/121	396	C ₂₉ H ₄₈ /C ₂₈ H ₄₄ O	豆甾 -3,5- 二烯
4	54.31	105/91/79/93/95	398	C ₂₈ H ₄₆ O	可能豆甾烷结构
5	54.54	105/91/95/81/106	396	C ₂₉ H ₄₈	豆甾 -3,5- 二烯异构体
6	54.71	135/81/95/143/119	412	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾 -4,6- 二烯 -3- 醇
7	54.91	141/142/81/128/95	378	C ₂₆ H ₅₀ O	可能豆甾烷结构
8	54.99	81/105/147/91/145	396	C ₂₉ H ₄₈	豆甾烷 -3- 醇
9	57.06	136/121/95/79/93	412	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾 -5,7- 二烯 -3- 醇
10	57.79	105/95/107/81/91	414	C ₂₉ H ₅₀ O	豆甾 -5- 烯 -3- 醇 (β- 谷甾醇)
11	58.96	174/91/159/410/81	410	C ₂₉ H ₄₆ O	豆甾 -3,5- 二烯 -7- 酮
12	59.43	124/95/109/93/229	412	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾 -4- 烯 -3- 酮
13	59.82	43/136/95/55/81	410	C ₂₉ H ₄₆ O	豆甾 -4,6- 二烯 -3- 酮

NA: 表示未获得信息。

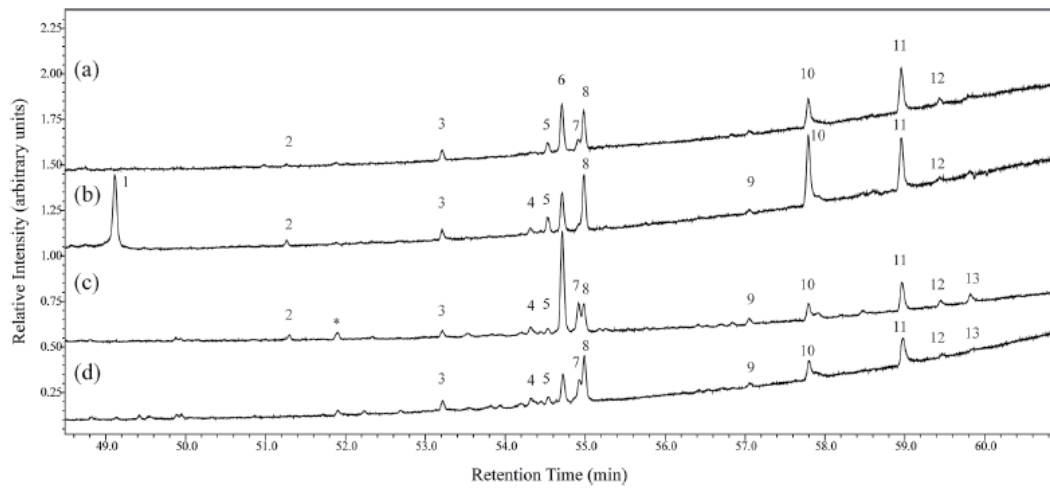
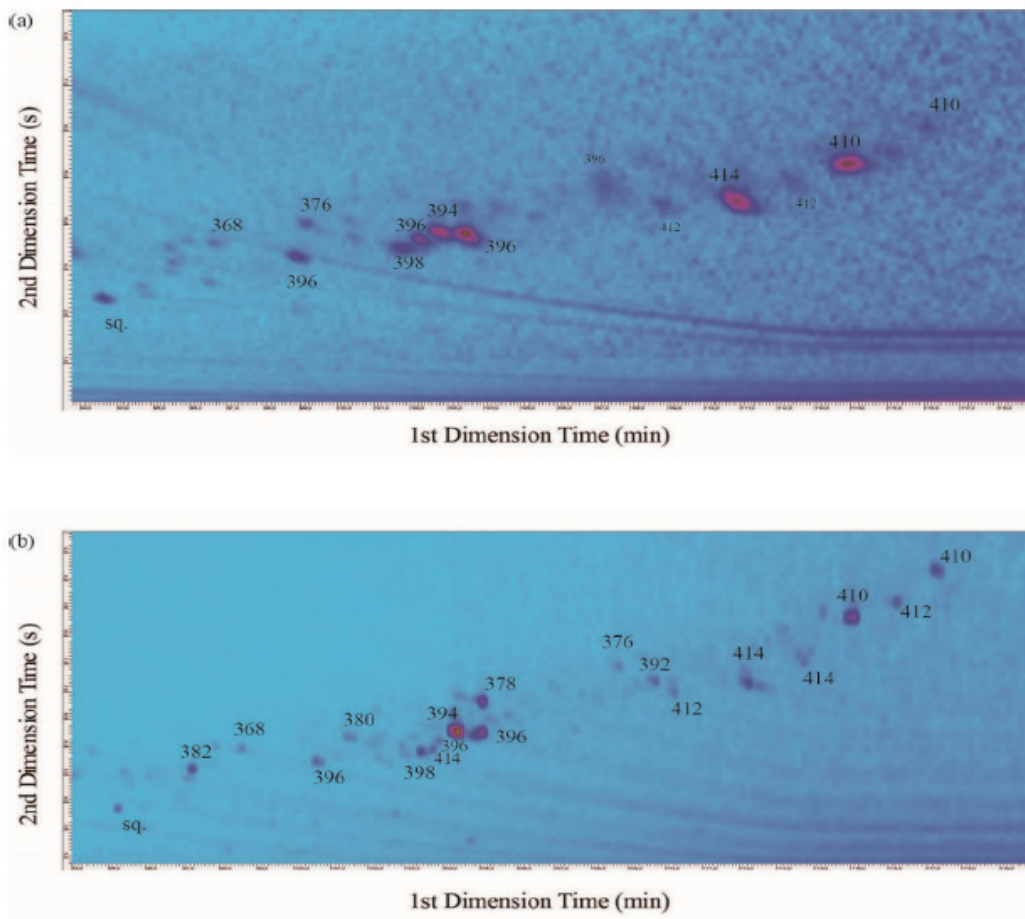


图 1 Py-GC/MS 分析 ROI 区域的总离子流色谱图 (a) 参考狼毒纤维藏纸, (b) 桑耶寺古代藏纸, (c) 参考三桠纸, (d) 参考雁皮纸



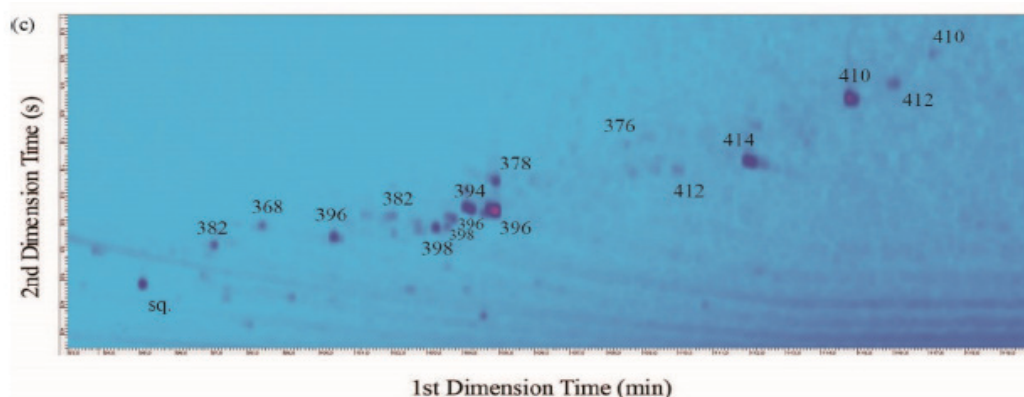


图2 Py-GCxGC/MS 分析 ROI 区域比较 (a) 桑耶寺古代藏纸, (b) 参考三桠纸样, (c) 参考雁皮纸样。图中的标签数字对应于根据相应质谱推断出的每个标记物的预期分子量 (MW)

2.2 Py-GC×GCMS 分析蛋白成分

藏纸残片的 Py-GCxGC/MS 图谱可以分为 4 个区域部分: (i) 纸张的纤维素指纹, (ii) 样品中蛋白质物质的氨基酸热降解产生的二酮哌嗪 (DKP), (iii) 一系列长链烷烃/烯烃, 脂肪酸衍生物和其他化合物 (酯、酸), (iv) 瑞香狼毒植物标记物区 (ROI)。分析蛋白成分可将重点放在 (ii) 区域, 关注 DKP 类物质, 表 2 展示了色谱中确定的主要 DKP 以及确定为酪蛋白标记物的化合物, 图 3 是古藏纸残片的全二维谱图。在 DKP 区域动物胶原蛋白的指纹特征成分 Pro-Hyp、Gly-Hyp、Leu-Leu、Leu-Ileu 缺失, 与正常的动物胶原指纹图谱相比, Hyp 的含量明显偏低。样品中检测到较高含量的 Pro 类型的 DKP, 而 Pro 在牛奶中的含量较高。根据这些结果推测手工造纸中添加的蛋白质来源于牛奶, 而该研究工作中的蛋白质组学的分析结果也证实了这一推测。

表 2 Py-GCxGC/MS 分析藏纸得到的 DKPs 和酪蛋白标记

No.	一维保留时间 (min)	二维保留时间 (sec)	主要碎片离子 (强度降序)	分子量	分子式	化合物名称
1	2.90	1.40	110、53、109、51、52	110	C ₆ H ₆ O ₂	2- 甲酰基 -5- 甲基咪喃
2	3.95	2.15	126、55、69、83、111	126	C ₆ H ₆ O ₃	异麦芽酚的异构体结构
3	4.25	2.65	55、111、126、83、98	126	C ₆ H ₆ O ₃	异麦芽酚
4	5.15	4.35	126、71、55、97、69	126	C ₆ H ₆ O ₃	麦芽酚
5	9.50	3.05	108、126、55、154、80	154	C ₁₀ H ₈ O	NA
6	14.60	4.45	154、153、111、85、139	NA	NA	NA
7	18.20	5.50	154、139、96、93、111	NA	NA	NA
8	18.95	4.20	154、139、111、65、53	NA	NA	NA
9	36.65	3.50	167、196、168、123、197	196	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	NA
10	36.80	3.35	54、70、137、151、108	NA	NA	NA
11	39.80	6.15	182、181、111、183、96	182	C ₉ H ₁₀ O ₄	丁醛
12	42.65	6.15	186、93、65、130、64	226	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	Hyp-Hyp
13	42.65	6.10	186、93、65、64、130	186	NA	Glu-Gly, Asp-Ala, Ser-Val
14	42.95	8.60	70、69、97、68、168	168	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	Pro-Ala
15	44.45	8.85	70、69、97、168、68	168	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂	Pro-Ala
16	45.05	4.90	181、210、91、182、121	NA	NA	NA
17	45.95	1.15	111、83、70、69、154	154	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	Pro-Gly (+ 共洗脱十四酸 MW228)

18	46.4	5.55	167、210、168、123、53	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	NA
19	48.8	6.85	70、154、72、125、69	194	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	Pro-Val
20	49.55	5.05	181、210、182、65、153	210	NA	NA
21	50.45	7.15	70、154、125、69、72	196	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pro-Val
22	52.25	8.25	70、55、180、151、110	NA	NA	NA
23	52.40	8.10	70、180、55、135、151	NA	NA	NA
24	53.3	5.05	111、83、136、55、121	228	NA	Hyp-Asp, Ala-Val, Leu-Asp
25	54.05	6.45	70、154、69、86、71	244	NA	Glu-Asp
26	54.35	5.80	210、167、77、121、149	NA	NA	NA
27	54.95	6.20	154、70、86、69、55	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	3- 异丁基六氢吡咯并 [1,2-a] 吡嗪 -1,4- 二酮
28	55.55	6.50	70、154、125、69、55	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pro-Leu
29	55.70	8.35	70、194、69、96、68	194	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂	Pro-Pro
30	55.85	6.65	154、70、125、69、155	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	环 (亮丙酰基)
31	58.4	6.05	210、167、77、154、149	210	NA	NA
32	58.55	5.90	210、167、77、154、149	210	NA	NA
33	68.75	6.35	186、117、116、90、228	NA	NA	NA
34	73.4	6.15	186、117、91、187、57	NA	NA	NA
35	74.6	6.15	186、117、118、90、187	NA	NA	NA

NA: 表示未获得信息。

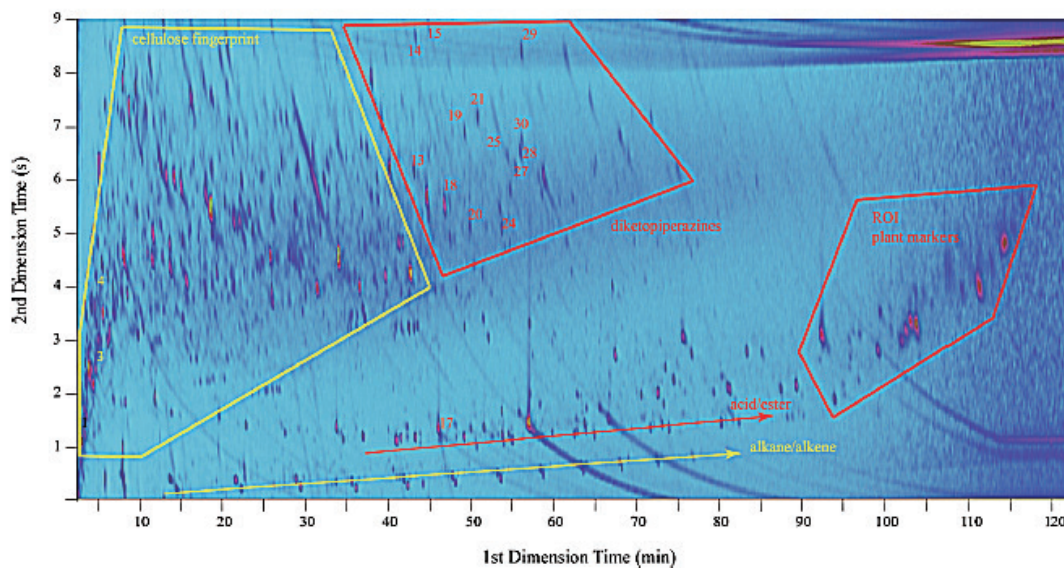


图3 藏纸残片的 Py-GCxGC/MS 图谱

■ 结论

本文介绍了采用热裂解 - 气相色谱质谱法及热裂解 - 全二维气相色谱质谱法对西藏第一座藏传佛教寺院——桑耶寺发现的古代藏纸残片的分析工作。两种方法对藏纸残片的纤维成分进行了分析，通过与现代参考纸样在特征标记区色谱峰的比较，确定了此藏纸残片的制作原料为瑞香狼毒纤维。采用热裂解 - 全二维气相色谱质谱分析残片得到的全二维谱图，谱图分为 4 个区域部分，对其中的二酮哌嗪区域进行分析，证实了该残片中添加的蛋白质来源于牛奶的假设（该假设得到蛋白质组学分析结果的印证）。这些研究体现了热裂解 - 气相色谱质谱及热裂解 - 全二维气相色谱质谱在古纸研究中有着广阔的应用前景。

注：相关工作参见 Paper fragments from the Tibetan Samye Monastery: Clues for an unusual sizing recipe implying wheat starch and milk in early Tibetan papermaking, *Journal of Archaeological Science: Reports* 36 (2021) 102793

文章链接：<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352409X21000055?via%3Dihub>

岛津应用云

