

染織文化財に用いられた染料の 超微量分析の試み（3）

— ESI 質量分析による初期酸性アゾ染料の分析 —

佐々木 良子¹⁾・佐々木 健²⁾

●キーワード：質量分析 (Mass spectrometry), ESI イオン化 (ESI ionization), 合成染料 (Synthetic dye), アゾ染料 (Azo dye), MSMS 分析 (MSMS analysis), 染料分析 (Dye analysis)

1. はじめに

合成染料の歴史は、1853年に英国でPerkinによって開発されたMauve (Mauvein)に始まる。わが国においても、江戸時代末期の開国直後から導入されたようであるが、公式には1870年(明治3年)に京都に独逸から化学染料が輸入されたとの記録が最初である(生谷1990)。合成染料は明治時代の殖産興業の時流に乗って広く利用されるようになったが、京都染物同業組合作成の当時の染料の輸入及び消費統計には1883年にコールタール染料(合成染料)が始めて現れ、1900年頃に紅、蘇芳、藍が除かれている。この間の明治中期から大正期は天然染料と合成染料が併用される過渡期であったようである。合成染料の国産化は1900年初頭に三井によって開始されたが、1922年における外国産と国産の合成染料の合計消費量は1901年と比べると12.4倍に増加し、明治末から大正にかけての20世紀初頭に、合成染料の使用が急速に普及したことが明らかである(佐々木ら2009)。このように明治期から大正初期にかけては染色技術の大変革期であったにもかかわらず、合成染料の微量分析が困難であったため、天然染料から合成染料への置き換えりや変遷について詳細な研究がなされていない。また、1850年代に最初の合成染料が開発されてから100

年以上が経過し、保存や修復を必要とする染織文化財においても天然染料に加えて初期合成染料の使用されているものが現われている。そのため美術史・技術史的な調査の観点に加えて、保存科学的側面からも、黎明期の合成染料の化学的な分析による同定手法の開発が急務である。そこで本研究では、染織文化財における染料類の微量分析法の開発の一環として、合成染料の中でも特に多量種類が合成、市販され、黎明期から大量に用いられてきたアゾ系酸性染料に注目し、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析による位置異性体の相互区別を含む精密分析について検討した。

天然染料は古くから使用されているものの数が限定されているため、想定される標品との比較により同定が可能である。それに対し、合成染料では、たとえばナフタレン環を有するモノアゾ系酸性染料だけでも、1924年に発行されたカラーインデックス(C.I.)には200を超える物質が記載されている(Rowe 1924)。吸収スペクトルやHPLCなどの標品との比較を必要とする分析手法では、酸性染料のみを考慮しても想定される標品の数が膨大であり、それらのすべてを揃えて比較の上、同定する手法は非現実的である。実際、現時点で最も多数の初期合成染料を揃えて分析を行った事例としてvan Bommelらは65種類についてHPLCによる分析を行い、

¹⁾ 京都工芸繊維大学 美術工芸資料館 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

²⁾ 京都工芸繊維大学 生体分子工学部門 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

保持時間のリストを作成している (van Bommel *et. al.* 2007)。これを用いると一見かなりの合成染料の同定が可能であるように思えるが、必ずしもすべての試料が分離して特定できるわけではなく、構造の類似した位置異性体に対しては無効である。また、この 65 種類以外のリストにない染料の同定は不可能である。一般にアゾ染料の同定は、アゾ基を還元的に分解した後、得られるアミン成分を構造決定することでなされるが、極めて大量の試料を要する (Sutthivaiyakit, *et. al.*, 2005)。したがって、合成染料のような多数の類似物質が存在する場合の微量での同定にはソフトなイオン化を用いた質量分析で直接対象分子の構造情報を取得し、組成式に基づく構造を推定する手法が最も効果的であり、さらに、この分子量情報から対象を絞り込んだ上で、他の手法と組み合わせることで確定的な分析結果を得ることができる。本研究で用いた ESI イオン化による質量分析では、容易に組成式を反映する分子イオンを検出することが可能であり、対象とする分子の構造を特定し、同定に利用することが出来る。そのため、類似の構造を有するものであっても組成に反映される僅かな構造の違いに基づく同定が可能であり、合成染料のような多数の類似構造を有する物質群に対してきわめて有効な方法である。

合成染料では同じ組成式を示す構造異性体が存在することが多い。このような場合、質量分析により得られる分子イオンが同一となるため、この手法単独での同定が困難になる。しかしながら、生じた分子イオンを衝突誘導分解 (CID) により分解する MSMS 法を用いると、分子イオンに加えて対象分子の構造を反映する特徴的なプロダクトイオンが得られ、その解裂パターンをもとに同一の組成を有する分子であっても同定することが出来るようになる (Gross 2004)。

著者らはこれまで文化財染織品における有機化合物の分子レベルでの同定を目指した研究を行ってきた (佐々木・佐々木 2005, 佐々木 2008)。特に、染料の分析において、要望の多い非破壊分析と極微量の試料採取による破壊分析の高度化の両面から詳細に検討し、非破壊手法である反射・蛍光分光法 (佐々木ら 2001, 佐々木ら 2007a, 佐々木ら 2008)、蛍光 X 線、染料抽出液の分光法や HPLC 分析ならびに質量分析といった分析原理の

異なる複数の手法を組み合わせることで多面的に情報を得ることにより、高精度の天然染料同定法を開発してきた (Sato, Sasaki 2004, Sasaki, *et. al.*, 2008, 佐々木ら 2007b)。更にアントラキノン系赤色天然染料や黄色天然染料の質量分析を導入し、ESI イオン化法とイオントラップ型質量分析 ESI-IT-MS と MSMS (MSⁿ) 手法とを組み合わせた染料分子の分子構造に基づく高精度・微量同定手法の有効性を示してきた (佐々木・佐々木 2009, 佐々木ら 2009)。今回、この分析手法をアゾ系酸性染料に適用し、染料成分の分子構造に基づく極微量分析を検討した。酸性アゾ染料に対する ESI あるいは MALDI 法等のイオン化による質量分析ならびに MSMS による分解経路に関する基礎的な研究は一部報告されているが (Sullivan 1998)、文化財資料に対する微量分析を考慮し、構造類似の異性体、特に位置異性体の特定を視野に入れた広範な染料成分についての研究は全くなされていない。本研究において分析を行った染料は Table 1 に示した 20 種である。いずれも 1870 年代半ばから 1900 年頃にかけて開発された代表的なアゾ系酸性染料である。

2. 実験

ESI 質量分析には Thermoelectron LCQ を用い、イオン源温度 220 °C、イオン化電圧 4 kV で測定を行った。試料溶液は 5 μ l/min でイオン源に直接導入した。スペクトルはいずれも 0.5 s/scan で測定し、それを 20 scan 積算した。Table 1 に示した各種酸性アゾ染料を用いて絹染色布を作成した。その染色布 1 mg に対し、300 μ l の 3% NH₃/MeOH 混合溶液を用いて染料成分を抽出した。その抽出液を 100 倍に希釈して測定に供した。

3. 結果と考察

3.1 モノスルホン酸型アゾ酸性染料の分析

代表的なモノスルホン酸型アゾ酸性染料として 1877 年に Caro により見出された acid red 88 (C. I. 15620, Fast Red A) の ESI による質量分析の結果を Fig. 1 に示した。測定試料には当該染料での染色布 1 mg の 3% NH₃/MeOH 溶液 300 μ l での抽出液を用いた。抽出溶媒に揮発性アミン成分を添加することにより、抽出効率と ESI による質量分析の感度が大きく向上する

表1 アゾ酸性染料のMSおよびMSMS分析
Table 1 MS and MSMS analyses of azoic acid dyes.

| C. I. Name (Dye Name) C. I. No. | Discovered Year | Molecular Mass & Formula of acid form | Chemical structure | Observed mass (m/z) | MSMS (m/z) | |
|---|----------------------------------|---|--------------------|---|-------------------|---|
| | | | | | Target ion | Product ion (relative intensity) ^a |
| acid orange 5 (Orange IV) 13080 | 1876 by Witt | 353 C18H15N3O3S | | 352[M-H] ⁻ | 352 | 156(100, B), 272(20, -SO3), 288(50, -SO2) |
| acid orange 7 (Orange II) 15510 | 1876 by Roussin | 328 C16H12N2O4S | | 327[M-H] ⁻ | 327 | 171(100, A), 247(5, -SO3) |
| acid orange 20 (Orange I) 14600 | 1876 by Griess | 328 C16H12N2O4S | | 327[M-H] ⁻ | 327 | 171(100, A), 247(50, -SO3) |
| acid orange 10 (Orange G) 16230 | 1878 by Baum | 408 C16H14N2O7S2 | | 407[M-H] ⁻ 203[M-2H] ⁻² | 407 203 | 302(100, B), 327(50, -SO3) 143(100, A & -CO), 151(90, B), 189(60, -N2), 222(60, B & -SO3) |
| acid orange 12 (Crocein Orange G) 15970 | 1878 by Griess | 328 C16H12N2O4S | | 327[M-H] ⁻ | 327 | 207(70, A & -CO), 235(100, A) |
| acid red 13 (Fast Red E) 16045 | 1878 by Caro | 458 C20H14N2O7S2 | | 457[M-H] ⁻ 228[M-2H] ⁻² | 457 228 | 234(10, A), 377(100, -SO3), 439(5, -N2) 208(40, A & -CO), 221(50, A), 235(100, A) |
| acid red 17 (Fast Red B) 16180 | 1878 by Baum | 458 C20H14N2O7S2 | | 457[M-H] ⁻ 228[M-2H] ⁻² | 457 228 | 206(10, A), 302(20, B), 315(10, A), 377(100, -SO3) 125(50, A & -SO2), 143(70, A & -CO), 151(100, B), 157(20, A), 206(20, -N2 & -CO), 214(40, -N2), 220(40, B & -SO3), 234(20, A & -SO3), 250(30, A & -SO2) |
| acid red 18 (Ponceau 4R) 16255 | 1878 by Baum | 538 C20H14N2O10S3 | | 537[M-H] ⁻ 268[M-2H] ⁻² | 537 268 | 457(20, -SO3), 504(100, -H2O) 206(10, B), 302(100, B) |
| acid red 25 (Ponceau 3R) 16155 | 1878 by Baum | 472 C19H18N2O7S2 | | 471[M-H] ⁻ 224[M-2H] ⁻² | 471 224 | 302(15, B), 317(35, A), 369(100, -SO3), 431(15, -H2O) 125(20, A & -SO2), 143(25, A & -CO), 151(100, B), 157(5, A), 210(20, -N2), 215(25, -H2O) |
| acid red 26 (Ponceau R) 16150 | 1878 by Baum | 436 C18H16N2O7S2 | | 435[M-H] ⁻ 218[M-2H] ⁻² | 435 218 | 302(10, B), 317(20, A), 355(100, -SO3), 417(10, -N2) 125(5, A & -SO2), 143(5, A & -CO), 151(100, B), 203(10, -N2), 208(20, -H2O) |
| acid red 27 (Azo Rubin S) 16185 | 1878 by Baum | 538 C20H14N2O10S3 | | 537[M-H] ⁻ 268[M-2H] ⁻² 179[M-3H] ⁻³ | 537 268 179 | 234(20, A & -SO3), 317(80, A), 457(40, -SO3), 473(100, -SO2), 519(40, -H2O) 228(100, -SO3) 125(20, A & -SO2), 143(60, A & -CO), 151(100, B), 222(20, A), 250(15, A & -SO2) |
| acid red 88 (Fast Red A) 15620 | 1877 by Caro | 378 C20H14N2O4S | | 377[M-H] ⁻ | 377 | 143(50, B & -SO2), 221(100, A), 297(25, -SO3) |
| acid yellow 36 (Metanil Yellow) 13065 | 1879 by Rumpff | 353 C18H15N3O3S | | 352[M-H] ⁻ | 352 | 156(100, B), 260(10, -N2 & -SO2), 324(25, -N2) |
| acid red 66 (Biebrich Scarlet B) 26905 | 1879 by Nietzki & Krugener | 512 C22H18N4O7S2 | | 511[M-H] ⁻ 255[M-2H] ⁻² | 511 255 | 483(100, -N2), 276(20, A & -SO3) 143(20), 169(20, A), 241(100, -N2) 291(20, A & -SO2), 339(20, A) |
| acid red 9 (Silk Scarlet S) 15635 | 1882 by Prinz | 378 C20H14N2O4S | | 377[M-H] ⁻ | 377 | 221(100, A) |
| acid red 14 (Azo Rubine) 14720 | 1883 by Witt | 458 C20H14N2O7S2 | | 457[M-H] ⁻ 228[M-2H] ⁻² | 457 228 | 236(5, A), 297(5, -2SO3), 377(100, -SO3), 440(20, -H2O) 171(70, A & -SO2), 221(100, A) |
| acid red 73 (Crocein Scarlet 3B) 27290 | 1882 by Limpach | 512 C22H18N4O7S2 | | 511[M-H] ⁻ 255[M-2H] ⁻² | 511 255 | 302(100, A), 403(10, -N2 & -SO3), 431(10, -SO3), 483(80, -N2) 143(20, A & -CO), 150(20, B), 241(100, -N2), 402(40, -N2 & -SO2) |
| acid red 33 (Azo Fuchsin B) 17200 | 1890 by Bayer | 423 C16H13N3O7S2 | | 422 211 | 422 211 | 249(100, A & -SO3), 317(80, B), 358(20, -SO2) 158(100, B) |
| acid black 1 (Naphthol Blue Black) 20470 | 1891 by Hoffmann | 572 C22H16N5O9S2 | | 571[M-H] ⁻ 286[M-2H] ⁻² | 571 286 | 507(100, -SO2) 219(90, A, -NO2Ph-N), 233(100, B: -PhN2), 239(20, A: -Ph-N), 254(5, -SO2), 272(40, -N2) |
| acid red 2 (Methyl Red) 13020 | 1908 by Rupp | 269 C15H15N3O2 | | 268[M-Ha] ⁻ | 268 268 -> 224 | 224(100, -CO2) 182 |

a) A: ions from N-N bond fission of NH-N form, B: ions from C-N bond fission of -N=N- form.

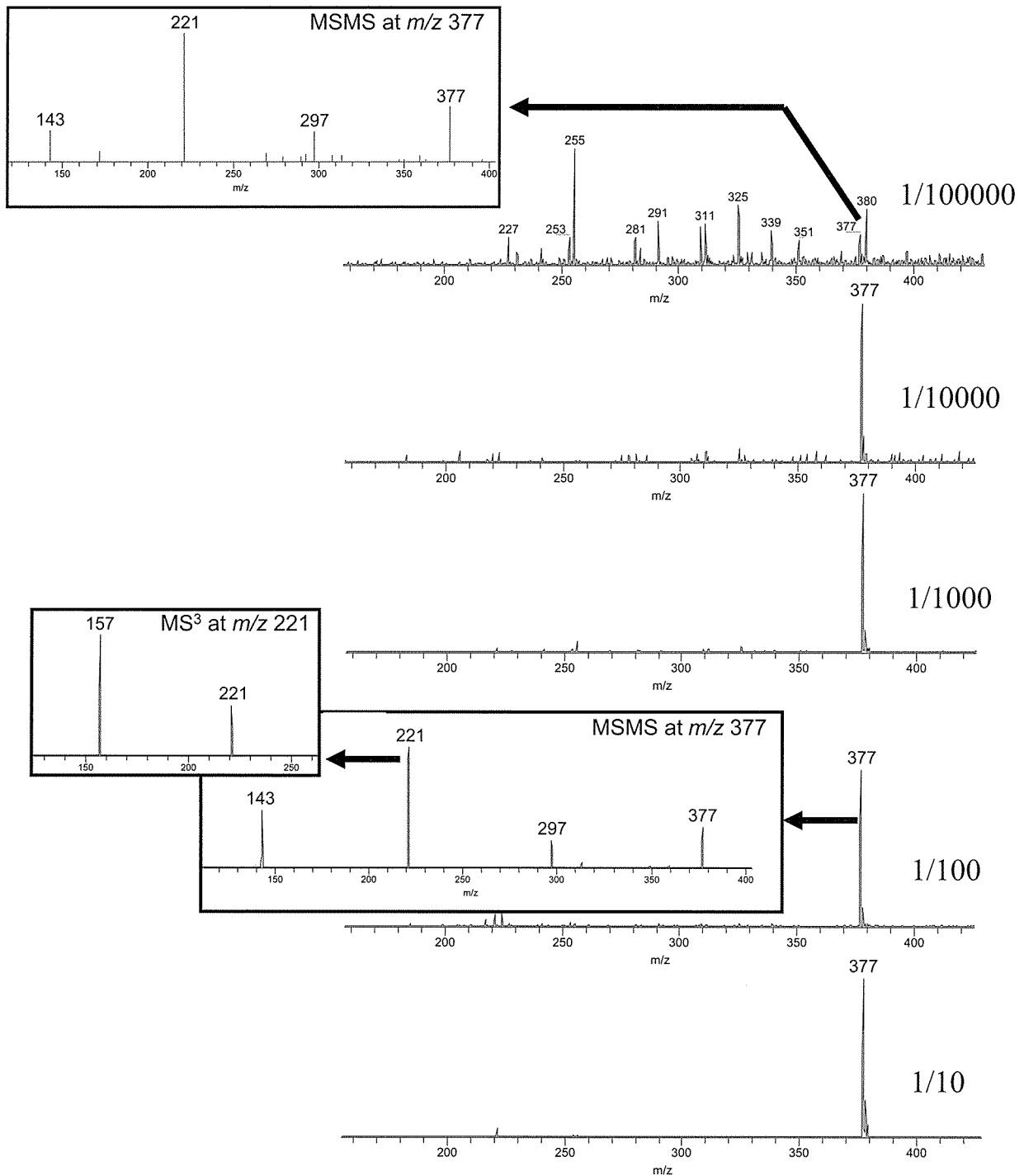


図1 各種濃度における acid red 88 (Fast Red A) の ESI-MS および MSMS スペクトル
 Fig. 1 ESI-MS and MSMS spectra of acid red 88 (Fast red A) in variable concentrations.

(Ballantine 1995)。この試料抽出溶液を 10 倍から 10000 倍に希釈して、5 μ l/min の流速で直接イオン源に導入して測定した。有効な質量分析データの取得に必要とする試料溶液量は 2 μ l 程度であった。

acid red 88 (Fast Red A) は陰イオンでの ESI により容易にイオン化し、 m/z 377 に単一のピークを与えた。この質量数はスルホン酸 (SO_3H 型) としての組成式

$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ より得られる計算値 378 から、 H^+ の脱離によって生成する一価陰イオン $[\text{M}-\text{H}]^-$ に相当する。このようにスルホン酸の様な酸性基を有する染料の場合、脱プロトンによる陰イオンが分子イオンとして得られた。同じ溶液で陽イオンモードでは全く有意のピークは認められなかった。染料抽出液を 100, 1000, 10000 および 100000 倍に希釈して測定した結果、10000 倍に希釈した

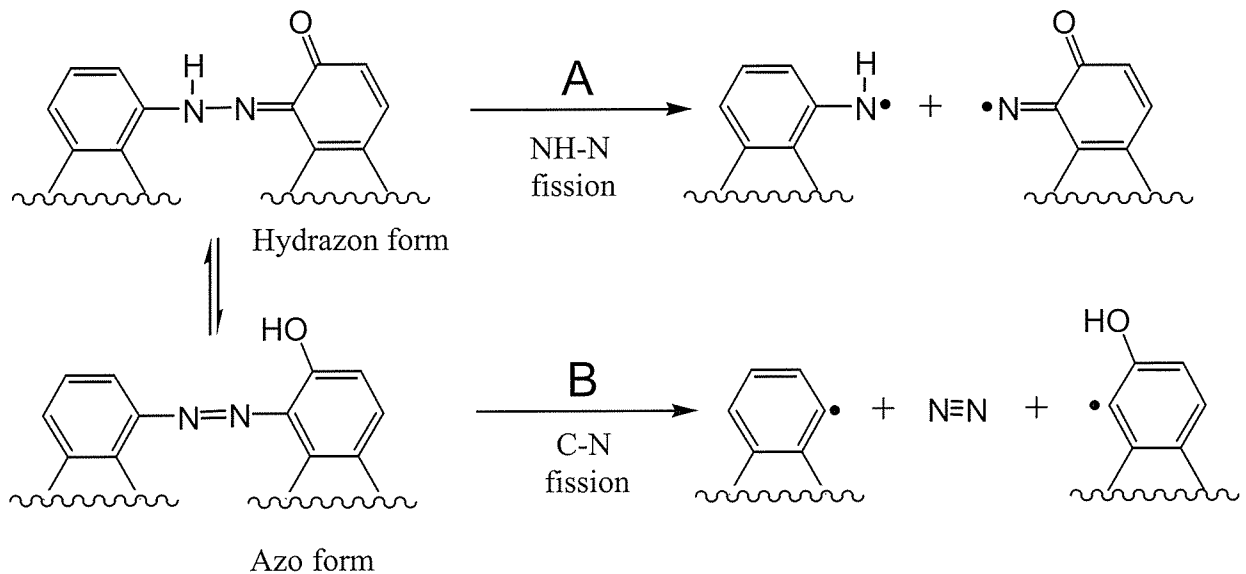


図2 アゾ化合物のCIDによる結合解裂様式

Fig. 2 Fragmentation pattern of azo compound through bond fission.

溶液においても10を超えるS/N比で分子イオンの検出が可能であったが、更にその10倍まで希釈すると分子イオンに相当するピークの同定が困難となった。10000倍希釈時におけるacid red 88 (Fast Red A)の測定限界は、0.1 mlの抽出溶媒量に対し染色布0.01 μg 程度であり、極めて微量での分析が可能であることが分かった。

acid red 88 (Fast Red A)のESIイオン化によって得られる分子イオン377 ($[\text{M}-\text{H}]^-$)をターゲットとして N_2 ガスによる衝突誘導分解(CID)を行い、MSMSスペクトルを測定し、得られるプロダクトイオンからアゾ染料の解裂様式を検討した。Fig. 1に示したように100倍希釈溶液での測定では m/z 143, 221ならびに297にプロダクトイオンが観測された。また、分子イオンが検出困難である100000倍に希釈した溶液に対し m/z 377をターゲットとするMSMSを適用すると、同様のプロダクトイオンを与え、通常のMSにより分子イオンが困難な低濃度においてもMSMSを適用することにより、そのプロダクトイオンから同定が可能であることが分かった。

一般にアゾ染料はFig. 2に示したようにヒドラゾン型とアゾ型の二種の互変異性体混合物として存在し、ヒドラゾン型からはNH-N結合の解裂が進行し(Path A)、アゾ型からは N_2 の脱離を伴うC-N結合の解裂が起こる(Path B) (Sullivan 1998)。分析で得られた

m/z 221のイオンは見かけ上N=N結合で解裂により得られるナフトレンスルホン酸側のフラグメントイオンに相当するが、実際にはヒドラゾン構造からのPath AのNH-N結合解裂による分解生成物である。NH-N結合の解裂による他方のフラグメントであるナフトール側のイオン(m/z 166)は検出されなかった。 m/z 221のイオンと同時に観測される m/z 297は、分子イオンから SO_3 基が脱離した質量数に相当する。また、 m/z 143は、アゾ型異性体からのC-N結合の解裂から得られるフラグメント(Path B)からさらに SO_2 基が脱離したイオンに相当する。このようにヒドラゾン型からのNH-N結合解裂(Path A)、アゾ型からのC-N結合解裂(Path B)に加えて SO_3 ($\Delta 80$)、 SO_2 ($\Delta 64$)の中性分子の脱離(中性ロス)はアゾ酸性染料のMSMSにおいて特徴的に見られる挙動であり、acid red 88 (Fast Red A)においても同様の過程でプロダクトイオンが得られることを示している。更にMSMSによって得られる m/z 221のプロダクトイオンをターゲットとする MS^3 を行うと、そのプロダクトイオンとして m/z 157に SO_2 の脱離に伴う単独のピークのみが認められた。一般にMSMSによって得られるプロダクトイオンの分布と強度はCIDのエネルギーによる影響は比較的小さいため、得られるイオンの質量数と強度はその双方を物質の同定に用いることができる (Volná 2008)。

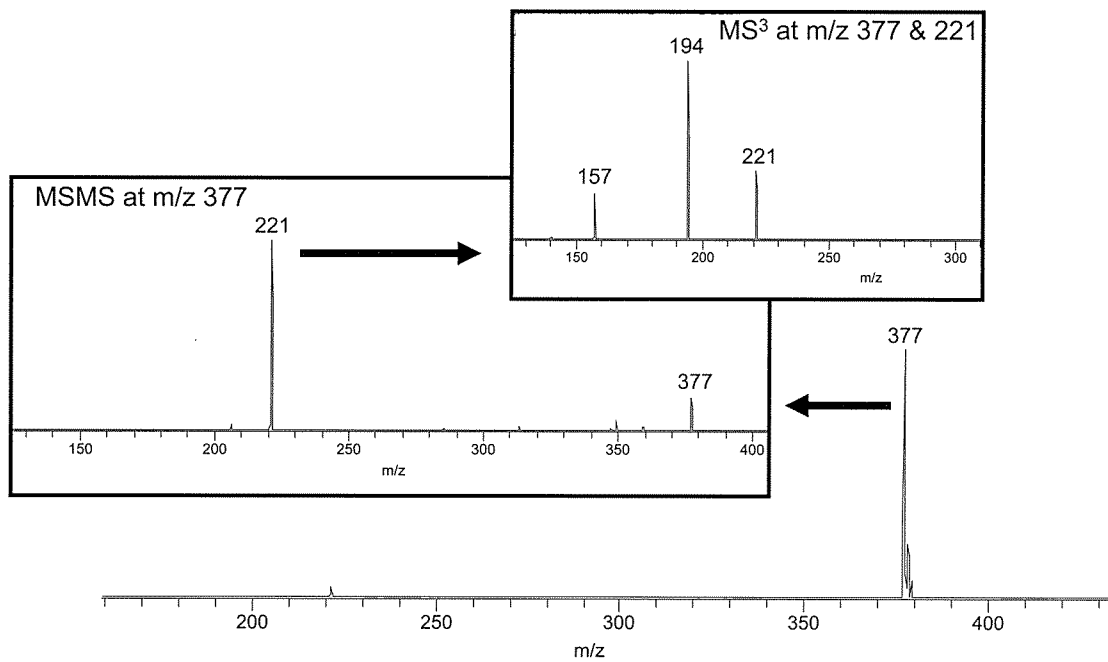


図3 acid red 9 (Silk Scarlet A) の ESI-MS および MSMS スペクトル
 Fig. 3 ESI-MS and MSMS spectra of acid red 9 (Silk Scarlet A).

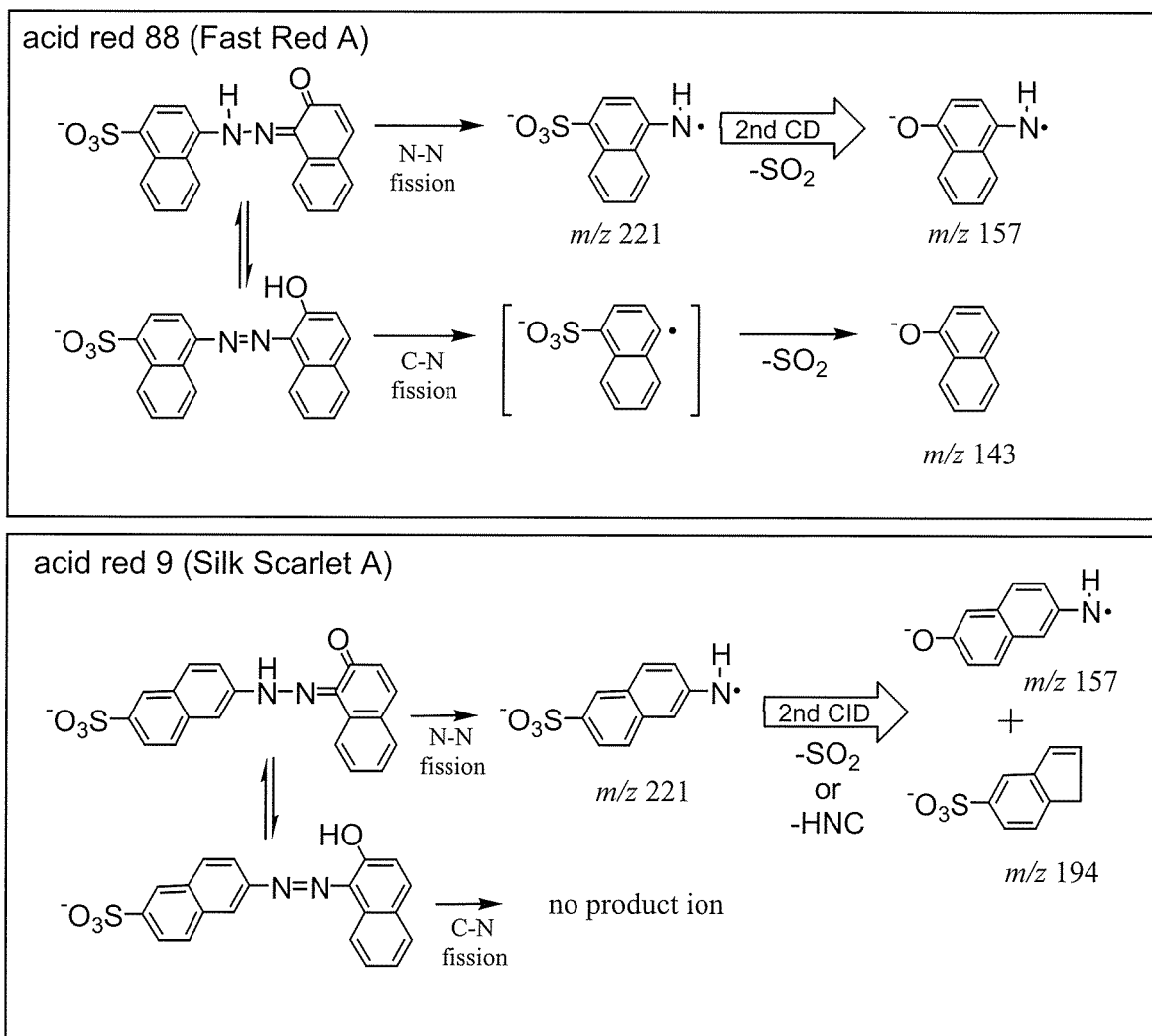


図4 acid red 88 (Fast Red A) と acid red 9 (Silk Scarlet A) の解裂様式
 Fig. 4 Fragmentation paths of acid red 88 (Fast Red A) and acid red 9 (Silk Scarlet A)

acid red 88 (Fast Red A) とは元素組成は同じであるが、SO₃H 基とアゾ基の位置のみが異なる構造異性体の染料として acid red 9 (C. I. 15640, Silk Scarlet A) が知られている。この染料抽出液の ESI イオン化での質量分析を行うと Fig. 3 に示したように前述の acid red 88 (Fast Red A) と同様に m/z 377 に単一のピークを与えた。このように同じ組成式を有する分子は同じ質量数の分子イオンを与え、本質量分析が分子組成式を反映した結果を与えることが分かる。しかしながら、染料の同定の観点からは acid red 88 (Fast Red A) と acid red 9 (Silk Scarlet A) の相互区別が要求されるが、この分子イオンのみでは SO₃H 基とアゾ基の位置の異なる異性体の区別に関する情報は得られない。そこで、この分子イオンをターゲットとする MSMS を行ったところ、Fig. 3 挿図に示したように acid red 9 は m/z 221 に強いピークのみを与え、acid red 88 で同時に観測される m/z 143, 297 のイオンは検出されなかった。さらにプロダクトイオンである m/z 221 をターゲットとする MS³ を行うと、 m/z 157 と m/z 194 のイオンが観測された。MSMS における 143, 297 のイオンならびに MS³ における 157 のイオンは acid red 88 (Fast Red A) において認められたものと同じであるが、ここで観測された MS³ における 194 のイオンは acid red 9 に特有のものである。このイオンは NH-N 結合解裂によって生成したナフトールスルホン酸から H-N=C が脱離した構造に相当し、acid red 88 と acid red 9 の二つの染料においてアゾ基の結合位置によって MS³ の結果が異なることを示している。両者の MSMS および MS³ によって得られるプロダクトイオンの想定される生成経路を Fig. 4 に示した。このように極めて類似した構造を有する染料において、MSMS 手法により生成するプロダクトイオンが分子のわずかな構造の違いを反映して異なるため、それを検出・解析することにより両者を区別して同定することが可能である。ここで示した二種の染料はこれまで HPLC ではほぼ同位置の保持時間を示すため (van Bommel *et. al.* 2007), その同定が困難とされるものであり、本手法が位置異性体の同定に極めて有効な方法であることを示している。

同様にスルホン酸基と水酸基の位置のみが異なる三種

の構造異性体の染料、acid orange 7 (C. I. 15510, Orange II), acid orange 20 (C. I. 14600, Orange I) および acid orange 12 (C. I. 15970, Crocein Orange G) の同定について検討した。元素組成はいずれも同一の C₁₆H₁₂N₂O₄S (質量数 328) であり、Fig. 5 に併記した構造に示したようにスルホン酸基と OH 基の位置が異なるのみである。特に acid orange 7 (Orange II), と acid orange 12 (Crocein Orange G) は可視吸収スペクトルがきわめて類似し、HPLC による分離も困難であるため相互の区別が非常に難しい例である (van Bommel *et. al.* 2007)。

acid orange 7 (Orange II) の ESI イオン化質量分析を行った結果を Fig. 5 A に示した。 m/z 327 に脱プロトン型陰イオンである [M-H]⁻ に相当するイオンのみが観測され、他のイオンは全く認められなかった。acid red 88 (Fast Red A) と同様に、ESI イオン化の質量分析によって容易に分子量を反映する脱プロトン型の陰イオンのみが検出できた。この m/z 327 のイオンをターゲットとする MSMS を行うと、プロダクトイオンとして主に m/z 171 のイオンが得られた。Fig. 6 A に示したように、このイオンはアゾ化合物の互変異性体であるヒドラゾン型の NH-N 結合が解裂して与えるスルホン酸基を有する中性ラジカルの質量数に相当し、CID により NH-N 結合が解裂してアゾ染料のスルホン酸を有する構造部分に相当するイオンを与えたものと考えられる。この MSMS では結合解裂による m/z 171 のイオンに加えて非常に弱い m/z 156 と 247 のイオンが認められた。156 のイオンはアゾ型からの C-N 結合解裂によって生成するイオン、247 のイオンは分子イオンから SO₃ 基が脱離した質量数のイオンに相当する。前述の acid red 88 (Fast Red A) と同様に MSMS により N=N 結合位置での解裂と微量ながら SO₃ 基の脱離が認められた。

acid orange 20 (Orange I) の分析結果を Fig. 5 B に示した。acid orange 7 (Orange II) と同様に m/z 327 に単一のイオンが認められ、分子量に相当する陰イオン ([M-H]⁻) のみが検出された。MSMS 分析を行うと m/z 171 と 247 にプロダクトイオンが観測され、N=N 結合位置の解裂によるフラグメントと SO₃ 基の

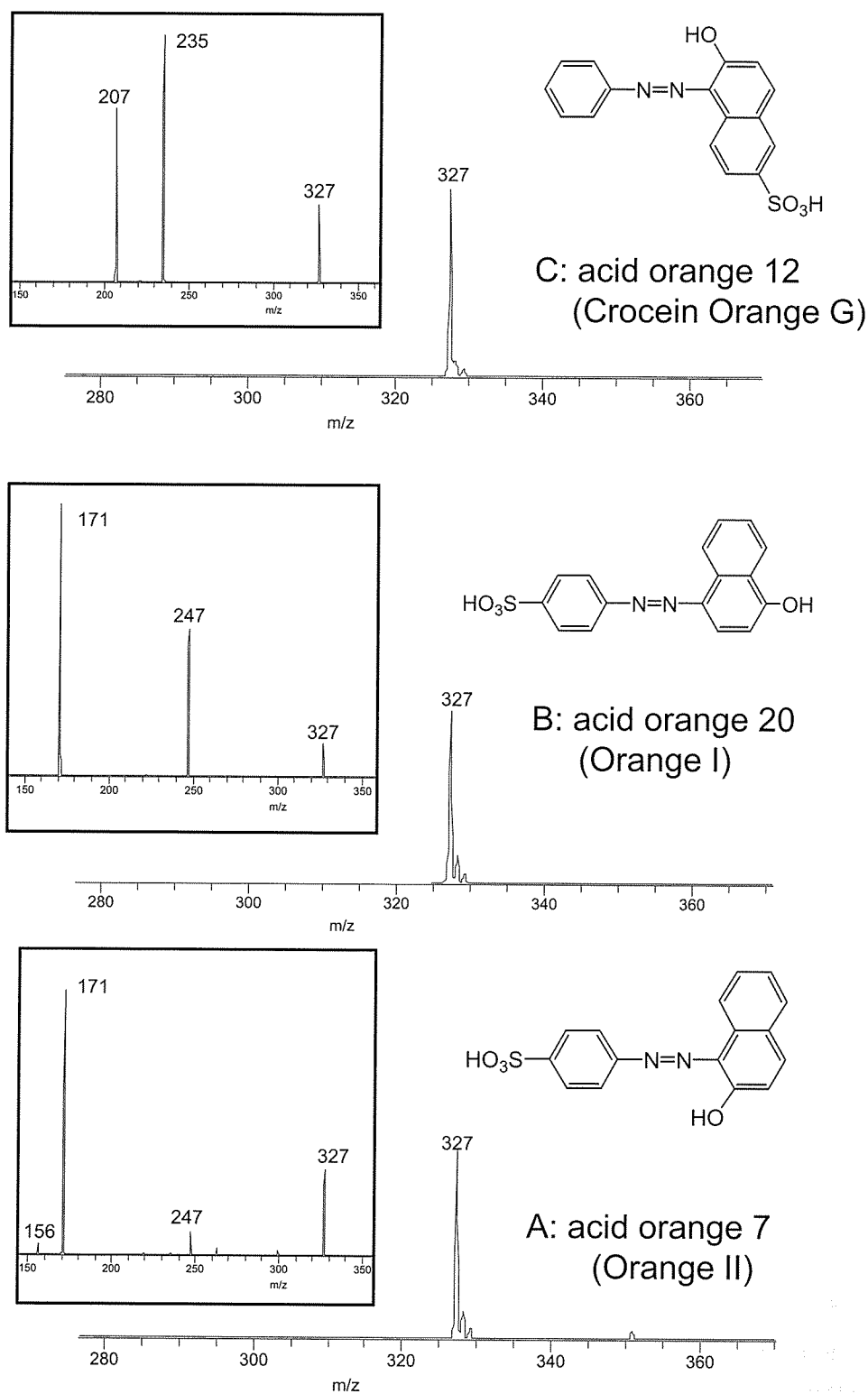


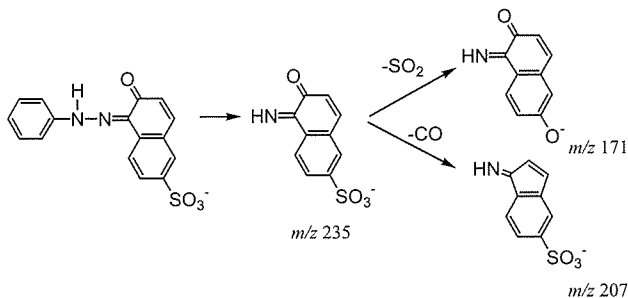
図5 アゾ染料位置異性体の ESI-MS および MSMS スペクトル, A : acid orange 7 (Orange II), B : acid orange 20 (Orange I), C : acid orange 12 (Crocein Orange G)

Fig. 5 ESI-MS and MSMS spectra of regio isomers of azo dyes, A: acid orange 7 (Orange II), B: acid orange 20 (Orange I), and C: acid orange 12 (Crocein Orange G)

脱離によるイオンが得られた。この二つのイオンは前述のナフトール基における水酸基の位置のみが異なる acid orange 7 (Orange II) においても認められるものであり、分子イオンの質量数と合わせてスルファニル

酸 (*p*-アミノベンゼンスルホン酸) とナフトールのジアゾカップリングによって生成する染料の構造を有することを示している。これらの二つの染料 (Orange I と Orange II) では分子イオンと MSMS によるプロダク

B: acid orange 12 (Crocein Orange G)



A: acid orange 7 (Orange II)

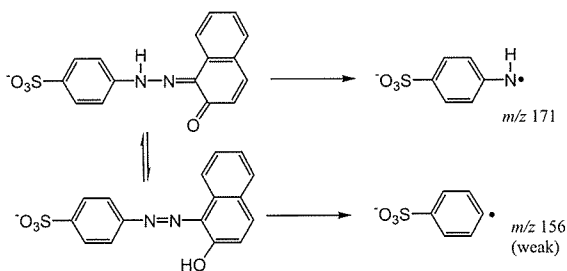


図6 A: acid orange 7 (Orange II) および B: acid orange 12 (Crocein Orange G) の解裂様式

Fig. 6 Fragmentation patterns of A: acid orange 7 (Orange II) and B: acid orange 12 (Crocein Orange G).

トイオンの質量数は同一であり、これらの数値のみによる同定は困難であったが、ヒドラゾン型の NH-N 結合で解裂したフラグメントイオン (m/z 171) と脱スルホン酸型イオン (m/z 247) の強度比が大きく異なり、これが二つの染料の水酸基の位置の違いを反映し、それにより相互の区別が可能であった。

acid orange 12 (Crocein Orange G) の分析においても同様に、 m/z 327 に分子量を反映する $[M-H]^-$ 型の陰イオンが単独のピークで観測された (Fig. 5 C)。MSMS 分析を行うと m/z 235 と 207 にプロダクトイオンが認められた。Fig. 6 B に示したように質量数 235 のイオンはヒドラゾン型の NH-N 結合の解裂によって生成するプロダクトイオンである。スルホン酸基がナフトール側に存在するため、アミノナフトールスルホン酸由来のイオンが主として生成・検出されたことによるものである。スルホン酸基の位置の異なる acid orange 7 (Orange II), acid orange 20 (Orange I) において認められるスルファニル酸部位由来の m/z 171 とは異なるイオンが観測される。この結果は MSMS 分析によって得られるプロダクトイオンがスルホン酸基の位置を反映して異なることを示し、この特徴を利用することで類

似構造の染料の同定が可能である。更に、MSMS により m/z 207 にもう一つのイオンが観測された。これは NH-N 結合解裂によって生成したアミノナフトールスルホン酸ラジカルから 2 位の C=O が脱離した生成物である (Leonardo 2007)。

このように構造異性体は分子組成が同じであるため単一の MS 分析では同じ組成を有する化合物へ絞込みは可能であるが、異性体のいずれであるかを確定することが出来ない。しかしながら、ここで用いた MSMS を併用すると、スルホン酸基、水酸基および N=N 基の位置の違いがプロダクトイオンの質量数と強度比に反映され、それを指標として用いることにより位置の異なる異性体の相互区別が可能であった。MSMS において生成するプロダクトイオンはいずれもアゾ型からの C-N 結合解裂あるいはヒドラゾン型からの NH-N 結合解裂に加えて、 SO_3 , SO_2 , N_2 , あるいは β 位の CO (あるいは N=C) のような低分子の中性ロスと呼ばれる脱離によって生成し、この 6 種の反応と水素移動のみで説明が可能である。染料分子の構造によりこれらの分解経路の中で優先的に起こる反応が異なるためにプロダクトイオンに違いが生じ、結果として分子の構造の違いを反映するフラグメントパターンを与えるものと考えられる。このような特有の質量数の存在あるいは強度比を利用することで染料の構造に基づく同定が可能であることが明らかとなった。

3.2 多価スルホン酸アゾ染料の分析

合成染料におけるスルホン酸基は水溶性を付与するが、染料の色を反映する吸収スペクトルには大きな影響を与えない。そのため、多くの酸性染料においては少なくとも一個、通常は複数のスルホン酸基を有する。このスルホン酸基のようなイオン性の官能基の数は質量分析において得られる質量数 (m/z) のイオン価数 (z) として反映され、観測される質量数が増える。そこで、複数のスルホン酸基を有するアゾ系染料として二つのナフトレンをアゾ結合で連結した構造を持つ一連の染料を用いて質量分析を行ない、スルホン酸基の数による特徴を調べた。

基本構造は前述の acid red 88 (Fast Red A) と同一

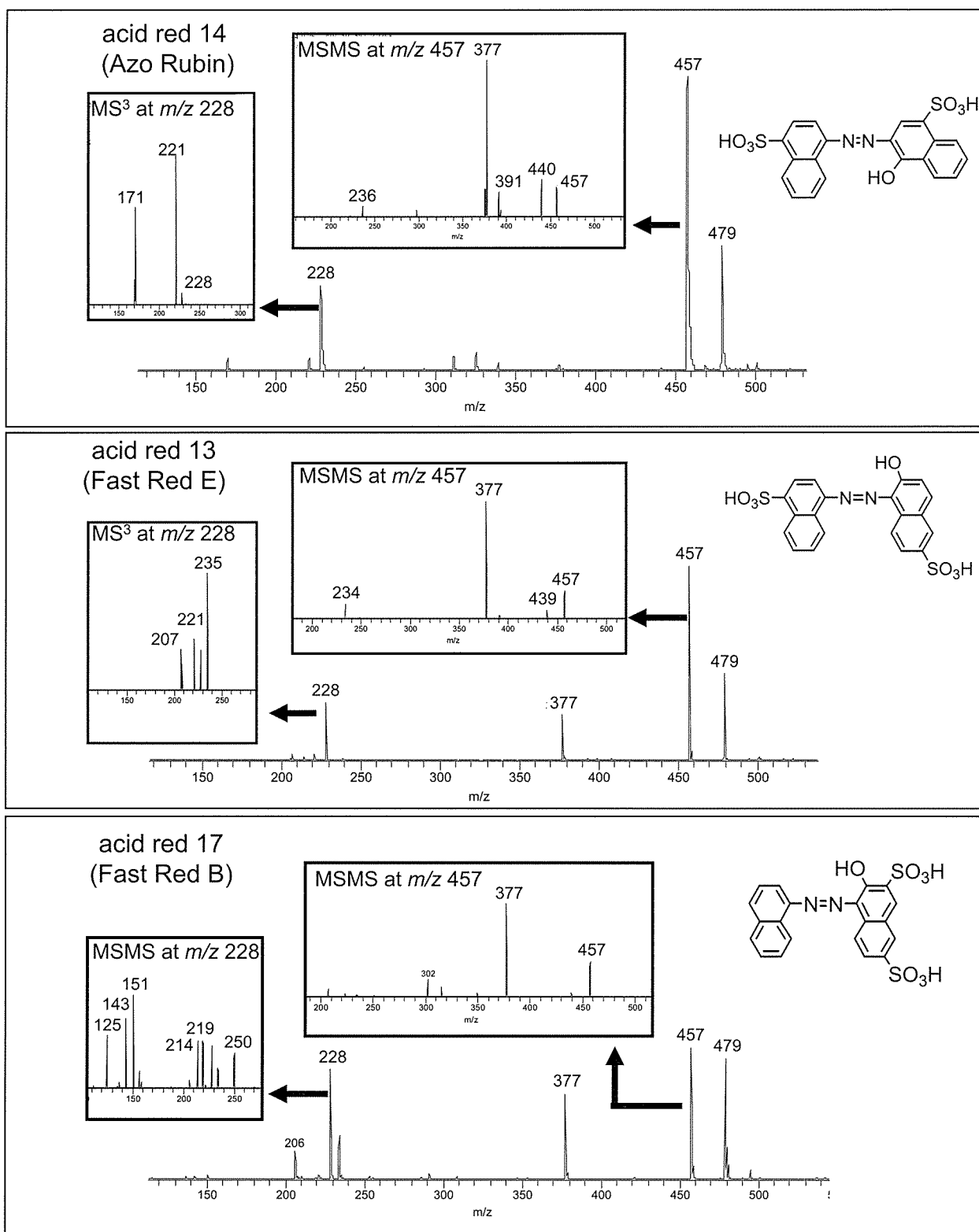


図7 二価スルホン酸アゾ染料異性体, acid red 14 (Azo Rubin), acid red 13 (Fast Red E), および acid red 17 (Fast Red B) の ESI-MS および MSMS スペクトル

Fig. 7 ESI-MS and MSMS spectra of regio isomers of azo dyes with disulfonic acid moieties, acid red 14 (Azo Rubin), acid red 13 (Fast Red E), and acid red 17 (Fast Red B).

であるが、二つのスルホン酸基の位置が異なる異性体の染料として acid red 14 (C. I. 14720, Azo Rubine), acid red 13 (C. I. 16045, Fast Red E), および acid red 17

(C. I. 16180, Fast Red B) を比較検討した。各染料の構造ならびに質量分析の結果を Fig. 7 に、その解裂様式を Fig. 8 に示した。これらの染料抽出液の ESI-MS ス

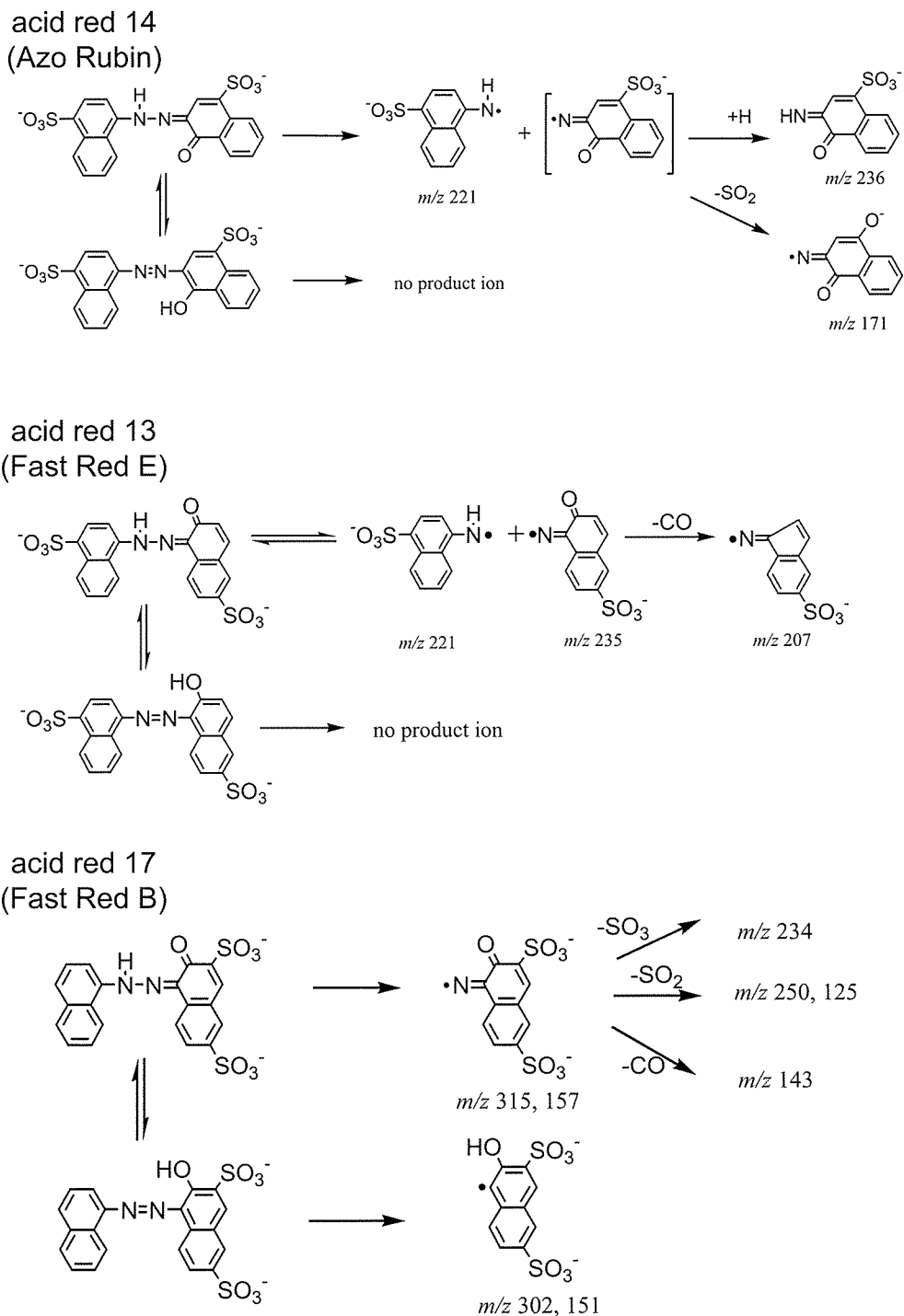


図8 acid red 14 (Azo Rubin), acid red 13 (Fast Red B) および acid red 17 (Fast Red E) の解裂様式
Fig. 8 Fragmentation patterns of Azo Rubin, Fast Red B, and Fast Red E.

ペクトルはほぼ同一であり、いずれにおいても $[M-H]^-$ に相当する m/z 457 に加えて、 m/z 228 にピークが認められた。この質量数 228 は $[M-2H]^{2-}$ 型の二価 ($z=2$) イオンに相当し、この ESI イオン化においてスルホン酸の位置によらず一価の陰イオンに加えて二価の陰イオンが生成し、容易に組成に応じた多価分子イオンが得られることを示した。この三者では観測される

分子イオンの質量数が同一である為、相互の区別は困難である。そこで MSMS スペクトルによる同定の可能性を検討した。

m/z 457 をターゲットとした場合、acid red 14 (Azo Rubin), acid red 13 (Fast Red E), acid red 17 (Fast Red B) とともに m/z 377 に SO_3 の脱離に相当するイオンが主に検出され、解裂によるフラグメントイオン

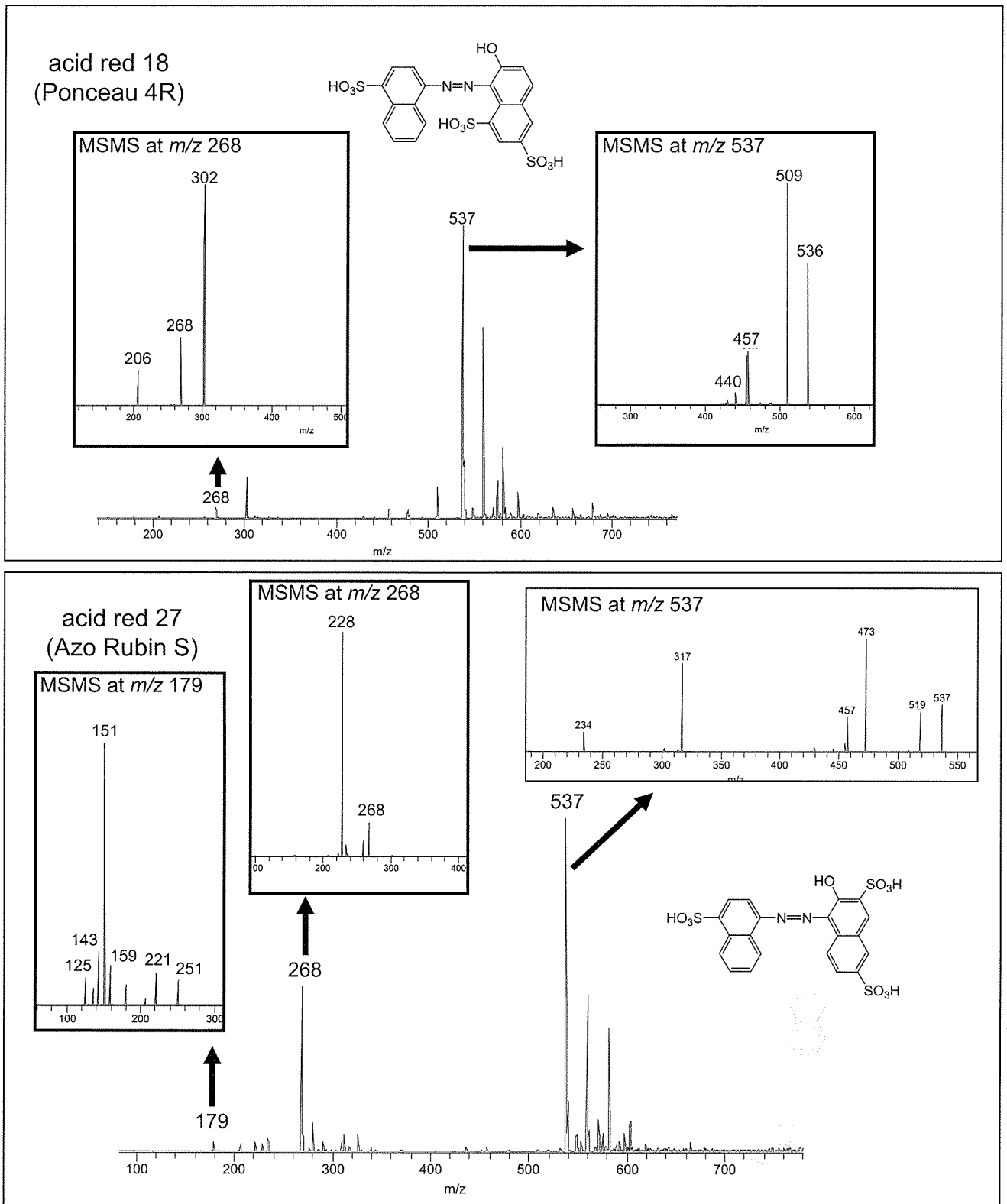


図9 三価スルホン酸アゾ染料異性体, acid red 27 (Azo Rubin S) ならびに acid red 18 (Ponceau 4 R) の ESI-MS および MSMS スペクトル
 Fig. 9 ESI-MS and MSMS of regio isomers of azo dyes with trisulfonic acid moieties, acid red 27 (Azo Rubin S) and acid red 18 (Ponceau 4 R) .

は微弱であった。それに対し二価イオンである m/z 228 をターゲットとした場合, 三者の染料のプロダクトイオンは大きく異なり, それぞれの構造に応じた特徴的なス

ペクトルを与えた。acid red 14 (Azo Rubin) では二価のイオン 228 からの MSMS により m/z 221 と 171 のイオンが認められた。これらは Fig. 8 に示したように

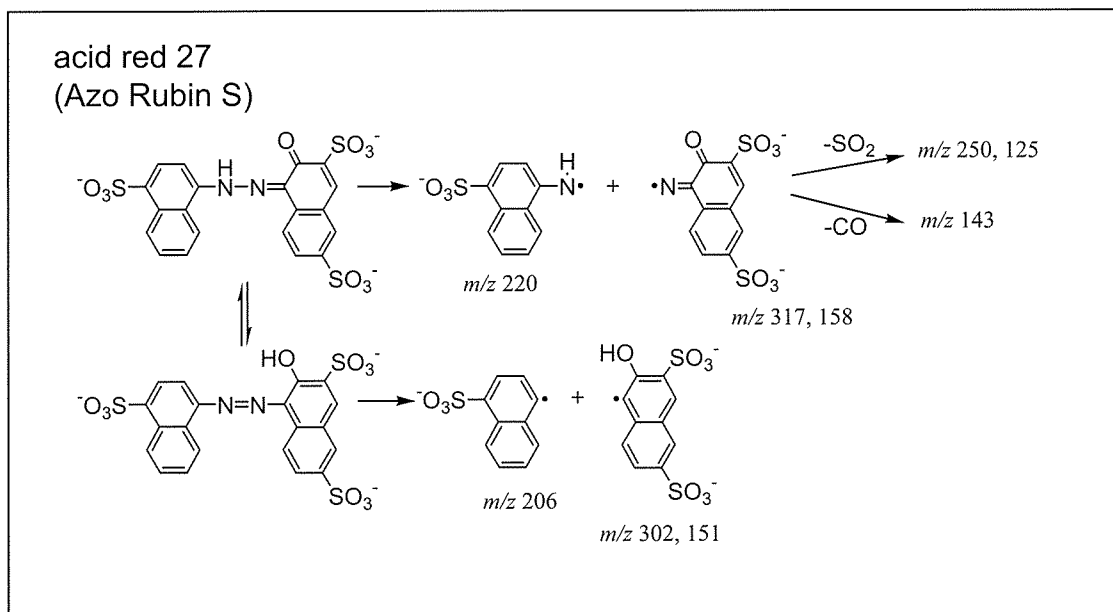
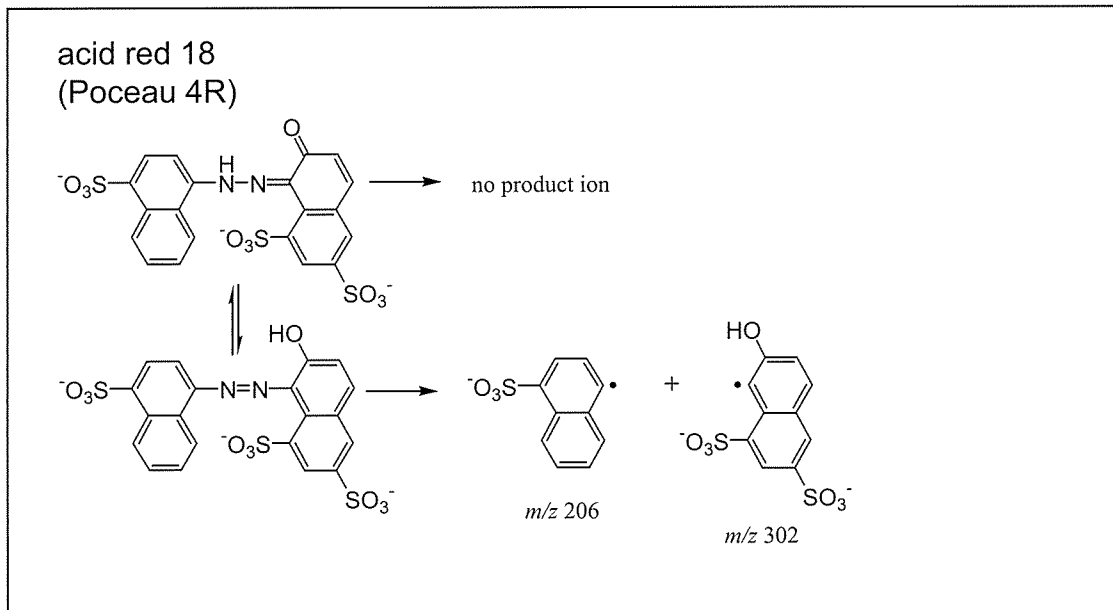


図10 acid red 18 (Ponceau 4 R) ならびに acid red 27 (Azo Rubin S) の解裂様式
Fig. 10 Fragmentation patterns of acid red 18 (Ponceau 4 R) and acid red 27 (Azo Rubin S).

ヒドラゾン型からの NH-N 結合の解裂を経て生成するイオンに相当する。acid red 13 (Fast Red E) では acid red 14 (Azo Rubin) とは異なり m/z 221, 235 ならびに 207 にプロダクトイオンが観測された。これらのイオンも同様にヒドラゾン型の NH-N 結合の解裂を経て生成するイオンであり、さらに 235 のイオンから CO の中性ロスにより 207 のイオンを生成することが特徴である。また、acid red 17 (Fast Red B) では複雑なプロダクトイオンを与えるが、ヒドラゾン型から NH-N 解裂を経て生成する m/z 125, 143 のイオンとアゾ型か

らの C-N 解裂によって生成する m/z 151 のイオンの両者の存在が特徴的であった。このようにモノスルホン酸に加えて多価スルホン酸異性体においても、単独の MS では相互の区別が困難な位置の異なる異性体染料に対して MSMS 法を適用することにより、構造による特徴的なプロダクトイオンから容易に相互に区別して同定することができることが分かった。

三個の SO_3H 基を有する染料の例として acid red 18 (C. I. 16255, Ponceau 4 R) と acid red 27 (C. I. 16185, Azo Rubin S) の測定例を Fig. 9 に、その解裂様式を

Fig. 10 に示した。通常の MS 測定により両者から m/z 537 と 268 にそれぞれ一価と二価の分子イオン $[M-H]^-$ と $[M-2H]^{2-}$ が認められた。三価のイオンは acid red 27 (Azo Rubin) においてのみ m/z 179 に認められ、acid red 18 (Ponceau 4 R) では観測されなかった。各分子イオンをターゲットとする MSMS を行った。一価のイオン m/z 537 をターゲットとする MSMS を行うと、acid red 18 (Ponceau 4 R) では N_2 および SO_3 の脱離によるプロダクトイオンが得られたが、acid red 27 (Azo Rubin S) ではヒドラゾン型からの $NH-N$ 結合解裂によるプロダクトイオンとして m/z 317 が認められ、両者で全く異なるスペクトルを与えた。二価のイオン m/z 268 における MSMS では逆に acid red 18 (Ponceau 4 R) でアゾ型から $C-N$ 結合解裂によって生成するプロダクトイオンが得られ、acid red 27 (Azo Rubin S) では SO_3 の脱離によるイオンのみが観測された。Acid red 27 (Azo Rubin S) の三価のイオン m/z 179 における MSMS では前述の acid red 17 (Fast Red B) と同様に 1-アゾ-2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸型に特有の m/z 125, 143 および 151 の結合の解裂と SO_2 , CO の中性ロスによって生成するプロダクトイオンが観測された。このように各ターゲットイオンからのプロダクトイオンのパターンはそれぞれのスルホン酸を有する骨格構造によって特有のものであり、ここで示した二つ染料の分析では三個の SO_3H 基のうち 1 カ所が異なるのみであるにもかかわらず、MSMS により明確な違いが観測され、両者を容易に区別することができた。

以上の結果は、モノスルホン酸型に加えて多価スルホン酸の染料においても通常の MS に加えて MSMS 解析を併用することにより、組成式が同一である複数の染料を区別して同定することが可能であることを示している。また、MSMS により脱スルホン酸型のプロダクトイオンとともに、 $N=N$ 結合や OH 基、 SO_3H 基の位置によりそれぞれ特徴的な質量数のプロダクトイオンを与え、染料分子の構造について極めて有用な情報が得られることが分かった。

これまでに述べた染料も含め 20 種の酸性アゾ染料の

分析結果を Table 1 に示した。表中に示した Observed Mass は観測された質量であり、各染料分子の脱プロトン型分子イオンの数値である。また、MSMS における Target とした質量はイオントラップに補足し、CID での分解を行った標的イオンの質量数である。Product には CID による MSMS により得られた質量数とその相対強度ならびにそれらの帰属を示している。これまで述べてきた一個のアゾ基 ($N=N$) を持つ染料に加えて、acid red 66 (C. I. 26905, Biebrich Scarlet B), acid red 73 (C. I. 27290, Crocein Scarlet 3 B) あるいは acid black 1 (C. I. 20470, Naphthol Blue Black) のような複数のアゾ結合を有する染料成分においても一価の陰イオン、二価の陰イオン型分子イオンが観測された。また、MSMS を適用することにより、それぞれのアゾ基の解裂に伴うプロダクトイオンが得られ、アゾ結合の数によらずこの ESI 質量分析ならびにイオントラップ MSMS 手法が同定に有効であった。また、スルホン酸基の代わりにカルボキシル基を有する acid red 2 (C. I. 13020, Methyl Red) においても、脱 H^+ 型の分子イオンが得られ、MSMS スペクトルでは脱炭酸が観測された。

4. まとめ

以上のように、質量分析により得られる分子イオンの質量数は染料分子の組成式を直接反映するものであり、この数値から染料成分を特定することが可能である。さらに、異性体の存在が想定される際には分子イオンをターゲットとする MSMS を行い、得られるプロダクトイオンから構造異性体を特定することもできる。ここで示した ESI-IT-MS による同定手法を文化財資料への応用するためには実際の経年試料を用いて検証する必要があるが、本手法は、合成染料の同定において、HPLC などの標品を要する同定法に比べて構造情報に基づく同定法としてきわめて有効である。今後、MSMS における解裂様式を一般化することにより、非経験的に構造の確定が可能になるものと考えられ、これまで有力な方法がなかった広範な合成染料の微量分析手法として文化財分析の世界に大きく貢献するものと考えている。

引用文献

- 生谷吉男 1990『京都近代染織技術発達史』京都市染織試験場 pp.22
- 佐々木良子・佐藤昌憲・肥塚隆保・河合貴之・前川善一郎・佐々木健 2001「反射分光分析による文化財染織品に用いられた天然染料の分析」『考古学と自然科学』40/41 pp.1-15
- 佐々木良子・佐々木健 2005「スペクトロスコーピーによる天然染料の分析」『絹文化財の世界』pp.156-168 角川書店
- 佐々木良子・小池富雄・矢野俊昭・佐々木健 2007a「徳川美術館蔵『兔に立波文』羽織断片の化学分析と復元」『文化財保存修復学会誌』52 pp.22-36
- 佐々木良子・松原淳子・岡田文男・土橋理子・佐々木健 2007b「紫円文コブト織り（奈良公園シルクロード交流館蔵）の材質分析—微量分析手法への顕微反射スペクトルと質量分析の適用—」『考古学と自然科学』56 pp.27-39
- 佐々木良子 2008「文化財染織品を科学の眼で見ると・・・」『繊維学会誌』64 pp.36-44
- 佐々木良子・藤井健三・佐々木健 2008「白統地雪輪波頭に菊文様小袖裂」の非破壊分析」『文化財保存修復学会誌』53 pp.35-53
- 佐々木良子・佐々木健 2009「染織文化財に用いられた染料の微量分析手法の開発（1）ESI イオン化質量分析によるアントラキノン系赤色染料の同定」『考古学と自然科学』59 pp.83-95
- 佐々木良子・梶谷宣子・佐々木健 2009「染織文化財に用いられた染料の微量分析手法の開発（2）インドムガール時代絨毯の赤色染料の分析」『考古学と自然科学』59 pp.97-108.
- Ballantine, J., Games, D. E., Slater, P. S. 1995 The use of amine base to enhance the sensitivity of electrospray mass spectrometry towards complex polysulphonated azo dyes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 9 pp.1403-1410
- Gross, J. H. 2004 *Mass Spectrometry*, pp.441-474, Springer, New York
- Holčapek, M., Jandera, P., Zderadička, P., 2001, High performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of sulphonated dyes and intermediates, *J. Chromatogr. A*, 926 pp.175-186.
- Leonardo, D. D., Antonio, D. N., Loredana, M., Fabio, M., Anna, N., Raffaele, S., Giovanni, S. 2007 High-throughput mass spectrometry: the mechanism of sudan azo dye fragmentation by ESI tandem mass spectrometry and extensive deuterium labeling experiments, *J. Mass Spectrom.* 42 pp.1057-1061
- Rowe, F. M. ed. 1924 *Colour Index First Edition*, The Society of Dyers and Colourists
- Sutthivaiyakit, P., Achatz, A S., Lintelmann, A J., Aungpradit, T., Chanwirat, A R., Chumanee, A S., Kettrup, A A., 2005 LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis., *Anal. Bioanal. Chem.* 381 pp.268-276
- Sullivan, A. G., Garner, R., Gaskell, S. J., 1998 Structural analysis of sulfonated monoazo dyestuff intermediates by electrospray tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 12 pp.1207-1215
- Sasaki, Y., Sato, M., Omura, M, Sasaki, K. 2008 Dye Analysis of Braids Used for Japanese Armor Dating from the 14th to 16th Centuries, *Dyes in History and Archaeology*, 21 pp.119-126
- Sato, M., Sasaki, Y. 2003 Blue and Purple Dyestuffs used for Ancient Textiles, *Dyes in History and*

Archaeology, 19 pp.100-105

van Bommel, M. R., Berghe, I. V., Wallert, A. M., Boitelle, R., Wouters, J., 2007 High-performance liquid chromatography and non-destructive three-dimensional fluorescence analysis of early synthetic dyes. *J. Chromatogr. A*, 1157 pp.260-272

Volná, K., Holáček, M., Kolářová, L., Lemr, K., Čáslavský, J., Kaýer, P., Poustka, J., Hubálek, M. 2008 Comparison of negative ion electrospray mass spectra measured by seven tandem mass analyzers towards, library formation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 pp.101-108

(2010年3月2日受付, 2010年11月8日受理)

Development of Micro-Analytical Techniques for Dyes in Historic Textiles (3): ESI Mass Spectrometric Analysis of Early Acid Azo Dyes

Yoshiko SASAKI¹⁾ and Ken SASAKI²⁾

¹⁾ The Museum and Archives, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585 Japan

²⁾ Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585 Japan

Identification of azoic acid dyes by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) have been investigated. By the ESI-MS analysis, acid red 88 (Fast Red A) gave only deprotonated molecular ion $[M-H]^-$ in a low concentration corresponding to the extract from 0.01 μ g of dyed cloth. Structural isomers of dyestuffs with a same molecular composition were easily discriminated by the application of MSMS method targeted on the molecular mass. The structural identification of regio-isomers was achieved by MSMS analysis, which gave characteristic product ions attributed to the neutral losses of small molecules (N_2 , SO_3 , SO_2 , and $C=O$), and to two patterns of bond fission ($NH-N$ hydrazone form and/or $C-N$ bond in azo form). Polysulfonated azoic acid dyes gave multi-valent ions in addition to the mono-valent ion, and the MSMS method was also effective for discrimination of regio-isomers. Thus, ESI-MS method combined with MSMS was fairly effective for identification of early synthetic azo dyes in cultural textiles which had no applicable methods so far.