

Annexe 5

Analyse du contenu d'une ampoule de pèlerinage

Analyses biochimiques du contenu d'une fiole en plomb

Abbaye de Grandmont (Vienne, XII^e s.)

Resp. étude : Nicolas Portet (LandArc)



Analyses : Nicolas Garnier

Notes pour la lecture des données

Pour les analyses organiques, les chromatogrammes sont présentés dans leur intégralité. L'abscisse correspond au temps d'analyse (en min), les ordonnées à l'intensité de chaque pic chromatographique. La chromatographie permet de séparer les différentes molécules une à une à partir d'un mélange de constituants chimiques souvent complexe. Pour chaque molécule, le spectre de masse est enregistré en mode impact électronique (EI, 70 eV) et permet de déduire la structure du composé et de l'identifier. Sauf pour quelques marqueurs rarement identifiés et à forte valeur informative, nous ne présentons pas les spectres de masse mais seulement le nom des composés, en annotation des pics chromatographiques.

Par souci de clarté, les marqueurs sont abrégés ainsi :

- acides gras, notés $n:i$, n correspondant au nombre d'atomes de carbone constitutifs et i au nombre d'insaturation(s),
- diacides, notés $n:0$ -dioic, n correspondant à leur nombre d'atomes de carbone,
- acides fonctionnalisés par des groupements hydroxyles notés OH, (OH)₂, (OH)₃, ...
- acides gras linéaires et ramifiés : n , a et i correspond respectivement aux isomères linéaire, *anteiso*- et *iso*-,
- alcools aliphatiques, notés $n:ol$, n correspondant à leur nombre d'atomes de carbone,
- alcanes, repérés par des triangles (▼),
- phtallates, abrégés en *pht.,

Le symbole * précédant le nom d'un marqueur indique une pollution provenant généralement de produits synthétiques et non naturels.

Les chromatogrammes étant souvent très complexes, nous présentons le chromatogramme global (TIC : courant ionique total) correspondant à la somme des ions détectés par le spectromètre de masse. Un second graphique présente le fragmentogramme d'ions de masse précise, par exemple le fragmentogramme de l'ion à m/z 132, ion caractéristique des acides gras triméthylsilylés. Il permet de mieux identifier et comparer la distribution des acides gras libres présents dans l'échantillon.

Analyse biochimique du contenu d'une ampoule en plomb

Problématique

Détecter et identifier la nature des contenus organiques d'une ampoule en plomb encore scellée et provenant des fouilles de l'abbaye de Grandmont (Limousin, XII^e s).

Méthodologie mise en place

L'ampoule en plomb, encore scellée, a été confiée au laboratoire avant toute restauration. Devant l'impossibilité d'ouvrir le « bouchon », le choix s'est tourné de faire un petit trou au fond, non visible, de la fiole et d'extraire le liquide. Un prélèvement aux solvants est ensuite effectué.

Afin d'identifier la nature des matériaux biologiques potentiellement conservés dans l'ampoule, nous proposons d'en analyser la composition chimique selon une méthodologie en deux étapes, développée au sein du laboratoire et comprenant :

- une première extraction et l'analyse de l'extrait par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) permettant l'identification des marqueurs solubles (marqueurs des graisses, cires, huiles, résine, poix, gommés... marqueurs de végétaux comme le chêne, le bouleau et les matériaux fossiles...); méthode classique publiée dans Charters *et al.*, 1995 ;¹

- une seconde extraction acido-catalysée du résidu déjà extrait, et l'analyse de cet extrait par GC-HRMS donnant accès aux marqueurs insolubles et/ou polymérisés (notamment les marqueurs de fruits dont le raisin et le vin, les huiles siccatives, les tannins polymérisés...)². Les deux étapes permettent d'identifier la majorité des marqueurs organiques conservés, de faible poids moléculaire (analysables par chromatographie en phase gazeuse).

Le couplage GC-HRMS inclut une méthode séparative et une méthode d'analyse structurale. Il permet d'identifier, un à un, chaque marqueur moléculaire conservé grâce à son spectre de masse mais aussi grâce à sa masse exacte déterminée par la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) mise en œuvre depuis septembre 2019 au laboratoire. Les associations moléculaires identifiées permettent alors de remonter aux sources biologiques, de préciser l'état de conservation-dégradation du matériau et d'obtenir des informations sur la chaîne opératoire des matériaux. La méthode est adaptée à des micro-restes, de l'ordre du µg de matière organique conservée et permet une identification détaillée et sûre, que ne permettent pas les analyses plus classiques dites spectrales comme la

1. Charters, S., Evershed, R. P., Blinkhorn, P. W., & Denham, V. (1995). Evidence for the mixing of fats and waxes in archaeological ceramics. *Archaeometry*, 37(1), p. 113-127. <http://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1995.tb00730.x>

2. Garnier, N., & Valamoti, S. M. (2016). Prehistoric winemaking at Dikili Tash (Northern Greece): integrating residue analysis and archaeobotany. *Journal of Archaeological Science*, 74, p. 195-206.

spectrométrie infrarouge par exemple.³ Celle-ci ne donne des informations que sur la présence de certaines fonctions chimiques, mais ne permet en aucun cas d'identifier avec certitude une molécule, encore moins un mélange de molécules comme c'est le cas pour les produits naturels.

1. Protocoles opératoires

1.1. Extraction des composés lipidiques solubles

L'ampoule a été dégagée de son sédiment en son pied, afin d'éviter des pollutions lors du prélèvement. Un petit trou a été foré à l'aide d'une mèche à pointe diamant, en son fond. A l'aide d'une pipette Pasteur, le liquide a pu être retiré : 19.6 mL d'une solution aqueuse peu trouble. Une fois tout le liquide retiré, un prélèvement aux solvants a été effectué par l'introduction de 2×4 mL d'un mélange de solvants organiques dichlorométhane / méthanol (1:1 v/v). Les deux prélèvements ont été rassemblés, centrifugés, filtrés sur silice pour éliminer les microparticules en suspension, séparés en deux fractions, évaporées à sec et l'une des deux dérivatisée par triméthylsilylation. La dérivatisation permet d'obtenir une bonne séparation et une bonne résolution chromatographiques. Les groupements chimiques sont transformés en des groupes triméthylsilyle notés TMS, moins polaires, par réaction de triméthylsilylation. Pour ceci, une fraction de l'extrait précédent évaporé à sec est dérivatisée par un mélange de pyridine (5 μ L) et de BSTFA (*N,O*-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide, 50 μ L) à 80 °C pendant 30 min. Après évaporation sous courant d'azote à 40 °C, l'extrait organique triméthylsilylé est repris dans 50 μ L de cyclohexane.

1.2. Extraction des dérivés insolubles et polymérisés

Le résidu sec déjà extrait, séparé par centrifugation, est traité en milieu acide fort par un mélange de trifluorure de bore et *n*-butanol dans le cyclohexane. Le protocole publié (Garnier et Valamoti, *J. Arch. Science*, 2016) a été amélioré par l'introduction d'une extraction assistée par micro-ondes, non encore publiée. L'extrait organique obtenu par ce protocole est lavé, séché puis dérivé par triméthylsilylation comme précédemment. Le résidu sec déjà extrait est traité en milieu acide fort par un mélange de trifluorure de bore et *n*-butanol dans le cyclohexane. Le protocole publié (Garnier et Valamoti, *J. Arch. Science*, 2016) a été amélioré par l'introduction d'une extraction assistée par micro-ondes, non encore publiée. L'extrait organique obtenu par ce protocole est lavé, séché puis dérivé par triméthylsilylation comme précédemment.

3. Garnier, N. (2016). Quel rôle pour les chimistes dans les recherches en archéologie ? In *AHR-33 - Histoires Matérielles : terre cuite, bois, métal et autres objets, des pots et des potes : Mélanges offerts à Lucien RIVET*, textes réunis par David Djaoui. Ed. Mergoïl, Autun, p. 31–50.

1.3. Analyse GC-HRMS

1 μL de l'extrait dérivé est injecté dans le chromatographe pour l'analyse en HRGC, dont les caractéristiques sont : chromatographe Thermo Trace 1300, colonne Zebron-5MSi 20 m \times 0.18 mm diam. interne \times 0.1 μm phase greffée, gaz vecteur hélium 120 kPa (8 min) \rightarrow 240 kPa (4 kPa \cdot min⁻¹, 5.0 min) ; injecteur en mode splitless maintenu à 280 °C ; programmation en température : 50 °C (8 min) \rightarrow 350 °C (10 °C \cdot min⁻¹, 5.0 min). Le chromatographe est couplé à un spectromètre de masse haute résolution Thermo Exactive. La source est maintenue à 230 °C. Les analytes sont ionisés par impact électronique avec un faisceau d'électrons d'énergie 70 eV. L'analyseur Orbitrap balaie la gamme de masse 50-650 amu à /s, soit 7 spectres par seconde, avec une résolution 60 000.

2. Résultats

L'ampoule de plomb a livré un liquide aqueux très peu trouble. Ce contenu a été transféré dans un tube en verre à septum Teflon mais n'a pas été analysé car les marqueurs les plus intéressants sont de nature lipidique et donc hydrophobes. Cette eau est probablement entrée dans l'objet après son dépôt, par infiltration. Le rinçage de la paroi interne avec des solvants organiques a donné un premier extrait lipidique extrêmement riche et intéressant (Figure 1), constitué :

- d'acides gras à distribution resserrée (14:0 – 18:0), très majoritairement pairs et linéaires, associés aux acides oléique (18:1) et linoléique (18:2). Alors que le premier est ubiquiste et tant présent dans les corps gras animaux que végétaux, le second est assez spécifique des huiles végétales, notamment les huiles siccatives (très insaturées) ;

- des acides gras impairs, linéaires et ramifiés, associés à l'acide phytanique, tous en faible quantité, provenant de corps gras d'animal ruminant. Le squalène pourrait leur être lié ;

- de stérols, exceptionnellement concentrés. Le rapport cholestérol / sitostérol 0.24 indique que les corps gras sont très majoritairement d'origine végétale. La quantité de stérols végétaux est ici remarquable, avec une grande diversité (Tableau 1) : l'isofucostérol et très abondant par rapport au sitostérol. On identifie de nombreux stérols mineurs : clérostérol, $\Delta^{5,24}$ -stigmastadiénol, Δ^7 -avénastérol, citrostadiénol et des triterpènes, cycloarténol, 24-méthylène cycloartanol et amyrines. La composition des phytostérols est compatible avec la noisette, *Corylus avellana*. On note des traces de lanostérol, d'ergostérol et de néoergostérol. Le premier est présent, en composé mineur, dans les huiles végétales, les seconds de levures ;

- de traces d'acide déhydroabiétique libre et méthylé, issu de poix de conifère. L'acide abiétique, dans des concentrations relatives importantes par rapport aux autres acides diterpéniques, indique du sapin (*Abies* sp.) ;

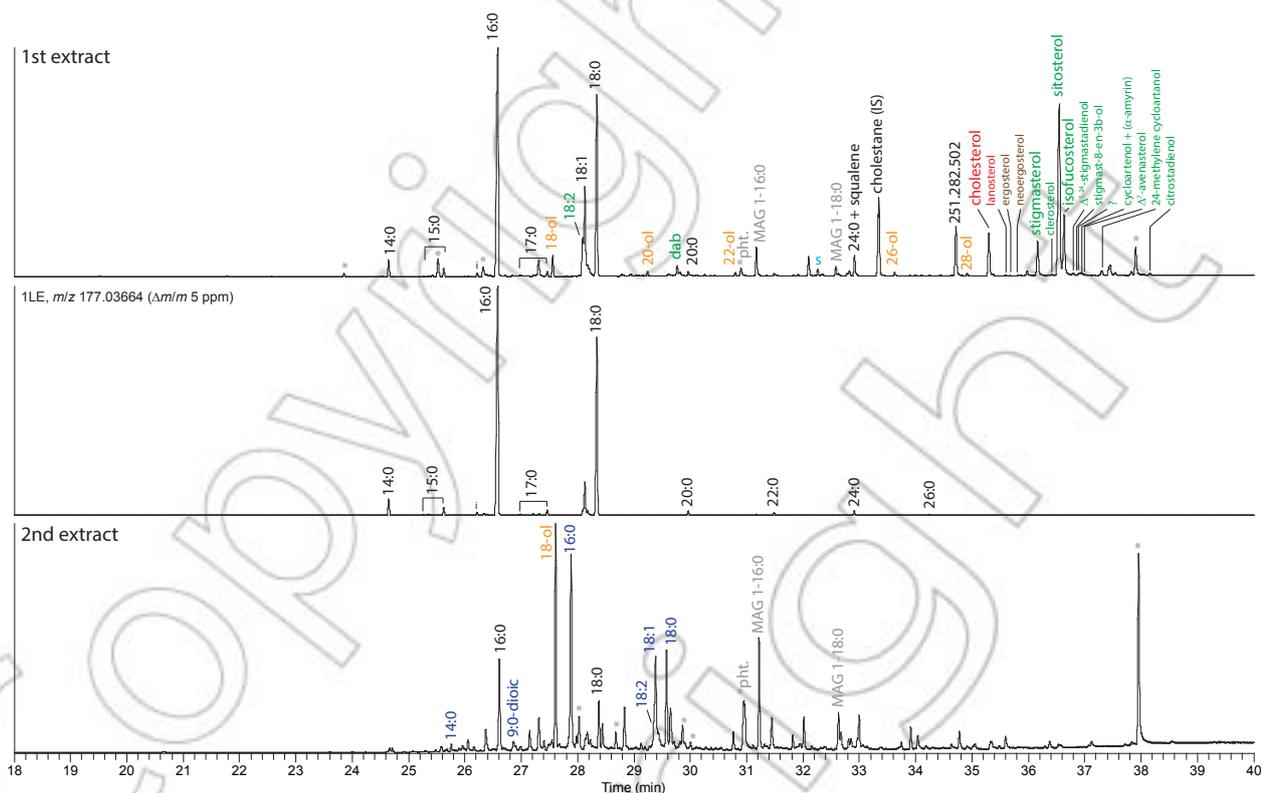


Figure 1. Chromatogrammes du premier et du second extraits lipidiques obtenus à partir des dépôts prélevés par solvant sur la paroi interne de l'ampoule de plomb, triméthylsilylés (colonne ZB5-MSi, détecteur Exactive mode EI 70 eV résolution 60k).

t_R (min)	Composé	Principaux fragments ioniques (m/z)
35.29	cholesterol	458 453 368 353 329 255 129
35.37	cholestanol	460 445 403 329 215 147
36.58	5 α -cholest-7-en-3 β -ol (= lanosterol), acetate	458 443 353 255 213 145 105
35.82	ergosterol, acetate	468 378 363 337 253 211 157
35.84	neosterol	456 441 362 337 237 210 195
35.97	campesterol	472 457 382 367 343 255 159 129
36.16	stigmasterol	484 394 282 255 213 159 129
36.42	cleroesterol	484 394 379 343 281 253 129
36.51	β -sitosterol	486 471 357 275 255 129
36.63	isofucoesterol (= Δ^3 -avenasterol)	484 469 386 371 296 281 253 211
36.80	$\Delta^{5,24}$ -stigmastadienol	484 386 343 296 281 253 211
36.88	stigmast-8-en-3 β -ol	486 381 345 255 229 213
36.89	n.d.	484 471 396 381 269 255 213
36.94	cycloartenol + (α -amyrin)	484 408 393 365
36.99	Δ^7 -avenasterol	484 469 386 371 343 296 281 253
37.29	24-methylene cycloartanol	512 422 407 379 353
37.55	citrostadienol	498 483 400 357 267 145

Tableau 1. Stérols et triterpènes identifiés dans le premier extrait de l'ampoule de plomb.

- très peu de pollutions par des matériaux synthétiques (notés en gris).

Le second extrait montre :

- les acides gras pairs majoritaires 14:0 – 18:0 ;
- les acides 18:1, 18:2 et les diacides à courte chaîne dominés par l'acide azélaïque (9:0-dioic) profil caractéristique d'une huile végétale dégradée par oxydation naturelle ;
- aucun acide de fruit ni de fermentation alcoolique.

Conclusion. — L'ampoule de plomb a contenu très majoritairement une huile végétale, donnant des quantités exceptionnelles de phytostérols. L'acide linoléique et les stérols identifiés, dont l'isofucostérol abondant, vont dans le sens d'une huile de noisette. On note aussi une faible quantité de poix de conifère, probablement de sapin *Abies* sp., et de corps gras d'animal ruminant.