

# SPECTRA ANALYSE

LA REVUE DE L'INSTRUMENTATION PHYSICO-CHEMIQUE

## Matériaux du patrimoine

N° 285 - AVRIL - MAI 2012 - 17 €

### LABORATOIRE

- L'archéologie moléculaire et structurale à la frontière des disciplines

### SCIENCES ANALYTIQUES

- Biomarqueurs sur un adhésif végétal néolithique
- Lipides archéologiques
- Thermographie et peintures murales
- Statistiques d'ordre supérieur et thermographie
- Spectrométrie de mobilité ionique et agrégation des protéines

### FICHE D'APPLICATION

- Full scan data acquisition using LC-MS

### INNO PÉDAGOGIE

- Formations innovantes pour clusters technologiques





Nicolas GARNIER<sup>1,\*</sup>, Caroline TOKARSKI<sup>2</sup>, Christian ROLANDO<sup>2</sup>

## Spectrométrie de masse et lipides archéologiques

### RÉSUMÉ

L'analyse des corps gras retrouvés en contexte archéologique s'est souvent limitée à la seule détermination des acides gras. Cependant, comme les profils de distribution en acides des produits naturels sont souvent proches et que les témoins archéologiques sont très ténus et fortement dégradés, il n'est pas possible de remonter rigoureusement aux sources. Les triglycérides natifs sont rarement conservés, car hydrolysés. Néanmoins, des traces minimales suffisent à leur analyse directe par spectrométrie de masse en mode nanospray. Le profil des triglycérides (TAGs) ainsi que la distribution en acides gras pour des marqueurs isobares permet, par comparaison à des échantillons modernes de référence, d'identifier les sources. La méthode, appliquée à l'analyse du contenu d'amphores et de lampes à huile antiques a permis d'identifier de l'huile d'olive, de sésame, des graisses de bœuf, que les arguments chimiques habituels ne permettaient d'atteindre.

### MOTS-CLÉS

Lipidomique, spectrométrie de masse, triglycérides, lampes à huile, amphores

### Mass spectrometry and archaeological lipids

### SUMMARY

*The analysis of fatty materials found in archaeological contexts has often focused on the determination of fatty acids alone. However, as the fatty acid profiles for natural products are often close and as the archaeological artefacts are very tenuous and strongly degraded, it is not possible to strictly trace the sources. The native triacylglycerols (TAGs) are rarely preserved, but hydrolysed. Nevertheless, traces are enough for their direct analysis by nanospray – mass spectrometry. The profile of triacylglycerols as well as the fatty acid distribution for groups of isobaric markers allows the precision of sources, by comparison to modern samples of reference. Applied to the analysis of the contents of amphorae and antique oil lamps, the method allowed identifying several substances such as olive and sesame oils, ox fat, results that were impossible to obtain with usual chemical analyses..*

### KEYWORDS

*Lipidomics, nanospray-mass spectrometry, triacylglycerols, lamp oils, amphorae*

Les triglycérides représentent environ 98 % des constituants chimiques des huiles et des graisses. Ces matériaux, fluides et totalement amorphes, ne laissent pas de traces visibles de leur utilisation dans les récipients en céramique, en pierre ou même en verre utilisés dans la vie quotidienne, culturelle et religieuse, officielle, ou encore dans les rites funéraires et que l'on retrouve lors des fouilles archéologiques. En revanche, ils peuvent imprégner les couches superficielles des parois de leurs conteneurs et être partiellement protégés des agressions du milieu environnant, notamment de l'action des micro-organismes du sol. Cependant, ils sont assez rarement conservés à l'état natif. Très sensibles aux réactions d'hydrolyse, ils

sont souvent totalement transformés en leurs acides gras constitutifs et perdus. Dans de rares cas, notamment pour les contextes anaérobies défavorisant toute vie (sites à sédimentation et envasement rapide tels les estuaires et les lacs) ou arides (déserts froids ou chauds), ils peuvent être conservés à l'état de traces. Seule la mise en œuvre de technologie analytique particulièrement sensible permet aujourd'hui leur analyse. Avant de détailler le principe de la méthodologie développée et ses applications directes, dressons un bref historique de l'analyse des lipides archéologiques, des premiers tests chimiques des savants du XIX<sup>e</sup> s. à la chromatographie et à la spectrométrie de masse.

<sup>1</sup> SAS Laboratoire Nicolas Garnier, 32 rue de la Porte Robin, 63270 Vic-le-Comte.

<sup>2</sup> Miniaturisation pour l'Analyse, la Synthèse & la Protéomique (MSAP), USR CNRS 3290, and Protéomique, Modifications Posttraductionnelles et Glycobiologie, IFR 147, Université de Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

\* Email : labo.nicolasgarnier@free.fr. Tél. : 00 33 + 9 53 09 96 15.

## I - Historique des méthodes d'analyse des lipides en archéologie

### 1. La chimie des premiers savants

Sous l'impulsion d'archéologues perplexes et curieux devant leurs trouvailles, des premiers ponts entre archéologie et chimie furent lancés. En 1848 lors de la fouille d'une sépulture gallo-romaine dite « tombe de l'oculiste » en Vendée, le non moins célèbre chimiste Michel-Eugène Chevreul fut piqué d'intérêt pour des substances visqueuses, souvent de couleur marron ou noire, emplissant à moitié certains flacons en verre et laissant échapper pour certaines quelques fragrances empyreumatiques (*voir note*). Les tests pratiqués se limitaient à des solubilisations différentielles dans l'eau ou l'éthanol, la description des odeurs ou encore la mesure de point de fusion. L'illustre savant réussit à identifier l'acide palmitique et, à tort, l'acide margarique confondu, par méconnaissance de la thermodynamique physique et des mélanges eutectiques, avec un mélange d'acide palmitique et stéarique. Plus tard en 1922, Lord Carnavon découvrit la tombe de Toutankhamon et fit appel aux chimistes Alfred Chaston Chapman et James Plenderleith pour identifier des matières grasses et cireuses contenues dans des lampes en calcite. Ils soupçonnèrent la présence de graisses animales, mais la présence de produits d'oxydation des acides gras insaturés caractérisés par des odeurs florales ou de coco les induisirent en erreur, par ignorance des mécanismes et des produits de dégradation des corps gras. Aussi, les méthodes physico-chimiques, de dosage acido-basique ou redox se sont vite montrées inefficaces pour des matériaux anciens, naturels donc par principe complexes, souvent mélangés et dégradés par action soit de l'homme soit des micro-organismes du sol. Ces premières tentatives furent bien vite oubliées, et chacun de penser que la matière organique ne pouvait se conserver en contexte archéologique.

### 2. L'apport de la chromatographie en phase gazeuse et de couplage avec la spectrométrie de masse (GC et GC-MS)

Ce n'est qu'en 1976 que des chimistes persévérants ont voulu s'intéresser au problème du contenu des amphores et à la question du vin et de l'huile qu'elles transportaient. Les épaves de côtes françaises méditerranéennes ont livré des milliers d'amphores dont des lots d'amphores hispaniques de type Dressel 20, conteneurs par excellence pour l'huile. Partant de tessons, F. Formenti a pu mettre en évidence par chromatographie en phase gazeuse de l'acide oléique imprégné dans les parois poreuses [1]. A partir des années 1990, l'amélioration des caractéristiques techniques de colonnes chromatographiques donna accès à des molécules de plus haut poids moléculaire,

des cétones à longue chaîne carbonée témoins de chauffage de triglycérides ou encore les triglycérides eux-mêmes. Mais la GC-MS ne permet la séparation de ces composés peu volatils que par leur longueur de chaîne, donnant une information limitée.

### 3. Chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (LC et LC-MS)

Les triglycérides présentent l'inconvénient d'être fortement apolaires, de ne pas absorber, pas ou trop peu, dans le domaine UV-visible. Leur détection par spectroscopie UV-visible ou par ionisation en spectrométrie de masse a longtemps représenté un obstacle pour l'analyse en LC et LC-MS. Seules les sources d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) permettaient une ionisation correcte pour une étude spectrale des triglycérides [2]. La méthode a été appliquée avec succès à l'étude d'imprégnations de différentes céramiques (lampes à huile et céramique domestique à usage culinaire). Par comparaison à des échantillons modernes de référence, les profils chromatographiques des extraits lipidiques obtenus à partir des céramiques ont révélé de la cire d'abeille, des graisses animales de ruminants ou encore de l'huile végétale, entre autre d'olive [3, 4]. Mais l'analyse des échantillons archéologiques pose le problème d'encrassement du matériel : aucune centrifugation, filtration ou autre méthode de purification ne suffit à éliminer les matières polymérisées et les nanoparticules responsables du rapide bouchage des colonnes LC. Afin de palier à ce problème, nous avons développé depuis une dizaine d'années une méthode d'analyse n'utilisant la spectrométrie de masse qu'en infusion directe des échantillons. La miniaturisation des systèmes, notamment l'utilisation des sources nanospray, permet de travailler sur des microéchantillons, quelques microlitres d'extrait contenant souvent moins de 10 ng de matière organique totale.

## II - Développements en nanospray-MS

### 1. Comment ioniser les triglycérides ?

L'analyse des triglycérides directement en phase liquide par spectrométrie de masse nécessite leur ionisation. Lors des premiers travaux, les analytes étaient ionisés en phase gazeuse par ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) grâce à une décharge Corona. Le rendement d'ionisation est assez faible, d'une part en raison de la faible volatilité des triglycérides, d'autre part à cause de leur très faible polarité. L'électronébullition (ou *electrospray* (ESI) et *nanospray* en version miniaturisée) permet d'ioniser les constituants dissouts en solution sans avoir à les évaporer au préalable. Il s'agit généralement d'une réaction acidobasique où l'analyte capte un proton par suite de l'évaporation du solvant de gouttelettes chargées

**NOTE**  
Empyreumatique : famille des odeurs brûlées, chauffées ou séchées.



et de leur éclatement en micro-gouttelettes. Mais le rendement d'ionisation dépend de la capacité de l'analyte à recevoir un proton, donc de sa basicité. Pour les molécules de type triglycérides ou cérides, l'ionisation est faible. Seuls les composés polyhydroxylés, plus polaires, donnent un signal correct [5].

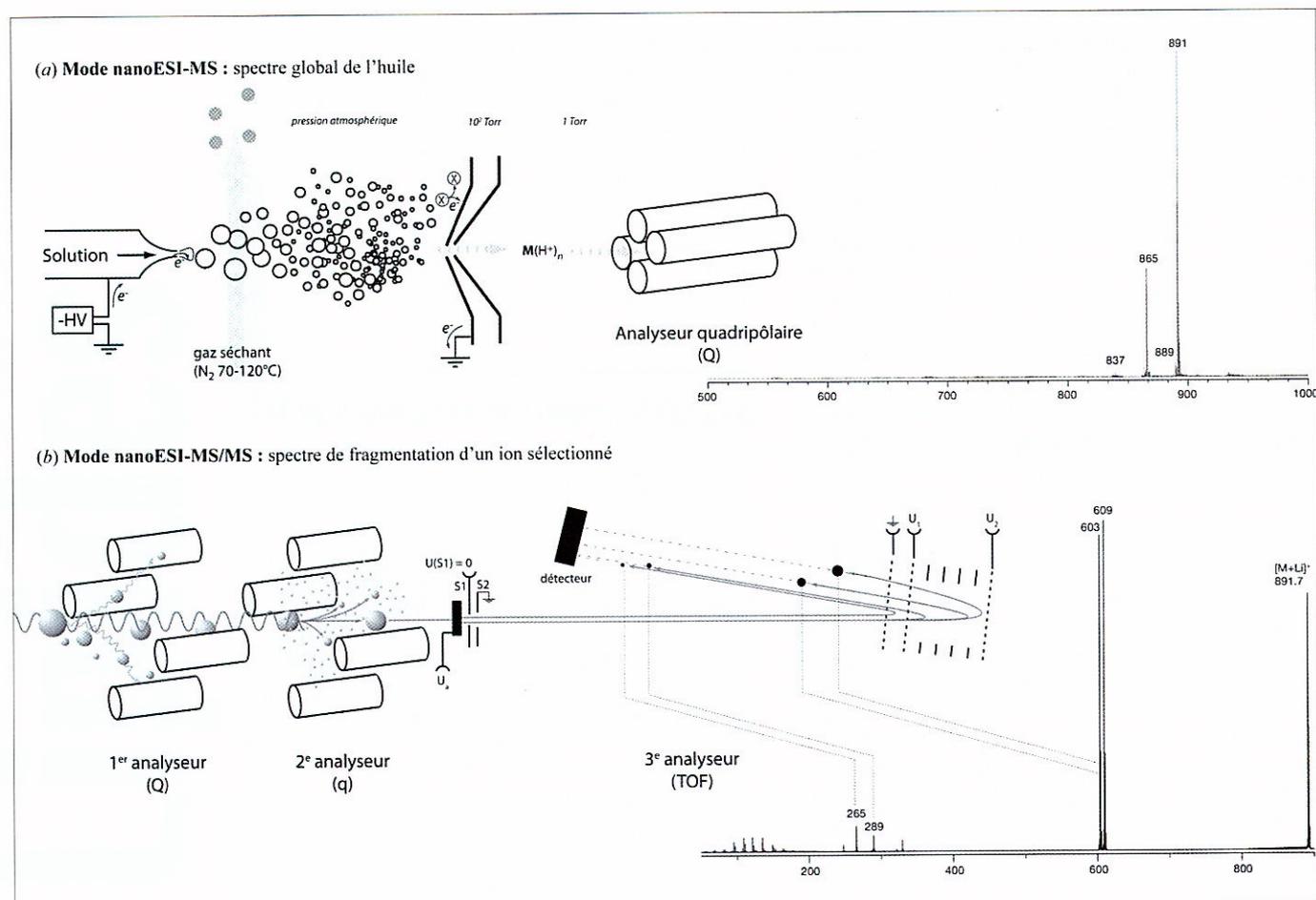
Afin d'améliorer le rendement d'ionisation, la basicité au sens de Lewis peut être mise à profit, en dopant l'échantillon par des sels métalliques. Plusieurs séries de sels ont été testées ; les composés oxygénés montrent la meilleure interaction avec les alcalins, surtout avec l'ion lithium [6]. Le même résultat a été observé avec tous les composés comportant au moins un hétéroatome électronégatif, oxygène, azote ou soufre. Ainsi, les triglycérides sont facilement ionisés, donnant un ion  $[M + Li]^+$  (Figure 1a). Contrairement à l'APCI, cette ionisation douce ne nécessite pas de hautes tensions, ce qui limite les fragmentations dans la source, améliore la sensibilité et la résolution des pics et simplifie les spectres.

## 2. Classification des matières grasses

Chaque corps gras présente un profil de triglycérides différent. Ainsi, par simple infusion en nanospray, on peut facilement reconnaître une huile végétale au profil resserré, les produits laitiers à la distribution très large (découlant de la large gamme d'acides gras présents, du 4:0 au 18:0), et les matières grasses animales au profil intermédiaire. Parmi elles, on distingue les matières grasses provenant d'animaux non ruminants, présentant uniquement des triglycérides à nombre pair d'atomes de carbone (noté ECN, *equivalent carbon number*), de ceux de ruminants avec une faible proportion de composés impairs dus au métabolisme de l'animal et aux bactéries du rumen. Les informations disponibles dans la littérature ne sont pas exploitables (composition globale en acides gras par exemple) et le développement de cette approche novatrice implique l'élaboration de bases de données dont les premiers éléments commencent à être partagés [7, 8].

**Figure 1**

Principe de la spectrométrie de masse par infusion directe en nanospray. (a) L'huile d'olive lithiée donne le spectre nanoESI-MS présenté à droite. (b) L'ion majoritaire à  $m/z$  891 est sélectionné dans le 1<sup>er</sup> analyseur (Q), excité et fragmenté dans le 2<sup>nd</sup> analyseur transformé en cellule de collision. Les ions fils sont analysés dans le 3<sup>ème</sup> analyseur, ici un temps de vol (ToF en mode reflectron). Le spectre de fragmentation MS/MS, révélant seulement la perte d'acide oléique libre et lithié par formation des ions respectifs à  $m/z$  609 et à  $m/z$  603, permettant d'identifier la trioléine. Aux plus basses masses, on observe de faibles fragmentations correspondant à la perte d'un second substituant acide gras, et à une fragmentation très minime des chaînes alkyles, contrairement aux autres techniques comme l'APCI.



### 3. Analyse MS/MS et structure moléculaire

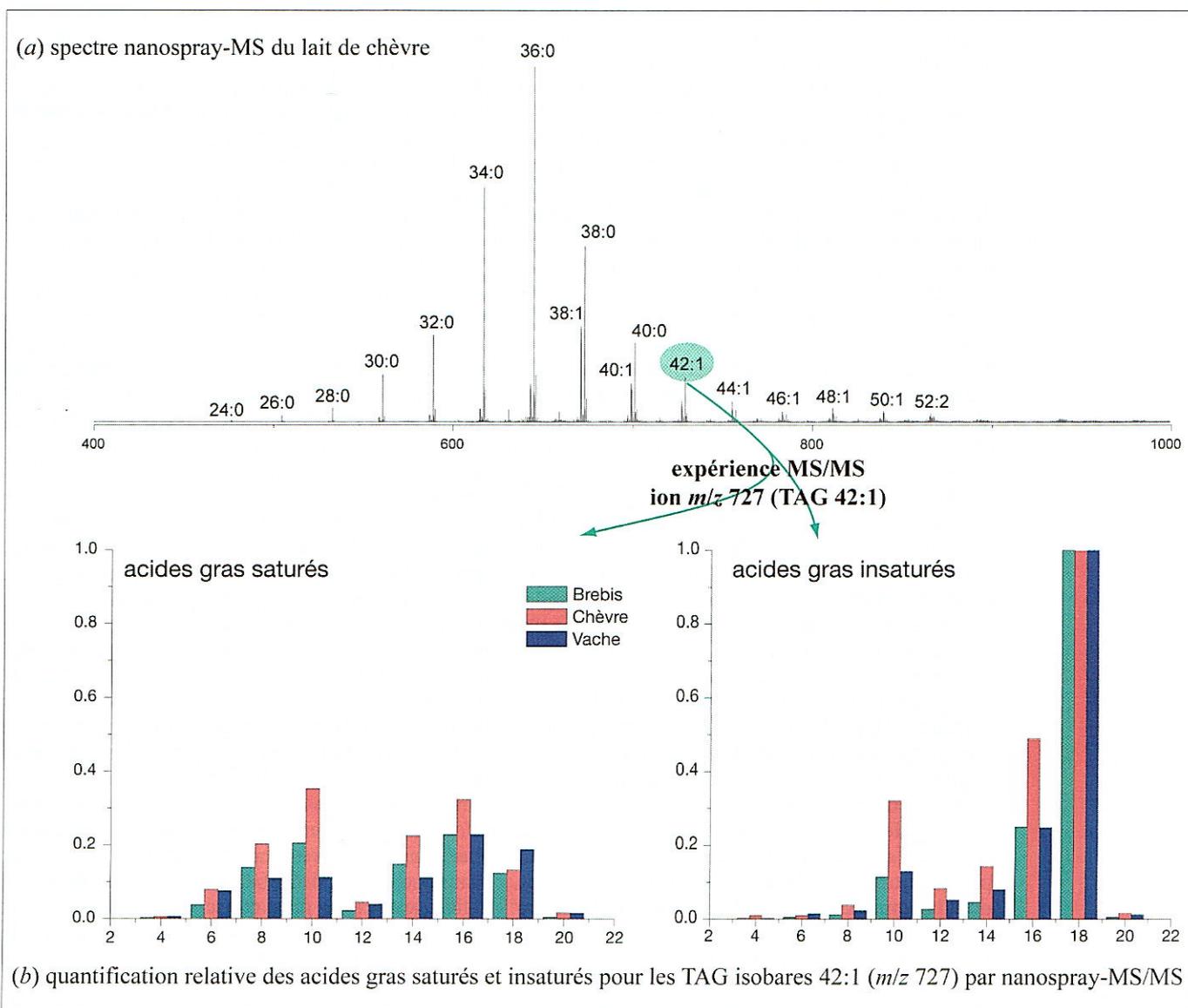
Une seconde étape d'analyse consiste à analyser chaque composé détecté sous forme d'adduit lithié  $[M + Li]^+$  en spectrométrie de masse tandem, MS/MS. Un à un, chaque ion est sélectionné et fragmenté après excitation par collision avec des molécules de gaz neutre, de l'argon dans notre cas. Contrairement aux expériences MS/MS conduites sur des analytes protonés  $MH^+$ , la lithiation entraîne non seulement une amélioration de la sensibilité, mais aussi une orientation des mécanismes de fragmentation. Ainsi, les spectres de fragmentation MS/MS obtenus sont beaucoup plus simples et plus

intenses que ceux de molécules protonées. Les triglycérides donnent une fragmentation simple, en perdant dès les basses énergies de collision un groupement acide gras soit sous forme libre, soit sous forme lithiée, conduisant à la formation de deux pics intenses  $[M + Li - RCOOH]^+$  et  $[M + Li - RCOOLi]^+$ . Un triglycéride homogène (i.e. constitué de trois substituants acides gras identiques) conduira donc à un spectre MS/MS : ainsi la trioléine lithiée  $[M + Li]^+$  à  $m/z$  891 donne deux fragments intenses à  $m/z$  603 et à  $m/z$  609, par perte respective d'acide oléique lithié et neutre (Figure 1b). Un triglycéride hétérogène donnera autant de doublets qu'il contient de substituants acides gras différents.

**Figure 2**

(a) Spectre par infusion directe en nanospray-MS du lait de chèvre lithié, montrant une distribution large des TAGs.

(b) La distribution en acides gras est déterminée pour chaque groupe de TAGs isobares, par sélection de l'ion parent et expérience MS/MS. Le spectre de fragmentation donne des couples d'ions fragments  $[M + Li - RCOOH]^+$  et  $[M + Li - RCOOLi]^+$  dont les intensités sont traduites sous forme de diagrammes. En abscisses, la longueur de chaîne des acides gras quantifiés, en ordonnées leur proportion relative, l'intensité 100 correspondant à l'acide gras le plus abondant, saturé ou insaturé, ici l'acide oléique 18:1 (les échelles des deux diagrammes sont identiques). Le TAG 42:1 d'ion parent à  $m/z$  727 permet de distinguer les trois espèces animales, la chèvre, la brebis et la vache.



### III - Application en archéologie

Cette approche nouvelle développée depuis une dizaine d'années, a montré tout son potentiel pour l'analyse des marqueurs moléculaires peu polaires oxygénés. Cependant, les données concernant la composition chimique des matériaux modernes, produits laitiers, graisses ou huiles, notamment dans la littérature agro-alimentaire, phytochimique ou pharmacognosique, n'est absolument pas exploitable. En effet, l'information telle la composition globale en acides gras d'un corps gras obtenue après saponification ne reflète en rien la distribution des triglycérides, et encore moins la structure moléculaire de chacun d'eux. Il a donc été nécessaire d'élaborer une base de données de constitution chimique de chaque triglycéride à partir des spectres MS/MS, pour chaque matériau envisagé, avant de pouvoir appliquer la méthodologie aux échantillons anciens.

#### 1. Discrimination des produits laitiers

Tous les produits laitiers révèlent un spectre large caractéristique (ECN 22 – 54), souvent bimodal dominé par l'ECN 36, excepté le lait de dromadaire dont le spectre MS est proche de celui d'une graisse animale [7] (c'est d'ailleurs le seul lait dont on ne peut faire de fromage !). Par expérience MS/MS, la distribution relative en acides gras de chaque pic isobare de triglycérides peut être déterminée. Par exemple, le triglycéride saturé lithié à  $m/z$  645 (ECN 36) présente une distribution d'acides gras saturés différente pour la vache et pour les ovins [7]. Pour les triglycérides insaturés comme le TAG monoinsaturé 42:1 à  $m/z$  727, une double information est obtenue par l'étude de la distribution des acides gras saturés et insaturés, permettant ainsi de recouper les informations obtenues par des deux classes de composés pour chaque massif isobare [7]. La figure 2 montre le traitement de l'information lors de l'expérience : à partir du spectre ESI-MS, un ion est sélectionné, ici l'ion à  $m/z$  727 (Figure 2a). Le spectre MS/MS de cet ion (non représenté) montre des fragments  $[M + Li - RCOOH]^+$  et  $[M + Li - RCOOLi]^+$  dont les intensités sont quantifiées, relativement au pic le plus intense. Les données sont ensuite représentées sous forme de deux histogrammes éclatés et parallèles, traduisant l'intensité relative de chaque acide gras pour un groupe de TAGs isobares. Ainsi, l'ion à  $m/z$  727 correspondant aux TAGs isobares notés 42:1 permet clairement de distinguer les produits tirés de la chèvre, de la brebis ou de la vache (Figure 2b) [9]. En revanche, la méthode ne permet pas de distinguer le lait, la crème et le fromage issus d'un même animal, tous provenant d'une même matière première, le lait, dont la composition des TAGs n'est pas altérée par les processus de fermentation.

La méthode développée a été reprise strictement et appliquée à l'étude d'imprégnations de céramiques néolithiques provenant des sites du Jura, Clairvaux

et Chalain [10]. Seule l'information des TAGs saturés a été étudiée, permettant cependant de mettre au jour des produits laitiers venant de la vache et de la brebis.

#### 2. Identification de graisses animales et d'huiles végétales

Les spectres MS/MS des TAGs majeurs peuvent être traités de la même façon. Par comparaison des distributions en acides gras des TAGs isobares entre le matériau moderne et l'échantillon archéologique, l'origine des corps gras peut désormais être totalement étayée.

En pratique, un tessou de céramique est fraisé sur 1 – 2 mm d'épaisseur, sur environ 2 cm<sup>2</sup>. La poudre recueillie est extraite par un mélange de solvants organiques et l'extrait, directement analysé par nanoESI-MS puis MS/MS. Aussi bien la préparation de l'échantillon que l'analyse sont très rapides, contrairement aux techniques de couplage. Malgré la forte dégradation des biomarqueurs et la très faible quantité de triglycérides conservés suite à leur hydrolyse naturelle et progressive en acides gras, ou encore leur mélange à d'autres matériaux tels les résines ou la poix, la méthode est assez sensible pour révéler les principaux TAGs. Ainsi, de l'huile d'olive a pu être mise en évidence dans des amphores considérées comme vinaires par les archéologues à Pisa San Rossore, par la conservation des triglycérides majoritaires de l'olive [11]. Cette découverte inattendue lance le débat de la réutilisation des amphores, qui ne seraient pas des conteneurs à usage unique et destinés à un seul type de produits, mais auraient été largement réutilisées, parfois sur des périodes de 30 à 50 ans, pour différents aliments et usages [12]. A Pompéi (79 ap. J.-C.), dans la parfumerie voisine du forum, l'enduit de cuves maçonnées a révélé des traces des mêmes triglycérides au profil et à la structure caractéristique de l'olive. L'analyse a confirmé les hypothèses des archéologues : dans cette parfumerie, des pressoirs à coin servaient à extraire l'huile d'olive la plus pure pour la confection des parfums et huiles parfumées, probablement à la rose de Campanie pour la région. Les lampes en céramique piègent aussi facilement le combustible utilisé. Du suif de bœuf a ainsi été identifié dans des lampes romaines à Olbia (Ukraine) [7]. A Pétra, dans le complexe cultuel de la chapelle d'Obodas (I<sup>er</sup> s. ap. J.-C.), nous avons étudié une série de lampes et confronté notre méthode à celle habituelle d'analyse des corps gras par saponification [13]. Cette dernière conduit à une classification des échantillons en corps gras d'origine animale et végétale totalement fautive par rapport aux résultats plus précis obtenus par l'analyse nanoESI-MS(/MS) des TAGs natifs. En effet, les acides gras conservés ne proviennent pas seulement du combustible, mais aussi de nombreuses migrations de la matière environnante, pendant les quelques 2000 ans d'enfouissement des céramiques dans le sol. L'interprétation de

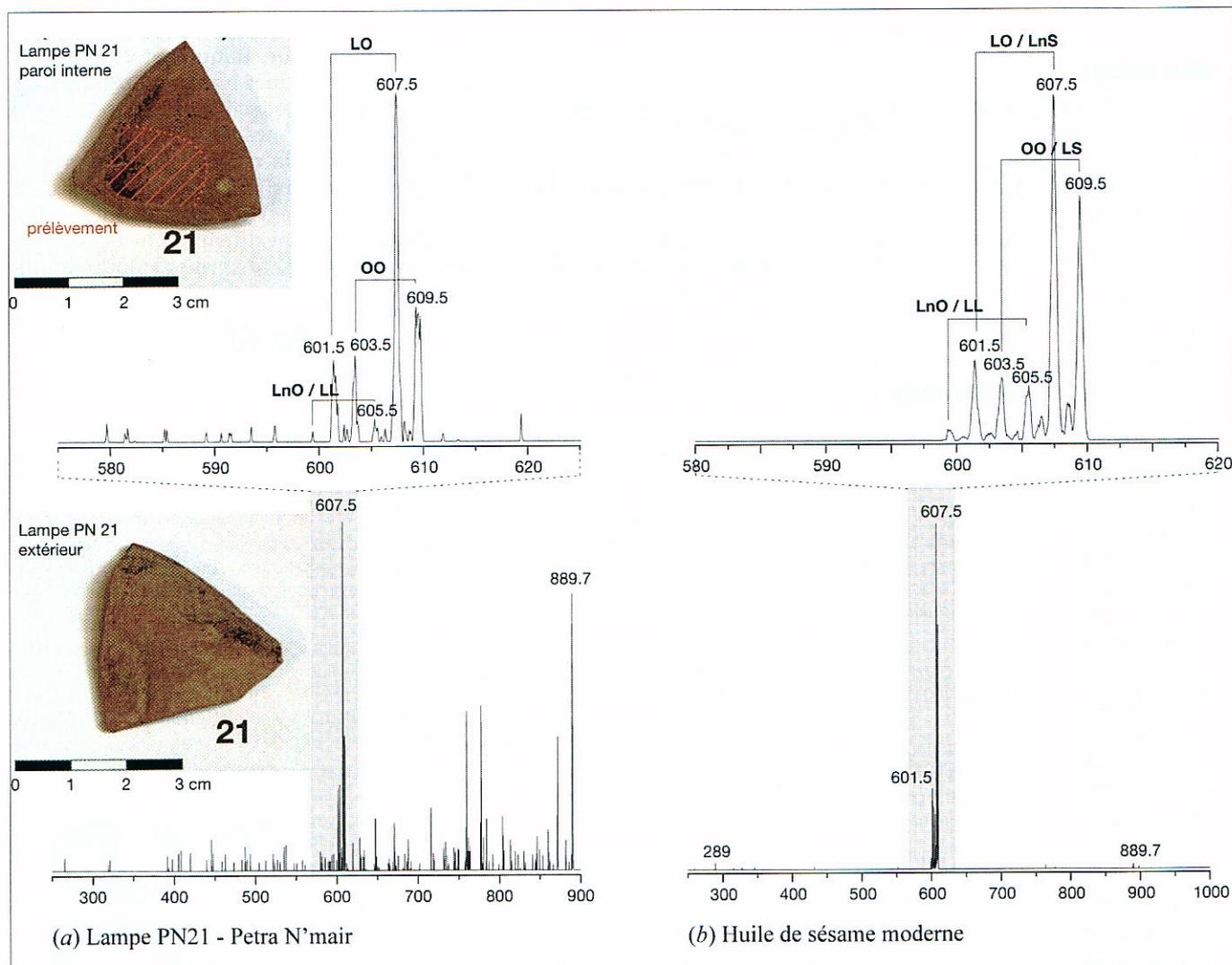


Figure 3

Comparaison des spectres nanoESI-MS/MS de l'ion à  $m/z$  889, entre l'extrait lipidique d'une lampe à huile nabatéenne (à gauche) et l'huile de sésame moderne (à droite). Les abréviations XX utilisées correspondent aux structures des diglycérides  $[M + Li - RCOOH]^+$  et  $[M + Li - RCOOLi]^+$  obtenus par fragmentation de  $[M + Li]^+$ . S : acide oléique, O : acide oléique, L : acide linoléique, Ln : acide linoléique. Les proportions relatives des fragments montrent que la composition en acides gras des TAGs isobares à  $m/z$  889 entre l'échantillon archéologique et le sésame sont strictement identiques.

la composition en acides gras d'un prélèvement, comme il est usage classiquement tant pour les échantillons anciens et dégradés que pour des échantillons plus récents ou modernes (en agroalimentaire notamment), a peu de sens dans le cas de mélanges de produits. L'information originelle conservée dans les TAGs a révélé deux types de combustibles : de l'huile d'olive mélangées à diverses substances (autres corps gras, résines de conifères, poix) et pour deux lampes, de l'huile de sésame pure (Figure 3). C'est dire le rôle probablement particulier et symbolique du sésame dans la région. La découverte fut aussi importante d'un point de vue historique car, si Strabon dans son traité d'Agriculture Nabatéenne parle du sol pauvre de la région de Pétra ne pouvant recevoir l'olivier, aucun indice archéologique n'avait permis d'identifier les cultures de la région. La chimie apporte ici la première les indices de l'utilisation du sésame par les Nabatéens.

## IV - Conclusion

Pour des échantillons bien conservés, les triglycérides représentent une source très riche d'information chimique. Elle a souvent été peu ou mal exploitée, les études se restreignant souvent à la simple quantification des acides gras totaux après saponification, approche largement répandue dans le domaine de l'agroalimentaire. Or, la structure moléculaire des TAGs permet d'identifier directement les espèces. Leur analyse est cependant difficile de par leur faible volatilité, limitant ainsi l'usage de la chromatographie en phase gazeuse. La cationisation des lipides par l'ion lithium permet de s'affranchir des problèmes posés par les faibles volatilités et polarités des TAGs. Cette méthode d'ionisation douce accroît la sensibilité de détection et donne des spectres simples et bien résolus. Aussi, la fragmentation

## REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés par le projet Jeune Chercheuses, Jeunes Chercheurs de l'Agence Nationale de la Recherche ANR-08-JCJC-0082-01. Les spectromètres de masse utilisés dans ces études ont été financés par la Communauté Européenne (FEDER), la région Nord-Pas de Calais (France), le réseau IBISA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie), le CNRS, l'Université de Lille 1 Sciences et Technologies, et le réseau TGE FTICR.

des analytes lithiés en MS/MS est orientée et les spectres simplifiés, permettant ainsi un traitement de données et la détermination de la distribution relative des acides gras pour chaque TAG isobare. Par comparaison avec des matériaux modernes de référence analysés dans les mêmes conditions, il est désormais possible d'identifier totalement des produits laitiers, des huiles végétales et des graisses animales, même si ceux-ci sont mélangés à

d'autres matériaux organiques et conservés à l'état de traces (quelques ng après purification). Une telle technique, sensible et précise, répond désormais aux attentes des archéologues et des conservateurs de musée, pour lesquels le prélèvement doit être le plus minime possible, afin de garantir l'intégrité esthétique de l'objet, et l'analyse la plus pertinente. Un défi que la spectrométrie de masse permet aujourd'hui de relever.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) CONDAMIN J *et al.*, The application of gas chromatography to the tracing of oil in ancient amphorae, *Archaeometry*, 1976, 18(2), p. 195-201.
- (2) BYRDWELL WC et NEFF WE, Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, 16(4), p. 300-319.
- (3) KIMPE K, JACOBS PA, WAELKENS M, Mass spectrometric methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots, *Journal of Chromatography A*, 2002, 968(1-2), p. 151-160.
- (4) KIMPE K, JACOBS PA, WAELKENS M, Analysis of oil used in late Roman oil lamps with different mass spectrometric techniques revealed the presence of predominantly olive oil together with traces of animal fat, *Journal of Chromatography A*, 2001, 937(1-2), p. 87-95.
- (5) GARNIER N *et al.*, Characterization of archaeological beeswax by electron ionization and electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2002, 74, p. 4868-4877.
- (6) HSU FF, TURK J, Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1999, 10(7), p. 587-599.
- (7) GARNIER N *et al.*, Analysis of archaeological triacylglycerols by high resolution nanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th c. BC – 4th c. AD oil lamps from Olbia (Ukraine), *International Journal of Mass Spectrometry*, 2009, 284(1-3), p. 47-56.
- (8) GARNIER N., Analyse structurale de matériaux organiques conservés dans des céramiques antiques. Apports de la chromatographie et de la spectrométrie de masse, *Thèse de doctorat Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)*, Paris, 408 p.
- (9) GARNIER N., Archéologie biomoléculaire. L'exemple des analyses chimiques de contenu organique de céramiques, in : La céramique antique du Liban, Institut Français du Proche-Orient, IFPO Beyrouth, sept. 2007.
- (10) MIRABAUD S, ROLANDO C, REGERT M, Molecular criteria for discriminating adipose fat and milk from different species by nanoESI MS and MS/MS of their triacylglycerols: Application to Archaeological Remains, *Analytical Chemistry*, 2007, 79(16), p. 6182-6192.
- (11) GARNIER N, TOKARSKI C, ROLANDO C, Quel combustible pour les lampes nabatéennes de Pétra ? in : Lampes antiques du Bilad esh-Sham, de l'Âge du Bronze à la période de transition byzantine-ommeiyade. Actes du colloque IFPO Amman-Petra (6-13 nov. 2005), de Boccard, Paris, 2011, p. 103-123.
- (12) BRUN JP, Le vin et l'huile dans la Méditerranée antique. Viticulture, oléiculture et procédés de fabrication, 2003, Errance, *Collection des Hespérides*, 239.
- (13) GARNIER N, SILVINO T, BERNAL-CASASOLA D, L'identification du contenu des amphores: huile, *conserves de poissons et poissonnage*, SFECAG, 2011, p. 397-416.