

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Hmotnostní spektrometrie v analýze kulturního dědictví

Autor práce:	Ing. Klára Slavíková
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	RNDr. doc. Petr Bednář, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.

Olomouc 2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Ing. Klára Slavíková
Název práce:	Hmotnostní spektrometrie v analýze kulturního dědictví
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2024
Klíčová slova:	umění, hmotnostní spektrometrie, degradační produkty, lipidy, pryskyřice, vosky
Počet stran:	101
Počet příloh:	3
Jazyk:	čeština

Anotace

Tématem předložené disertační práce je využití hmotnostní spektrometrie v analýze hmotného kulturního dědictví. Teoretická část je rozdělena do tří hlavních kapitol, ve kterých je pojednáno o vybraných materiálech využívaných v oblasti kulturního dědictví a památkové péče, roli hmotnostní spektrometrie (MS) v analýze uměleckých i archeologických předmětů a teoretických aspektech metody využívající přímou sondu pracující za atmosférického tlaku (ASAP).

První studie v experimentální části disertační práce byla zaměřena na analýzu pojivových materiálů na bázi lipidů pomocí ASAP-MS. Do této skupiny látek se mimo jiné řadí rostlinné oleje a živočišné tuky, které byly díky svým vlastnostem využívány jako pojiva a laky při tvorbě nástěnných maleb i obrazů na plátně a dalších vhodných podkladech. Chemicky se jedná především o estery vyšších mastných kyselin s glycerolem (acylglyceroly), volné mastné kyseliny a dále látky na bázi steroidů, flavonoidů a dalších polyfenolických látek. Nejvíce

zastoupenými složkami jsou acylglyceroly, a proto byla metoda optimalizována pro tuto cílovou skupinu. Po optimalizaci klíčových parametrů byla metoda testována na možnosti odlišení látek s rozdílnou kompozicí acylglycerolů (souboru různých typů rostlinných olejů). Tyto oleje se podařilo odlišit na základě markerů nalezených pomocí statistické metody analýzy hlavních komponent. Následně byla metoda rozšířena o separaci pomocí iontové mobility a použita pro analýzu souboru modelových temperových barev nanesených na vápenný podklad ve dvou typech pojiva (vaječném žloutku a lněném oleji). Takto připravené vzorky byly analyzovány čerstvé i po umělém staření v přístroji Solarbox. Testovány byly dva přístupy analýzy vzorků, a to analýza extraktů a přímá analýza bez chemické úpravy. Výše zmíněná pojiva byla v obou případech rozlišena na základě přítomnosti degradačního produktu cholesterolu a oxidovaných diacylglycerolů s vyšším stupněm nenasycenosti.

Druhá studie byla zaměřena na analýzu hrnčířských směsí objevených při archeologickém výzkumu v Prostějově v lokalitě Vodní ulice. Tři studované směsi byly vytvořeny na přelomu 18. a 19. století toufarským mistrem Janem Skřivánkem v jeho dílně a jejich nálezy jsou považovány za unikátní. Studie byla rozdělena na analýzu anorganických a organických složek směsi tak, aby bylo možné rekonstruovat „recept“ na jejich přípravu. Pro anorganickou analýzu byly zvoleny techniky rastrovací elektronové mikroskopie s energiově disperzní spektroskopií (SEM-EDX) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Analýza organických reziduí byla provedena technikami hmotnostní spektrometrie s ionizací přímou sondou za atmosférického tlaku se separací pomocí iontové mobility (ASAP-IMS-MS), laserovou desorpční ionizací s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LDI-MS), průtokovou injekční analýzou s hmotnostně spektrometrickou detekcí využívající k ionizaci elektrosprej (FIA/ESI-MS) a Ramanovy spektrometrie. Výsledky odhalily chemické složení předložených vzorků a přispěly k objasnění procesu produkce keramiky na území Moravy na počátku 19. století.

Ve třetí studii byly předmětem zkoumání odlévací formy z doby římské vyrobené ze slitiny mědi. Kombinací rentgenové fluorescenční spektrometrie (XRF), pyrolýzní chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (Py-GC/MS), ASAP-IMS-MS a Ramanovy spektrometrie byl chemicky popsán materiál forem, a navíc bylo možné charakterizovat rezidua nalezená na povrchu předmětů. Výsledky této studie přispěly k pochopení procesu odlévání na našem území na přelomu 2–3. století našeho letopočtu.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Ing. Klára Slavíková
Title	Mass spectrometry in the analysis of cultural heritage
Type of thesis:	Dissertation
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
Consultant:	RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.
The year of submission:	2024
Keywords	art, mass spectrometry, degradation products, resin, wax
Number of pages:	101
Number of appendices:	3
Language:	Czech

Annotation

The dissertation thesis deals with the utilization of mass spectrometry in the analysis of cultural heritage. The theoretical part is divided into three main chapters, which discuss selected materials used in the field of cultural heritage and historic preservation, the role of mass spectrometry (MS) in the study of art and archaeological objects and theoretical aspects of a method using the atmospheric solids analysis probe (ASAP).

The first experimental part of the thesis was focused on the analysis of lipid-based artistic binders by ASAP-MS. This group of materials includes vegetable and animal fats which, thanks to their properties, were used as binders and varnishes in the creation of murals and paintings on plains or other suitable substrates. Chemically oils and fats consist of esters of fatty acids with glycerol (acylglycerols), free fatty acids and substances based on steroids, flavonoids, and other polyphenolic substances. Acylglycerols belong among the most important components and therefore the ASAP-MS method was focused on them. The method was tested for the

possibility of distinguishing substances with different acylglycerol compositions (a set of different types of vegetable oils), after optimization of the key parameters. These oils were distinguished based on the markers found using the statistical method of principal component analysis. Subsequently, ion mobility separation was implemented to the method and used for the analysis of a set of model tempera paints applied to a lime base in two types of binders, namely egg yolk and linseed oil. The samples prepared in this way were analysed fresh and after artificial ageing in the Solarbox device. Samples were analysed either after a solvent extraction or directly with no sample pretreatment. The above-mentioned binders were distinguished in both cases based on the presence of oxidized diglycerides with a higher degree of unsaturation and cholesterol degradation product.

The second study was focused on the analysis of potter's mixtures discovered during archaeological research in Vodní ulice in Prostějov. The three studied mixtures were created at the turn of the 18th and 19th centuries by master Jan Skřivánek in his workshop and their discovery is considered unique. The study was divided into the analysis of the inorganic and organic components of the mixtures to allow reconstruction of the "recipe" for their preparation. Scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy and mass spectrometry with inductively coupled plasma were chosen as techniques for inorganic analysis. Analysis of organic residues was carried out by atmospheric solids analysis probe mass spectrometry with ion mobility separation (ASAP-IMS-MS), laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS), flow injection analysis with electrospray mass spectrometry (FIA/ESI-MS), and Raman spectrometry. The results revealed the chemical composition of the submitted samples and helped to clarify the process of ceramic production in Moravia at the beginning of the 19th century.

In the third study, casting molds from the Roman period made of copper alloy were investigated. A combination of X-ray fluorescence spectrometry, pyrolysis chromatography with mass spectrometric detection (Py-GC/MS), ASAP-IMS-MS, and Raman spectroscopy revealed the material of the molds, moreover, it was also possible to characterize residues from the surface of the objects. The results of this study helped to understand the casting processes at the turn of the 2nd and 3rd centuries AD.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Bednáře, Ph.D. a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že je práce prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Klára Slavíková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc během celého studia.

Velké díky patří RNDr. Lukáši Kučerovi, Ph.D. za mé zapojení do zajímavých studií, pomoc při psaní článků, konzultace a realizaci experimentů metodami Py-GC/MS, Ramanovy spektrometrie a rentgenfluorescenční spektrometrie.

Ráda bych také poděkovala Dott. Zeineb Aturki za možnost absolvování zahraniční stáže na Institute for Biological Systems v Itálii.

Poděkování za spolupráci patří MgA. Davidu Hrabálkovi za přípravu modelových vzorků temper a konzultace týkající se historické přípravy barev, PhDr. Pavlu Fojtíkovi za poskytnutí archeologických nálezů keramických glazur a PhDr. Janu Jílkovi, Ph.D. za poskytnutí archeologických nálezů kadlubů.

Dále bych chtěla poděkovat všem svým přátelům z katedry analytické chemie, zejména pak RNDr. Radce Pechancové, Ph.D., Mgr. Petře Švecové, Ph.D. a M.Sc. Marianně Nytky, které mi během celého studia neustále pomáhaly.

V neposlední řadě patří díky za finanční podporu projektům Arteca: Pokročilé fyzikálně-chemické metody ve výzkumu a ochraně kulturního a uměleckého dědictví (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378) a IGA_PrF_2019_028, IGA_PrF_2020_030, IGA_PrF_2021_021 a IGA_PrF_2022_023.

Poděkování patří i mé rodině a manželovi, kteří mi byli vždy velkou oporou.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část.....	3
2.1	Materiály využívané při tvorbě uměleckých děl	3
2.1.1	Rostlinné oleje a živočišné tuky	4
2.1.2	Jehličnanové pryskyřice.....	9
2.1.3	Vosky	12
2.2	Hmotnostní spektrometrie v analýze kulturního dědictví	14
2.2.1	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí	14
2.2.2	Pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí	15
2.2.3	Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí	16
2.2.4	Přímá hmotnostní spektrometrie	17
2.3	Ionizace za atmosférického tlaku s využití pevné sondy	24
2.3.1	Technické provedení.....	25
2.3.2	Ionizace a ionizační mechanismy	26
2.4	Využití iontově mobilitní separace ve spojení s hmotnostní spektrometrií	29
3	Cíle disertační práce	31
3.1	Analýza lipidických pojiv	31
3.2	Analýza barevných složek.....	31
3.3	Analýza historických odlévacích forem z doby římské	31
4	Experimentální část	31
4.1	Analýza pojiv na bázi lipidů metodou přímé hmotnostní spektrometrie za využití pevné sondy	31
4.1.1	Význam a metodické aspekty studie v kontextu historického výzkumu a památkové péče	31
4.1.2	Chemikálie	33
4.1.3	Modelové vzorky temper	34
4.1.4	Umělé staření vzorků v přístroji Solarbox	35

4.1.5	Metodika	35
4.1.6	Výsledky a diskuse	37
4.1.7	Závěr	53
4.2	Chemická analýza historických keramických glazur	54
4.2.1	Význam a metodické aspekty studie v kontextu historického výzkumu a památkové péče	54
4.2.2	Chemikálie a vzorky	57
4.2.3	Metodika	58
4.2.4	Výsledky a diskuse	60
4.2.5	Závěr	70
4.3	Chemická analýza odlévacích forem z doby římské	71
4.3.1	Význam a metodické aspekty studie v kontextu historického výzkumu a památkové péče	71
4.3.2	Chemikálie a vzorky	72
4.3.3	Metodika	72
4.3.4	Výsledky a diskuse	73
4.3.5	Závěr	78
5	Závěr disertační práce	79
6	Literatura	81
7	Seznam zkratk.....	98
8	Životopis.....	99
9	Přílohy	101

1 Úvod

Chemická a fyzikální analýza historických artefaktů se v průběhu času stala nedílnou součástí archeologického a uměnovědného výzkumu. Přírodovědné a humanitní obory, ač na první pohled vzdálené, mohou spoluprací přinést unikátní poznatky, které pomohou poodhalit tajemství historie. Spolupráce těchto odvětví je ve světě již poměrně běžnou praxí a vzniká řada společných vědeckých týmů zabývajících se synergicky problematikou uměnovědných a fyzikálně-chemických analýz, které pomáhají pochopit umělecké dílo v širších souvislostech. Výsledky výzkumů také poskytují informace pro adekvátní sanační a konzervační zásahy, které mohou pomoci artefakty zachovat i pro budoucí generace.

Chemická a fyzikální analýza historických materiálů s sebou vždy nese několik základních úskalí. V první řadě je třeba si uvědomit, že historické dílo představuje objekt mimořádné kulturní hodnoty, a proto je každý zásah do jeho fyzické struktury nežádoucí. Snahou vědců je tedy aplikace nedestruktivních technik, které nevyžadují žádný odběr vzorku a je tak plně zachována integrita objektu. Pokud je nezbytný odběr, jedná se ve většině případů o mikro-destruktivní zásah. Získané množství vzorku je tedy minimální a tomu je třeba celou analýzu přizpůsobit. Druhým významným faktorem je stav studovaného objektu. Působením environmentálních podmínek dochází k degradaci látek tvořících tento objekt, a tím k částečné až úplné přeměně výchozího materiálu. Z pohledu analytické chemie je tedy nezbytné degradační procesy materiálu popsat a definovat jejich produkty, které jsou následně analyzovány. Neposledním aspektem je vysoká heterogenita vzorku daná využitím různých typů látek při vytváření uměleckého díla.

Hmotnostní spektrometrie zaujímá v analýze kulturního dědictví nezastupitelnou roli. Ačkoliv MS vyžaduje odběr vzorku, díky vysoké citlivosti této techniky je zapotřebí velmi malé množství studovaného materiálu. Zároveň může MS v závislosti na zvolené instrumentaci poskytnout informace o elementárním složení analytů a jejich struktuře. Získané výsledky poté vedou k identifikaci použitých materiálů na základě stanovení charakteristických složek vzorku.

Mnoho konvenčně využívaných metod pro stanovení původu materiálu je založeno na spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií. Stále více populární jsou však i metody přímé hmotnostní spektrometrie, které jsou atraktivní zejména díky nízkým nárokům na úpravu vzorků, i když obvykle disponují nižší selektivitou než spojené techniky. Z přímých technik využívaných v oblasti analýzy umění je možné uvést např. hmotnostní spektrometrii s maticí

asistovanou laserovou desorpcí/ionizací (MALDI-MS), hmotnostní spektrometrii s ionizací pomocí desorpčního elektrospreje (DESI-MS) nebo hmotnostní spektrometrii pro přímou analýzu v reálném čase (DART-MS). Mezi přímé ionizační techniky řadíme i ionizaci s využitím přímé sondy pracující za atmosférického tlaku – ASAP, jejíž princip vychází z chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI), a je tedy vhodná zejména pro středně polární až nepolární analyty. Tato technika umožňuje měřit vzorky přímo nebo s minimálními požadavky na jejich úpravu. Přes všechny své výhody není ASAP-MS v analýze archeologických nálezů a uměleckých děl prozatím příliš využívána.

2 Teoretická část

2.1 Materiály využívané při tvorbě uměleckých děl

V průběhu historie bylo využíváno velké množství přírodních a později i syntetických materiálů, které sloužily pro řadu rozličných účelů, ať již uměleckých nebo technologických viz tabulka 1. V následujících kapitolách budou popsány především materiály, které byly objektem zkoumání předložené disertační práce, a to materiály na bázi rostlinných olejů, živočišných tuků, vosků a rostlinných pryskyřic. Vedle zmíněných látek byly historicky využívány i mnohé další látky spadající do skupiny proteinů, polysacharidů nebo organických a anorganických pigmentů. O těchto materiálech detailně pojednávají ve svých pracích autoři Mills a kol., Giannossa a kol. a Colombini a kol. [1–3].

Oleje, tuky a pryskyřice byly díky své dostupnosti vždy využívány v řadě oblastí lidské činnosti. Lipidy byly zejména významnou složkou potravy, avšak používaly se i jako palivo do lamp, sloužily při impregnaci materiálů proti vodě, byly součástí léčivých masť a kosmetických přípravků a v neposlední řadě byly využívány při tvorbě dekorací a uměleckých děl. V umění se lipidy a pryskyřice využívaly jako pojiva pro pigmenty, laky a různé ochranné nátěry.

Tabulka 1: Hlavní kategorie přírodních materiálů, jejich zdroje a využití v objektech kulturního dědictví [4, 5]

Kategorie	Zdroj	Využití
Proteiny	Živočišné (mléko, vejce, klij), rostlinné (česnek)	Pojiva, adhesiva, mořidla
Acylglyceroly	Živočišné tuky a rostlinné oleje (lněný, ořechový, slunečnicový, ricinový, tungový, palmový)	Pojiva, laky, ingredience do kosmetiky
Polysacharidy	Škrob, arabská guma, celulóza, med	Pojiva a adhesiva
Přírodní pryskyřice	Živočišné (šelak), rostlinné (sandarak, damarová pryskyřice, jantar)	Laky, ochranné nátěry, pojiva
Vosky	Živočišné (včelí a japonský vosk), rostlinné (karnaubský vosk), fosilní (ozokerit, parafin)	Laky, ochranné nátěry, pojiva, ingredience do kosmetiky a léčiv
Přírodní barviva	Živočišné (karmín), rostlinné (indigo, brazilin)	Barvicí látky

2.1.1 Rostlinné oleje a živočišné tuky

Z chemického hlediska jsou oleje a tuky tvořeny z 95 % acylglyceroly, tj. estery glycerolu a vyšších mastných kyselin (VMK). Příklad struktury triacylglycerolu je uveden na obrázku 1A. Dlouhé řetězce VMK jsou nepolární, a proto jsou i molekuly acylglycerolů nepolární a hydrofobní. Vedle těchto hlavních konstituentů obsahují oleje a tuky volné mastné kyseliny, vitamíny, steroly, fytosteroly a různé další skupiny polyfenolů [6].

Acylglyceroly tvoří významnou skupinu látek rostlinného i živočišného původu a jejich analýze se věnuje pozornost z mnoha důvodů. Jednou oblastí zájmu je i analýza archeologických a uměleckých děl. Z pohledu archeologie se jedná nejčastěji o studie zaměřující se na detekci residuů tuků v nádobách denní potřeby jako např. nádoby na potraviny, kosmetické nebo léčebné směsi a lampy na osvětlování. Z hlediska umění se oleje a tuky uplatnily především v oblasti pojivových materiálů a výzkum je zaměřen na studium jejich degradace a stanovení původu. Pojiva byla využívána pro přípravu disperzí pigmentů či kolorantů, které následně sloužily jako barvy ve výtvarném umění. Tyto materiály musely mít vhodné vlastnosti jako je schopnost tvorby filmů, transparentnost a stálost. V Evropě se nejčastěji využívaly tzv. vysychavé (sikativní) oleje, případně oleje semisikativní získávané lisováním semen různých rostlin. Mezi historicky nejvyužívanější typy olejů řadíme olej lněný, ořechový a makový, které byly lisovány za studena a případně podle účelu čištěny nebo zahušťovány. Z živočišných tuků se nejčastěji využíval vaječný žloutek nebo celé vejce pro přípravu vaječných temper [1].

Jednotlivé oleje se v nativním stavu liší svým složením acylglycerolů, tedy profilem VMK [7]. Složení vybraných olejů je uvedeno v tabulce 2. Tyto rozdíly jsou ale významně pozměněny v průběhu stárnutí díla vlivem degradačních reakcí. Sikativní oleje jsou charakterizovány vysokým stupněm nenasycenosti a jsou při vystavení vzdušnému kyslíku typické formováním polymerní struktury, která se navenek projeví vytvořením pevného filmu.

Tabulka 2: Procentuální zastoupení vyšších mastných kyselin v čerstvých rostlinných olejích a ve slepičím vejci [2, 7]

Typ oleje	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	Ostatní VMK
Lněný	6–8	3–6	14–24	14–19	48–60	-
Ořechový	3–7	0.5–3	9–30	57–76	2–16	-
Makový	8–12	2–3	12–17	55–65	3–8	-
Slunečnicový	5–6	4–6	17–51	38–74	-	-
Ricinový	1–2	1–2	3–6	4–7	-	83–89 ¹
Řepkový	2–6	1–3	20–30	17–22	6–10	13–16 ² ; 20–40 ³
Slepičí vejce	25–27	9–12	38–44	13–15	0–1	-

C_{16:0} kyselina palmitová; C_{18:0} kyselina stearová; C_{18:1} kyselina olejová; C_{18:2} kyselina linolová, C_{18:3} kyselina linolenová,

¹ kyselina ricinoolejová,

² kyselina gondoová,

³ kyselina eruková

Polymerní film vzniká v důsledku radikálové oxidace konjugovaného systému dvojných vazeb, který je náchylný k autooxidaci a fotooxidaci. Během radikálových reakcí vznikají reaktivní hydroperoxy [8–10], které se následně rozkládají za vzniku epoxy-, hydroxy-, oxo- kyselin, aldehydů a uhlovodíků [11, 12]. Oxidativním štěpením rovněž vznikají charakteristické α , ω -dikarboxylové kyseliny, jejichž struktury jsou uvedeny na obrázku 1 B, C, D. Vzniklé produkty oxidace podléhají polymerizaci a vytváří výše zmíněný film. Vznik polymerní struktury je urychlen ve světlém, teplém a suchém prostředí.

Vedle oxidačních reakcí dochází během stárnutí rovněž k hydrolytickému štěpení esterových vazeb v molekulách triacylglycerolů na nízemolekulární diacylglyceroly, monoacylglyceroly a volné VMK. Snížení molekulové hmotnosti původních látek hydrolyzou a oxidačním štěpením vede ke zvýšení těkavosti a rozpustnosti degradačních produktů ve vodě (vzdušné vlhkosti), a proto je větší pravděpodobnost jejich detekce v předmětech, které byly skladovány v suchém a chladném prostředí.

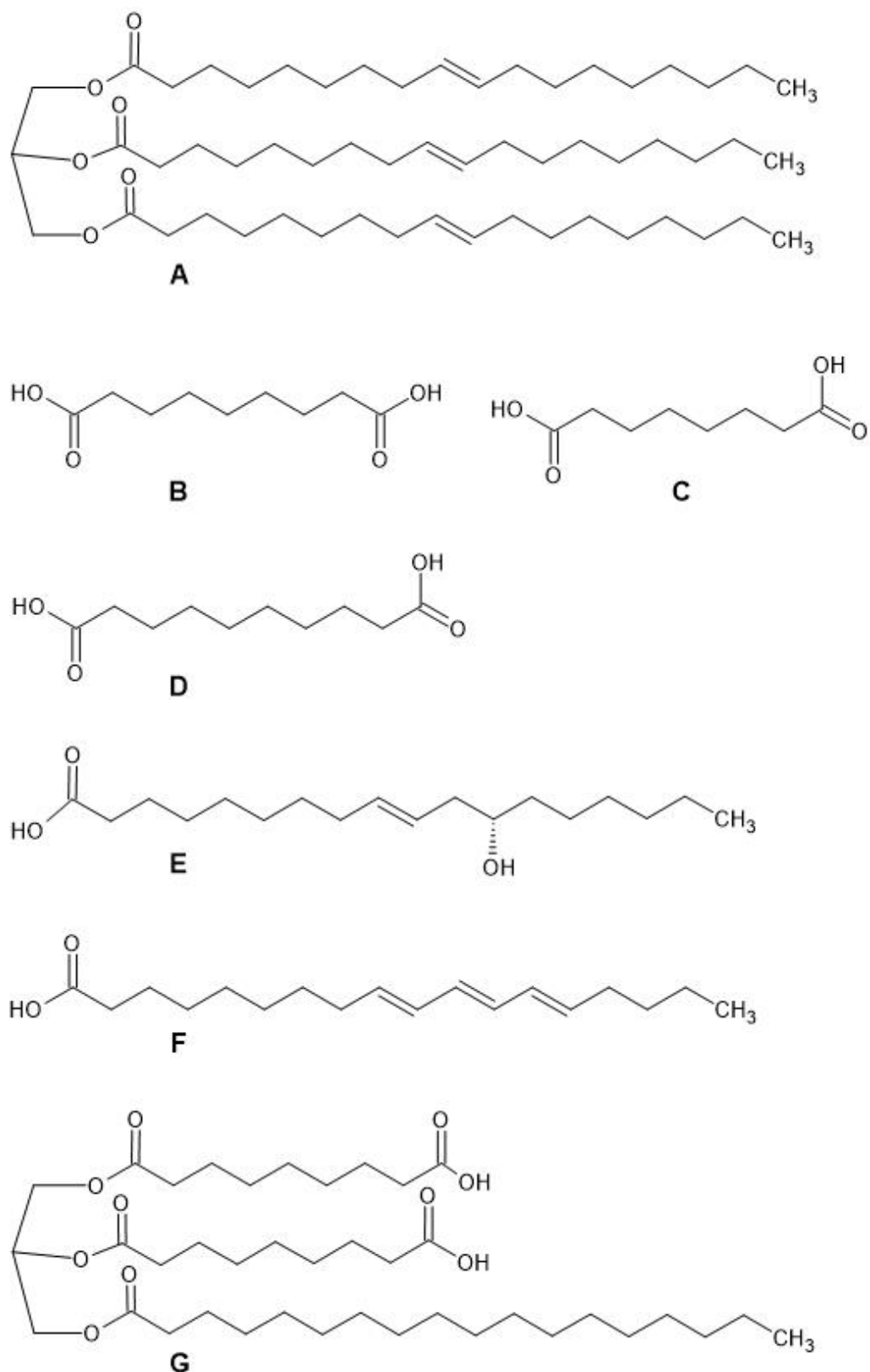
Vedle degradace samotného pojiva dochází v matrici uměleckého díla i k reakcím mezi pojivem a dalšími složkami díla jako jsou například dvojmocné kationy kovů (Ca²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺), které mohou být součástí pigmentů nebo sikativů (látky přidávané pro urychlení schnutí). Ionty kovů mají tendenci reagovat s mastnými kyselinami a dochází tak ke vzniku solí VMK [13, 14].

Tyto procesy se navenek projeví změnou fyzikálních vlastností díla, které popsal B. Slánský v Technice malby II [15]. V důsledku oxidace dochází ke změně indexu lomu

a žloutnutí polymerního filmu. Rovněž klesá krycí mohutnost díla (barva v průběhu stárnutí zprůhledňuje) a vlivem úbytku objemu filmu se snižuje koheze materiálu a tvoří se praskliny nazývané krakely.

Z důvodu zachování kvality uměleckých děl jsou poté nutné sanační a konzervační zásahy, které mají za cíl díla ochránit. Aby byly tyto zásahy adekvátní a správné, je nezbytné získat informace týkající se složení původně využitých a přeměněných materiálů. Analýza těchto látek a interpretace výsledků představuje i v dnešní době pro analytické chemiky stále náročnou výzvu [16]. Identifikace původu oleje ve fragmentu uměleckého díla se realizuje kvalitativně a kvantitativně. Pro kvalitativní analýzu se rutinně využívají především spojené techniky plynové a pyrolýzní plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS a Py-GC/MS) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC/MS). Principem je stanovení degradačních produktů jako jsou α,ω -dikarboxylové kyseliny, hydroxykyseliny a oxokyseliny. Oleje využívané především v moderní malbě obsahují i velmi charakteristické mastné kyseliny, které umožňují jejich přímou identifikaci. Jedná se například o:

- **tungový olej** obsahující kyselinu α -eleostearovou (obrázek 1 F), ricinovou, 11-eikosenovou a 13-dokosanovou
- **ricinový olej** obsahující kyselinu ricinoolejovou [5, 17, 18] (obrázek 1 E) a její degradační produkt kyselinu 9,12-dihydroxyoktadekanovou [19]



Obrázek 1: Příklad struktury triacylglycerolu, degradačních produktů VMK a specifických markerů olejů; trioleylglycerol (A), kyselina azelaová (B), kyselina suberová (C), kyselina sebaková (D), kyselina ricinoolejová (E), kyselina α elaostearová (F), degradační produkt ve slunečnicovém oleji (triacylglycerol se dvěma navázanými kyselinami azelaovými a jednou kyselinou stearovou) (G) [18]

Kvantitativní analýza zahrnuje stanovení mastných kyselin a jejich degradačních produktů po hydrolytickém štěpení acylglycerolů metodou GC/MS. Interpretace dat je založena na stanovení poměrů nasycených VMK, které jsou odolnější vůči degradaci a jejich poměr zůstává v průběhu stárnutí oleje konstantní. Díky tomuto faktu odpovídají poměry nasycených VMK ve stařených olejích poměrům v olejích intaktních. Konkrétně se jedná o poměr mezi kyselinou palmitovou a stearovou [1]. Jejich poměr však může být ovlivněn přítomností jiných látek obsahujících kyselinu palmitovou a stearovou, využitím směsi různých olejů při tvorbě díla, kontaminací díla, zmýdelněním VMK, mikrobiální degradací a v neposlední řadě sublimací těchto kyselin, což použitelnost tohoto jednoduchého poměru omezuje [20, 21].

Nenasycené VMK nejsou v degradovaných dílech obvykle detekovány, jelikož dochází k jejich oxidativnímu štěpení na výše zmíněné α,ω -dikarboxylové kyseliny. Na základě poměru kyseliny azelaové a palmitové (A/P) se odlišují vaječné lipidy od lipidů přítomných ve vysychavých olejích. Je rovněž možné odlišit lipidy z vaječného žloutku od rostlinných olejů na základě relativního zastoupení dikarboxylových kyselin, jelikož veškeré vysychavé oleje obsahují větší množství dikarboxylových kyselin než vaječný žloutek [22, 23]. Charakteristické poměry pro vybrané oleje jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Hodnoty poměrů kyseliny palmitové/stearové (P/S), azelaové/palmitové (A/P), suma kyseliny azelaové, suberové a sebakové v % (D), kvalitativní přítomnost cholesterolu [24]

Vzorek	P/S	A/P	D [%]	Cholesterol
Lněný olej	1.5	1.0	24	Ne
Ořechový olej	2.2	0.9	23	Ne
Makový olej	3.8	1.1	33	Ne
Slepičí vejce	3.0	< 0.05	1.5	Ano

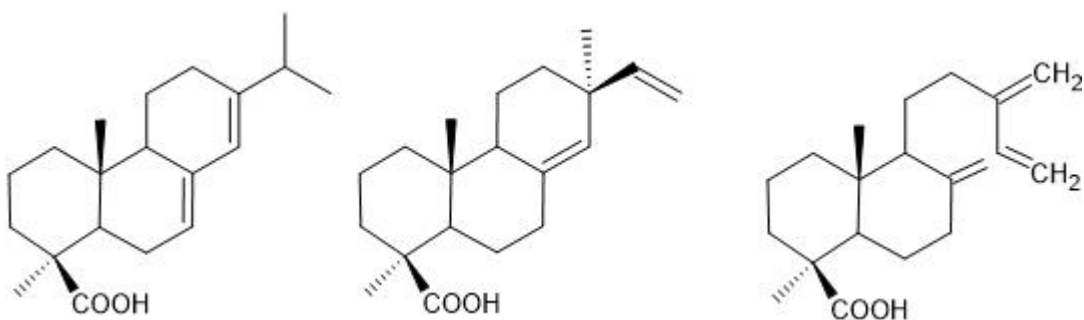
2.1.2 Jehličnanové pryskyřice

Rostlinné pryskyřice jsou produkovány různými druhy rostlin v pryskyřičných kanálcích a hrají důležitou roli v obraně rostlin proti škůdcům. Sekrece pryskyřic má za cíl odpuzovat, usmrtit či inhibovat parazitující organismy nebo naopak přivábit opylovače. Při poškození či napadení rostliny dochází k vylučování směsi těkavých a netěkavých izoprenoidů (látek odvozených od 2-methyl-1,3-butadienu) a fenolických látek [25]. Podle počtu izoprenových jednotek dělíme terpenoidy na monoterpeny (obsahující ve své struktuře 5 uhlíků), seskviterpeny (15 uhlíků) diterpeny (20 uhlíků), tetraterpeny (40 uhlíků) a polyterpeny (vytvářející dlouhé polymerní řetězce). Jednotlivé druhy rostlin produkují pryskyřice o různém chemickém složení, což umožňuje jejich odlišení [26].

V uměleckých dílech byly nejvyužívanější diterpenové pryskyřice jehličnanů z čeledi borovicovitých, cypřišovitých a blahočetovitých, z nichž se získával nebo připravoval sandarak, kalafuna, štrasburský a benátský terpentýn [27].

Při poranění produkují jehličnaté stromy olejové pryskyřice, které obsahují přibližně stejné množství monoterpenů a diterpenových kyselin a menší množství seskviterpenů [26]. Po odpaření těkavých látek dochází k polymeraci netěkavých komponent a tím tuhnou pryskyřice za tvorby ve vodě nerozpustné pevné a lepidivé látky. Díky těmto vlastnostem byly různé typy pryskyřic využívány při výrobě laků, lepidel, pojiv a vodu odpuzujících nátěrů. Pryskyřice byly rovněž ceněny jako surovina pro výrobu vonných směsí a parfémů a v neposlední řadě se pryskyřice využívaly v léčitelství a potravinářství, neboť obsahují antiseptické a antioxidantní složky. Z pohledu analýzy historických předmětů jsou zajímavé především látky netěkavé, které se kompletně neodpařily, nerozložily a zůstaly v intaktní, popřípadě oxidované nebo jinak degradované formě.

Základními složkami diterpenových pryskyřic jsou kyseliny abietového, pimarového a v menší míře kyseliny labdanového typu viz obrázek 2. Jedná se o dvacetí uhlíkaté bi- nebo tricyklické karboxylové kyseliny s rozmanitou izomerní strukturou. Mezi významné zástupce abietanů řadíme kyselinu abietovou, dehydroabietovou, neoabietovou, levomirovou a palustrovou. Z pimaránů jsou významné kyselina pimarová, sandrakopimarová a isopimarová. Z bicyklických kyselin je možné uvést kyselinu agathovou nebo komunovou [25, 26].

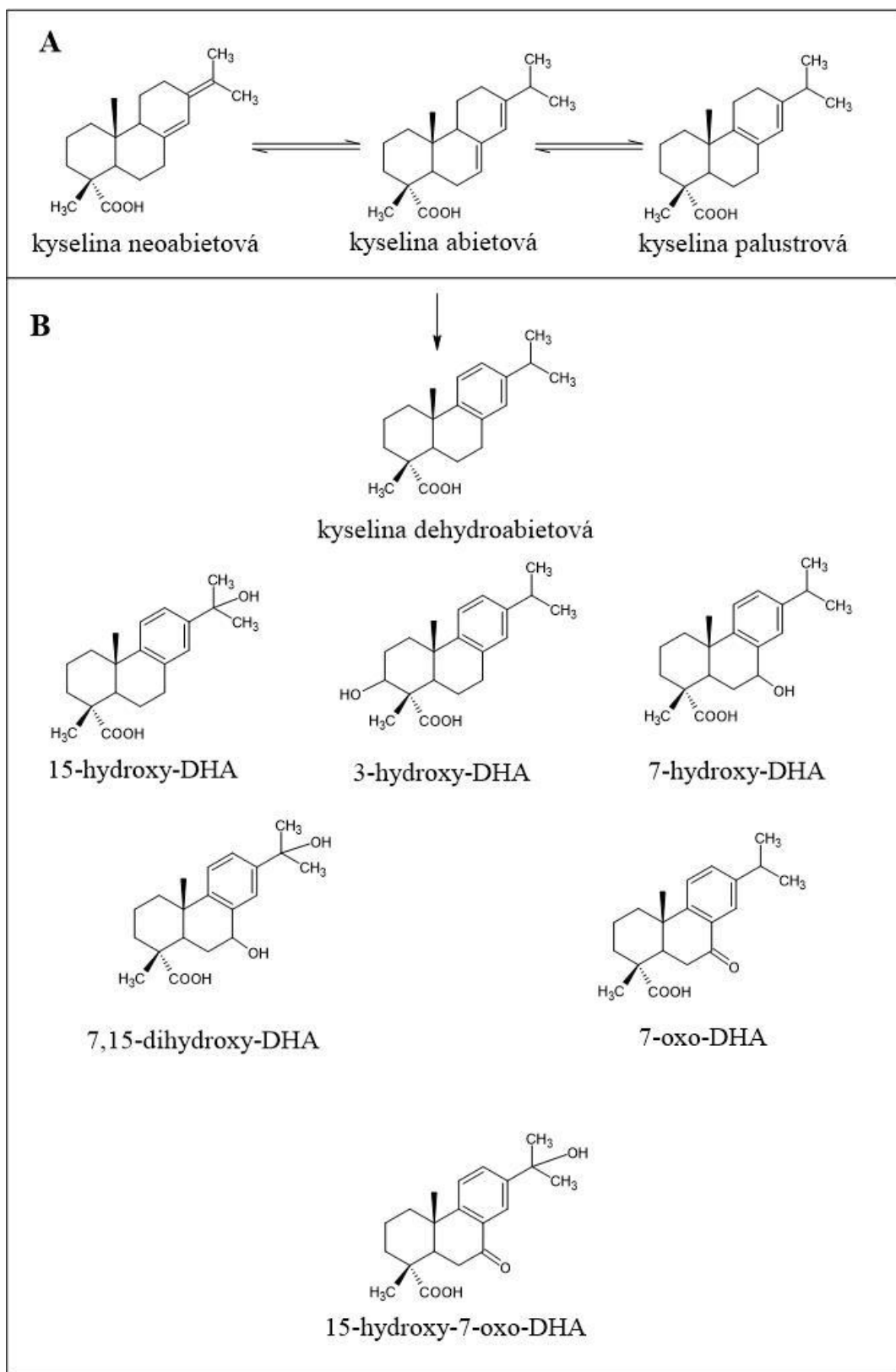


Obrázek 2: Zleva kyselina abietová (*abietany*), pimarová (*pimarany*), komunová (*labdany*)

Vlivem stárnutí pryskyřic dojde v první řadě k odpaření těkavého podílu (mono- a seskvi- terpenů). Následně podléhají diterpenové kyseliny degradačním procesům jako jsou fotooxidační a autooxidační reakce, polymerizace, izomerizace a štěpící reakce. Ke tvorbě polymerní struktury mají tendence především kyseliny labdanového typu s dvojnou vazbou v postranním řetězci. Jelikož obsahují pryskyřice řádu borovicotvarých nízké množství kyselin labdanového typu, nedochází u nich k významné polymerizaci. K izomeračním reakcím má tendence např. kyselina levopimarová a neoabietová, které již při mírném zahřátí a vystavení světlu snadno izomerují na kyselinu abietovou [1].

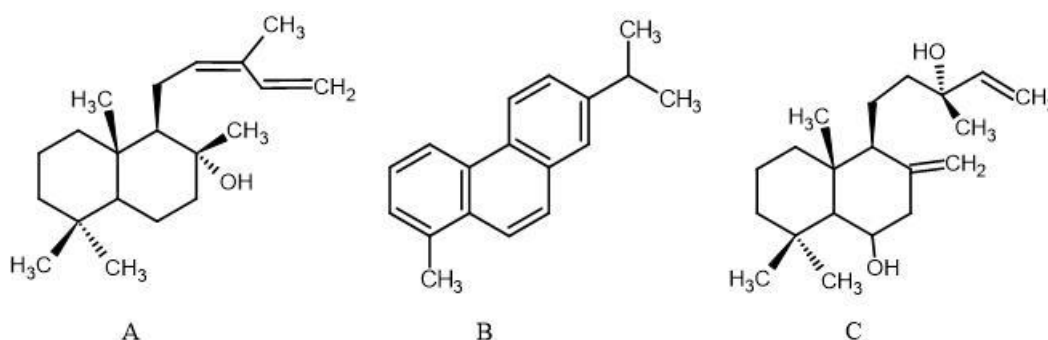
Jedny z nejvýznamnějších degradačních procesů jsou radikálová autooxidace a fotooxidace. Průběhem těchto dějů a detekcí degradačních produktů se zabývají např. autoři Scalarone a kol. a Pastorova a kol. [28, 29], ale přesný mechanismus není zcela objasněn. Abietany obsahují ve své struktuře konjugované dvojně vazby a jsou tak náchylnější k oxidaci a izomerizaci než pimarany, u kterých jsou dvojně vazby izolované. Výsledkem oxidace je inkorporace kyslíku do molekuly a vznik hydroxylových a karbonylových funkčních skupin. Procesem oxidace tak vznikají polárnější degradační produkty. Pokud byly pryskyřice před využitím tepelně zpracovány, dochází navíc k celé řadě degradačních procesů např. dekarboxylaci, dehydrogenaci nebo demethylaci. Jako stabilní produkt těchto reakcí je uváděn reten (viz obrázek 4 B) [30].

Významným degradačním produktem kyseliny abietové je kyselina dehydroabietová (DHA), která vzniká oxidativní dehydrogenací za tvorby stabilnějšího aromatického kruhu. Při vystavení DHA vzdušnému kyslíku a světlu může docházet k oxidaci na reaktivních pozicích 7 a 15, případně 3 za vzniku 7-hydroxy DHA, 7-oxo DHA, 15-hydroxy-7-oxo DHA, 15-hydroxy-DHA a dihydroxy-DHA viz obrázek 3 B [30]. Tyto degradační produkty jsou považovány za markery pryskyřic z řádu borovicotvarých [28, 29, 31].



Obrázek 3: Procesy probíhající při degradaci kyseliny abietové, izomerační reakce (A), oxidační reakce (B) [32, 33]

Dále je možné borovicovou pryskyřici odlišit od ostatních pryskyřic z řádu borovicotvarých na základě poměrů jednotlivých diterpenových kyselin. Například poměr kyseliny pimarové a sandrakopimarové < 2 je charakteristický pro borovicovou pryskyřici a je tak možné ji odlišit od pryskyřice smrkové, jedlové a modřínové [32]. Aplikování takovýchto poměrů pro rozlišení pryskyřic může být problematické s ohledem na degradační procesy, které mohou původní poměry v intaktních pryskyřicích změnit. Mimo využívání zmíněných poměrů bývá modřínová pryskyřice identifikována na základě detekce larixyl acetátu a laryxolu (viz obrázek 4C) [32] a jedlová pryskyřice detekcí cis-abienolu (viz obrázek 4 A) [30].

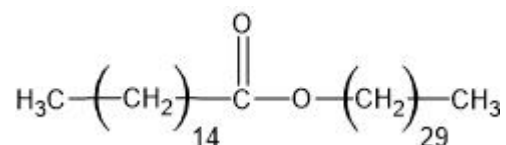


Obrázek 4: Degradační produkty pryskyřic: cis abienol (A), reten (B), laryxol (C) [30]

2.1.3 Vosky

Vosky představují složitou směs nepolárních organických látek, jež vytvářejí za normální teploty tuhou hydrofobní hmotu, která při zahřívání měkne a stává se plastickou. Mohou být živočišného, rostlinného i fosilního původu. Chemicky se jedná o komplexní směsi volných mastných kyselin, esterů VMK a vyšších mastných alkoholů, n-alkanů a n-alkoholů [34]. Z historického hlediska byl nejběžněji využívaným voskem včelí vosk. Z včelího vosku se vyráběly svíce, sošky, směsi pro impregnaci dřeva a keramiky, byl součástí směsi pro balzamování mumií a rovněž byl využíván jako médium a pojivo pro techniku zvanou enkaustika (malování horkým voskem) [35, 36].

Včelí vosk má poměrně konstantní složení a obsahuje volné mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků, liché n-alkany a charakteristické sudé estery kyseliny palmitové od C₄₀–C₅₂ (příklad struktury esteru viz obrázek 5). Dále jsou v menším množství zastoupeny diestery, triestery, polyestery, hydroxy-monoestery a hydroxy-polyestery [36, 37].



Obrázek 5: Příklad struktury myricylpalmitátu (esteru včelího vosku)

Estery obsažené ve voscích jsou odolnější vůči degradaci v porovnání s nenasycenými tuky, avšak i v jejich případě dochází k hydrolyze esterů a uvolňování volných VMK a alkoholů. V důsledku zvýšené teploty může docházet k sublimaci n-alkanů a VMK [2, 38]. Různé studie poukazují na fakt, že komponenty včelího vosku mohou zůstat zachovány po tisíciletí, zejména pokud jsou inkorporovány v neprodyšných částech díla (např. pórech keramiky) [39].

Identifikace vosků v předmětech kulturního dědictví je založena na přítomnosti charakteristických homologických řad alkanů, alkenů, alkoholů a esterů (viz tabulka 4) a následným porovnáním s referenčními materiály [31, 40, 41].

Tabulka 4: Využívané typy vosků a jejich složení [2, 3]

Původ		Název vosku	Složení
Živočišné vosky	Vorvaň obrovský	Vorvaňovina	Sudé estery C ₂₆ –C ₃₆ (estery kyseliny palmitové a myristové), VMK a alkoholy
	Ovce domácí	Lanolin	Lanosterol, cholesterol, estery, terpeny
	Ceroplastes ceriferus	Čínský vosk	Triacylglyceroly, vysoké zastoupení kyseliny palmitové, estery s významným zastoupením hexakosanové kyseliny a hexakosanolu
Rostlinné vosky	Kopernice voskonosá	Karnaubský vosk	Liché n-alkoholy C ₂₈ –C ₃₄ , estery kyseliny p-hydroxyskořicové a p-methoxyskořicové
	Pryšec voskodárný	Kandelilový vosk	Liché n-alkany C ₂₉ –C ₃₁ , estery, volné kyseliny a alkoholy, terpeny
Fosilní vosky	-	Parafin	Série sudých a lichých n-alkanů s jednoduchou distribucí
	-	Ozokerit	Série sudých a lichých n-alkanů

2.2 Hmotnostní spektrometrie v analýze kulturního dědictví

Chemické analýzy materiálů na bázi lipidů a pryskyřic jsou konvenčně prováděny pomocí separačních technik jako jsou plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Hmotnostní spektrometrie jako detekční technika vyhovuje všem požadavkům kladeným na detektor v analýze heterogenních mikrovzorků [42]. Mezi základní výhody MS patří:

- Vysoká citlivost
- Vysoká specifita a selektivita
- Kvantitativní odezva
- Při využití vysokorozlišujících analyzátorů možnost určení molekulového vzorce
- Stanovení struktury neznámé látky na základě MS/MS, MSⁿ experimentů

2.2.1 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

GC/MS a Py-GC/MS představují konvenčně nejvyužívanější techniky k identifikaci materiálů v oblasti kulturního dědictví [40, 43–48]. Rutinně jsou využívány na analýzu proteinových, polysacharidových a lipidických pojiv, vosků i pryskyřic. Aplikacím GC/MS v analýze uměleckých děl a kulturního dědictví se věnují v přehledových článcích například autoři Colombini a kol. a Bonaduce a kol. [23, 49].

Materiály využívané pro uměleckou tvorbu jsou často přítomné ve formě makromolekul nebo během jejich stárnutí dochází k síťování a oligomeraci v důsledku vlivu environmentálních podmínek. Před vlastní GC/MS analýzou je tedy nezbytné sledované analyty upravit na nízkomolekulární těkavé látky. Standardní příprava vzorku zahrnuje následující kroky:

- Převedení makromolekul na nízkomolekulární látky
- Extrakci analytů z hydrolyzátu
- Odstranění interferencí
- Snížení polarity a zvýšení volatility cílových analytů

Pořadí extrakčního kroku závisí na bližších analytických cílech. Je možné extrahovat látky přímo z matrice, nebo se extrahují rozložené z hydrolyzátu. Štěpení makromolekul na nízkomolekulární látky se běžně realizuje kyselou nebo zásaditou hydrolyzou. Nejběžněji se využívá alkalická hydrolyza v prostředí alkoholu, rovněž označovaná jako saponifikace. Vedle zásadité hydrolyzy se využívá i kyselá hydrolyza [50], která však poskytuje nízkou návratnost mastných kyselin [24]. Hydrolyza představuje zdlouhavý proces v řádech hodin a některé typy látek jsou do značné míry odolné rozkladu, jako například např. estery včelího vosku [51]. Z tohoto důvodu může být rozklad podpořen např. mikrovlnným ohřevem [51, 52].

Z hydrolyzátu se následně cílové analyty extrahují vhodným rozpouštědlem. Využívána jsou různá rozpouštědla a jejich směsi v závislosti na polaritě analytů. Pro analýzu pryskyřic, vosků a tuků se osvědčila rozpouštědla jako jsou diethylether, methanol, isooktan nebo směs chloroformu s methanolem. Extrahované látky obsahující polární funkční skupiny je nutné derivatizovat za účelem snížení polaritě a zvýšení volatility. Z běžně využívaných derivatizačních reakcí je možné využít např. silylaci (činitel BSTFA [35, 41], MTBSTFA [24, 53]) nebo transmethylaci, která převede polární látky na odpovídající estery nebo ethery [31, 40]. Vedle extrakce, hydrolýzy a derivatizace se často přistupuje i k další purifikaci za účelem odstranění kovových kationtů nebo sulfátů, které pocházejí z matrice vzorku a mohou negativně interferovat. Využívány jsou např. miniaturizované špičky se sorbenty typu C18 a C4 (extrakce tuhou fází) [54, 55].

Nevýhodou GC/MS analýz je jejich časová náročnost a komplikovaná příprava vzorků. Ve většině studií jsou metody vyvinuty pouze pro jednu cílovou skupinu analytů. Simultánnímu stanovení několika skupin poжив vedle sebe se doposud věnovalo méně autorů [24, 52, 55–57].

2.2.2 Pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Alternativou k chemickému štěpení makromolekul před GC/MS analýzou je termální štěpení za nepřístupu vzduchu nazývané pyrolýza. Vývoji Py-GC/MS metod pro analýzy kulturního dědictví se věnují ve svém přehledovém článku Degano a kol. [58]. Tato technika se osvědčila pro celou řadu běžně využívaných typů poжив jako jsou pryskyřice, tuky, oleje [59] i vosky, jejichž estery jsou značně odolné chemické hydrolýze, a představují pro konvenční GC/MS problém [51].

Využitím pyrolýzy před GC separací se podstatně sníží nároky na přípravu vzorku, a tím je sníženo riziko ztráty analytů a kontaminace v důsledku přípravy vzorku. Na rozdíl od hydrolýzního štěpení dochází v pyrolýzní jednotce k termálnímu štěpení makromolekul za vzniku termálních fragmentů. Tyto fragmenty mají nízkou volatilitu v důsledku přítomnosti polárních skupin (COOH, OH, NH₂) a mohou způsobovat kontaminaci systému a silný paměťový efekt. Běžně se tedy přistupuje k in situ derivatizaci fragmentů za účelem snížení polaritě. Nejběžnějšími technikami derivatizace je termálně asistovaná methylace a termálně asistovaná silylace [49].

Získaná spektra z Py-GC/MS (pyrogramy) mohou sloužit jako tzv. otisky prstů (z anglického finger prints) jednotlivých materiálů. Jejich interpretace je založena na posouzení molekulárního profilu termálních fragmentů vzniklých z prekurzorů.

V případě Py-GC/MS metod je nezbytná důsledná optimalizace pyrolýzních podmínek, zejména teploty pyrolyzátoru, koncentrace derivatizačního činidla apod. V závislosti na experimentálních podmínkách a množství vzorku mohou vznikat rozdílné profily termálních fragmentů, což snižuje reprodukovatelnost metody a ztěžuje evaluaci dat. Během pyrolýzy může také docházet k řadě nežádoucích reakcí, vedoucích ke vzniku různých izomerů a fragmentů, které komplikují získaná spektra a je velmi obtížné přiřadit je k původním molekulám.

2.2.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Spojení HPLC/MS představuje další běžně využívanou techniku v analýzách kulturního dědictví. V současnosti je nejběžnější aplikací HPLC/MS techniky analýza přírodních i syntetických barviv v archeologických i uměleckých vzorcích. Přehledu aplikací a HPLC/MS metod v analýze přírodních barviv se věnují autoři Pauk a kol. [60], Degano a kol. [61] a Rosenberg [62]. Vedle analýzy barviv se HPLC/MS úspěšně využívá i v analýze uměleckých a historických objektů pro identifikaci lipidických i proteinových pojiv a pryskyřičných laků. Velký potenciál představuje i miniaturizovaná verze kapalinové chromatografie, která našla uplatnění v proteomice a v současnosti jsou již publikovány studie zaměřené na využití nanokapalinové chromatografie v analýze proteinových pojiv [63, 64].

Využití HPLC/MS pro analýzu lipidů ve vzorcích kulturního dědictví se v přehledových článcích věnují autoři La Nasa a kol. [65] a Degano [66]. Typická příprava vzorků pro HPLC/MS analýzu zahrnuje extrakci analytů z matrice vhodným rozpouštědlem, purifikaci extraktu a prekoncentraci. V závislosti na stupni polymerizace lipidického materiálu je nutné využít odpovídající extrakční techniku, tak aby byl dostatečně extrahován podíl acylglycerolů z matrice vzorku.

Identifikace pojiv na bázi lipidů se HPLC/MS realizuje profilováním VMK a intaktních a degradovaných acylglycerolů ve vzorku. Variabilita izomerních forem jednotlivých acylglycerolů je mnohem vyšší než variabilita VMK, a proto může HPLC/MS poskytnout markery/informace, které jsou v porovnání s daty z GC/MS více specifické.

Využití hmotnostní spektrometrie jako detektoru je při analýze acylglycerolů klíčové, neboť samotná kapalinová chromatografie neumožňuje identifikaci polohových izomerů triacylglycerolů. Polohové izomery je možné, v závislosti na uspořádání experimentu, identifikovat na základě jejich APCI-MS/MS nebo ESI-MS/MS spekter. Například Autoři Hsu a Turk ve svém článku popisují fragmentaci lithiovaných triacylglycerolů v ESI-MS/MS

spektrech při použití analyzátoru typu trojitého kvadrupólu. Tento přístup jim umožnil určit nejen pozici acylového řetězce v molekule glycerolu ale i pozici dvojně vazby v řetězci [67].

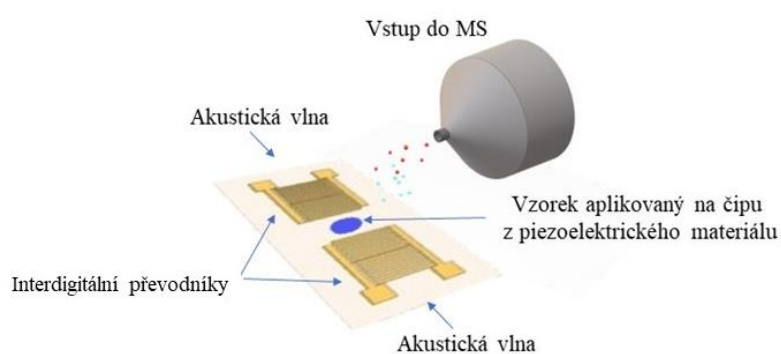
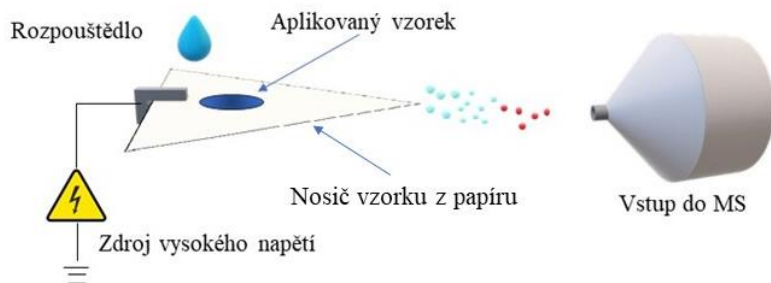
Profilování acylglycerolů se tedy jeví jako velmi užitečný nástroj pro studium degradace olejů a rozlišení olejů ve směsích, kde konvenční přístupy založené na GC/MS selhávají [5, 17, 18].

2.2.4 Přímá hmotnostní spektrometrie

Přímá hmotnostní spektrometrie představuje v analýze historických vzorků perspektivní alternativu ke spojeným technikám. Přehled aplikací přímých technik v analýze vzorků kulturního dědictví je uveden v tabulce 5 a tabulce 6. Tyto techniky je možné rozdělit na dvě základní skupiny. První skupinou jsou techniky, při nichž ionizace probíhá za vakua. Druhou a stále častěji využívanou skupinou jsou techniky pracující za ambientních (atmosférických) podmínek. Nejběžněji využívány jsou MALDI-MS a LDI-MS, které mohou pracovat za vakua i za ambientních podmínek.

V současnosti existuje okolo 80 typů ambientních technik, které umožňují analyzovat širokou škálu analytů z různých typů matric. Aspektům ambientních ionizačních technik se věnuje celá řada přehledových článků [68–73]. Z této široké škály ionizačních technik byly v analýze kulturního dědictví využity zejména desorpce elektrosprejem (DESI), ionizace pomocí akustické vlny (SAWN), papírová sprejová ionizace (PS) a přímá analýza v reálném čase (DART). Schémata uvedených ionizačních technik jsou uvedena na obrázku 6. Některé ambientní techniky mají potenciál i v miniaturizovaných a přenosných systémech [74] a v budoucnu by tak mohly být využívány v in situ analýzách kulturního dědictví.

Zásadními výhodami přímých technik jsou minimální nároky na úpravu a množství vzorku. Eliminací extrakčního kroku je sníženo riziko ztráty a kontaminace analytů, ke kterým může docházet při klasickém zpracování vzorku. V porovnání s konvenčními GC/MS a HPLC/MS se jedná o velmi rychlé techniky s vysokou propustností vzorků a s dostatečnou citlivostí. Absence separačního kroku však na druhou stranu snižuje selektivitu a spektra heterogenních vzorků jsou velmi náročná na interpretaci.

A**B****C****D**

Obrázek 6: Schémata ambientních ionizačních technik: DESI-MS (A), SAWN-MS (B), PS-MS (C), DART-MS (D) [72, 75]

Tabulka 5: Příklady aplikací ambientních ionizačních technik v analýze organických látek ve vzorcích kulturního dědictví

Ionizační technika	Zkratka	Desorpce	Ionizace	Matrice	Analyty	Ref.
Přímá analýza v reálném čase	DART	Termální desorpce	Korónový výboj	Roztok a modelově nabarvené textilie	Organická barviva (quercetin, alizarin, indigotin)	[76]
				Modelově nabarvené textilie	Indoxyl/indirubin, Indigotin, isatin, indoxyl, indican	[77]
				Studium degradace eosinu v olejovém médiu	-	[78]
				Krevní inkrusty na povrchu africké Komo masky	Permetylovaný Hem	[79]
				Uhelné nástěnné malby	Mastné kyseliny, diterpenové kyseliny, estery včelího vosky	[80]
				Rostlinný materiál a přírodní textilní vlákna	Organická barviva kurkumy a santalového dřeva	[81]
				Analýza materiálů určených pro konzervaci pergamenů a modelové vzorky pergamenů	Glycerol, složky ricinového oleje	[82]
				Akrylové barvy	Koloranty (Orange 308, Red 314, červená karmínová 319, světlá žlutá 327, pastelová žlutá 329)	[83]
				Analýza textilních archeologických a modelových vláken	Antrachinony	[84]

Tabulka 5: Příklady aplikací ambientních ionizačních technik v analýze organických látek ve vzorcích kulturního dědictví (pokračování)

Ionizační technika	Zkratka	Desorpce	Ionizace	Matrice	Analyty	Ref.
Desorpční elektrosprej	DESI	Desorpce sprejem	Elektrosprej	Olejomalba 17. století	Mastné kyseliny, dikarboxylové kyseliny	[85]
				Referenční textilní vlákna	Purpurin, alizarin, kurkumin	[86]
				Nástěnná malba	Dikarboxylové kyseliny	[87]
Analýza pevnou sondou za atmosférického tlaku	ASAP	Termální desorpce	Korónový výboj	Historická textilní vlákna	Indigotin	[88]
				Vzorek půdy z keramické nádoby	Miliacin	[89]
Papírová sprejová ionizace	PS	Desorpce sprejem	Vysoké napětí	Modelově nabarvené textilie	Keamferol, kaempferitin, Isatin A, afzelin	[77]
				Přírodní barviva	Antrachinony, polyfenoly	[84]
				Vzorky historických textilií	Idigotin a jeho izomery, kyselina karmínová,	[90]
Zmlžování pomocí povrchové akustické vlny	SAWN	Zmlžení pomocí akustické vlny	Coulombické exploze	Textilní vzorky	Syntetická barviva	[91]
				Vzorky moderní olejomalby	Mastné kyseliny, dikarboxylové kyseliny, acylglyceroly	[92]
Elektrosprej	ESI	Zmlžení pomocí sprejovací kapiláry	Coulombické exploze	Včelí vosk	Estery včelího vosku	[93]
				Nízkomolekulární malířské pryskyřice (laky MS2A, Laropal A81)	Oligomery ketonové a aldehydové pryskyřice	[94]

Tabulka 5: Příklady aplikací ambientních ionizačních technik v analýze organických látek ve vzorcích kulturního dědictví (pokračování)

Ionizační technika	Zkratka	Desorpce	Ionizace	Matrice	Analyty	Ref.
Nano elektrosprej	Nano ESI	Zmlžení pomocí sprejovací kapiláry	Coulombické exploze	Rezidua tuků/olejů z olejových lamp	Acylglyceroly	[95]
Nízkoteplotní plazma	LTP	Termální desorpce	Dielektrický bariérový výboj	2D zobrazování inkoustových polštářků využívaných v kaligrafii	m/z 161, 83, 71 (neidentifikované látky)	[96]

6: Příklady aplikací vakuových ionizačních technik v analýze organických látek ve vzorcích kulturního dědictví

Ionizační technika	Zkratka	Desorpce	Ionizace	Matrice	Analyty	Ref.
Maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace	MALDI	Desorpce/ionizace laserem za účasti matrice	-	Damarová pryskyřice	Oxidované triterpeny	[97]
				Damarová pryskyřice, mastix, kalafuna	Di- a triterpeny	[98]
				Modelové vzorky (pigmenty a různé typy pojiv), reálný vzorek (malba na dřevěném podkladu, 15. stol)	Lipidy, proteiny	[99]
				Modelové vzorky olejových a vaječných barev, referenční materiály (různé typy olejových pojiv)	Mastné kyseliny, acylglyceroly	[100]
				Akrylové barvy a malby	Surfaktanty na bázi poly(ethylen)glykolů	[101]
				Modelové vzorky vaječných temper	Degradační produkty triacylglycerolů a diacylfosfatidilcholinu	[102]
				Studium tradičních metod zpracování vysychavých olejů- lněný olej	Intaktní a oxidované acylglyceroly, oligomery vytvořené síťováním	[103]
				Vzorky maleb	Degradační produkty a intaktní fosfolipidy, acylglyceroly	[104]
				Modelové a reálné vzorky maleb	Proteiny a lipidy	[105]
				Modelové a reálné vzorky maleb	Proteiny	[106]
Modelové a reálné vzorky maleb	Proteiny	[107]				

Tabulka 6: Příklady aplikací vakuových ionizačních technik v analýze organických látek ve vzorcích kulturního dědictví (pokračování)

Ionizační technika	Zkratka	Desorpce	Ionizace	Matrice	Analyty	Ref.
Grafitem asistovaná laserová desorpce/ionizace	GALDI	Desorpce/ionizace laserem za účasti koloidního grafitu	-	Damarová pryskyřice, mastix	Degradační produkty triterpenů	[108]
				Standardy triterpenů	Triterpeny	[109]
Přímá sonda pracující za vakua	DIP	Termální desorpce	Elektronová ionizace, chemická ionizace	Diterpenové a triterpenové pryskyřice (damar, mastix, kalafuna, manilský kopál a sandarak)	Di a triterpeny, polymerní struktury odvozené od k. komunové a kadinenu	[28]
				Vzorky maleb	Diterpenové kyseliny	[32]

2.3 Ionizace za atmosférického tlaku s využití pevné sondy

Studie uvádějící techniku ionizace využívající přímou sondu za atmosférického tlaku byla poprvé publikována v roce 2005 vědeckou skupinou prof. McEwena [110]. V publikaci autoři demonstrovali možnosti využití ASAP-MS pro rychlou kvalitativní analýzu kapalných i pevných vzorků bez nároků na úpravu vzorku. Od uvedení na trh našla tato ionizační technika široké uplatnění v mnoha analytických odvětvích jako je petroleomika [111–114], analýza polymerů [115–117], uhlí [118–120], biologických vzorků [121–123], forenzních vzorků [124, 125] a mnoha dalších. Z přehledových článků věnujícím se teorii a využití ASAP sondy je možné uvést články zaměřené na analýzu potravin [126], polymery [127] a bioanalytické aplikace [128]. Přestože ASAP-MS představuje techniku vhodnou především k rychlému kvalitativnímu screeningu, byla již v několika publikacích využita i k semikvantitativním analýzám [123, 124, 129].

Principiálně vychází ASAP z přímé sondy pracující za vakua, která byla v analýze kulturního dědictví široce využívána [130–132]. V literatuře jsou popsány dva typy přímých sond pracujících za vakua, lišící se především způsobem exponování vzorku na sondu a způsobem termální desorpce. V obou případech jsou analyty převedené do plynného stavu a následně ionizovány elektronovou ionizací nebo chemickou ionizací. Na rozdíl od sond pracujících za vakua je vzorek v případě ASAP sondy viz obrázek 7 vhodně deponován na povrch nebo do skleněné kapiláry, odpařen proudem dusíku a ionizován mechanismem založeným na APCI.



Obrázek 7: Sonda ASAP, pevně instalovaná část (A), odnímatelná část (B)

V ASAP-MS spektrech se běžně vyskytují typické laboratorní kontaminanty jako jsou například ftaláty a další. Rovněž je poměrně vysoké riziko křížové kontaminace (z anglického carryover effect). Je tedy nutné pracovat, pokud je to možné, s minimálním množstvím vzorku,

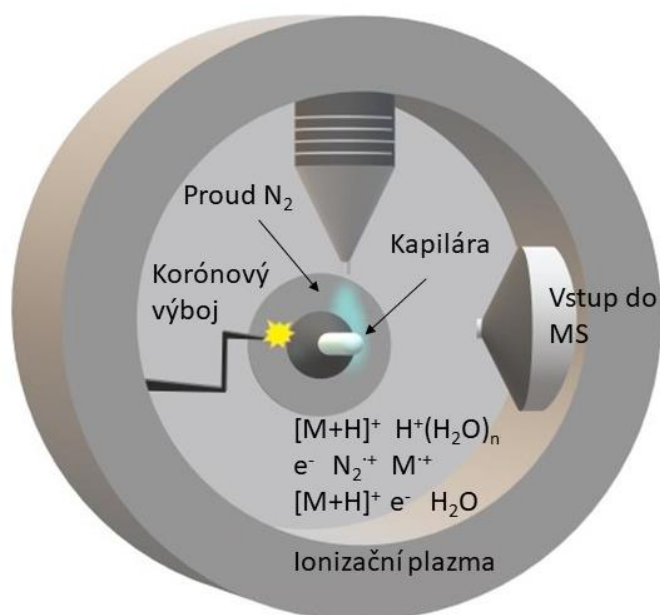
věnovat velkou pečlivost čistotě iontového zdroje a mezi jednotlivými měřeními kontrolovat čistotu měření slepých vzorků za účelem eliminace falešně pozitivních výsledků. Pro snížení rizika kontaminace je vhodné pro každé měření využívat novou kapiláru, nebo důkladně vyčištěnou kapiláru. Vzhledem k tomu, že jsou vzorky analyzovány bez separačního kroku, dochází v iontovém zdroji rovněž ke konkurenčním a bočním reakcím např. s reaktivními formami kyslíku a může tak docházet k nežádoucí oxidaci analytů.

2.3.1 Technické provedení

Technicky nevyžaduje instalace atmosférické sondy příliš velké změny v geometrii iontových zdrojů určených pro ESI nebo APCI. Sonda je instalována namísto ESI/APCI sondy nebo má samostatný vstup. Na rozdíl od ESI je do iontového zdroje instalována jehla generující korónový výboj (schéma viz obrázek 8). Ionizace pomocí přímé sondy je spojována se všemi běžně dostupnými typy analyzátorů jako jsou trojitý kvadrupól, hybridní kombinace kvadrupólu a detektoru doby letu (QqTOF), sférická, lineární i orbitální iontová past a iontová cyklotronová rezonance. Při využití přímé sondy ve spojení s vysoko rozlišujícími analyzátory umožňují některé přístroje přivádět přídatnou fluidickou referenční látku, na jejíž m/z hodnotu je poté možné korigovat m/z hodnoty signálů v MS spektrech.

Manipulace se sondou je snadná a zahrnuje pouze nanesení, nebo přichycení kapalných či pevných vzorků na skleněnou kapiláru, která se do sondy vkládá. Vhodné podmínky měření jsou dosaženy optimalizací tří klíčových parametrů. Jedná se o napětí vkládané mezi výbojovou jehlu a vzorkovací kužel (sampling cone), teplotu desolvačního plynu a rychlost jeho proudění [2]. Nejčastěji se jako plyn pro termální desorpci volí dusík, který slouží k odpaření analytů a zároveň se z něj korónovým výbojem tvoří reakční ionty. Pozvolným zvyšováním teploty v průběhu analýzy může být docíleno částečné separace na základě bodu varu analytů, obdobně jako je tomu v procesu frakční destilace [30]. Příklad optimalizace zmíněných parametrů je uveden v experimentální části předložené práce. Dalším parametrem, který může ovlivnit ionizaci je pozice vzorku vůči vstupu do MS.

Ionizace přímou sondou je považována za velmi rychlou a nenáročnou techniku, avšak není doposud automatizovaná a po každém měření je nutná ruční výměna vzorku. Automatizace by v budoucnu mohla být realizována obdobným způsobem, jako navrhuje Krieger a kol. pro automatizaci vakuové přímé sondy (tepelně programovatelná sonda „push rod“ v kombinaci s autosamplerem „Combi Pal“) [133].



Obrázek 8: Schéma iontového zdroje s ASAP sondou [134]

2.3.2 Ionizace a ionizační mechanismy

Ionizace využívající ASAP sondu je vhodná pro těkavé a středně těkavé látky v pevném nebo kapalném stavu. Z hlediska polaritý dochází k ionizaci středně až méně polárních látek s širokým rozsahem molekulových hmotností od malých molekul [135] až po polymery [136].

Analýza makromolekul je realizována při vysokých teplotách plynu využívaného pro odpaření analytů a dochází tak k teplotnímu štěpení. Podobně jako v případě pyrolyzní chromatografie jsou následně identifikovány termální fragmenty. Fragmentace velkých molekul může být zintenzivněna pomocí fragmentace ve zdroji (tzv. in-source fragmentace), které je dosaženo vložem vyššího napětí na výbojovou jehlu [110]. Ačkoliv tento typ fragmentace zvyšuje komplexnost spekter, byl v několika studiích využit pro studium struktury sledovaných látek [137, 138].

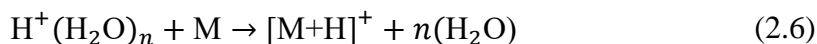
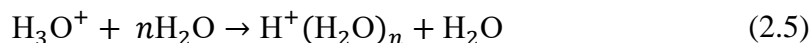
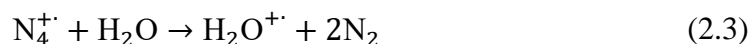
Ionizační mechanismus je založen na tvorbě reakční plazmy generované korónovým výbojem obdobně jako v případě APCI a následnou ionizací vlastních analytů. Na rozdíl od APCI vznikají v ASAP-MS reakční ionty přes primární ionizaci plynu, který je využit pro odpaření vzorku, nejčastěji dusíku a následně jsou tvořeny další reakční ionty dle množství zbytkové vlhkosti přítomné ve zdroji. Ionizační reakce probíhající za podmínek ASAP-MS jsou diskutovány v řadě studií [135, 139, 139–141].

Nejčtenějšími ionty v ASAP-MS spektrech jsou protonované/deprotonované molekuly $[M+H]^+/[M-H]^-$ a radikál kationty/radikál anionty M^+/M^- . Poměr signálů protonovaných/deprotonovaných analytů a radikál iontů závisí na polaritě sledovaných analytů a podmínkách ve zdroji. Účinnost ionizace závisí především na protonové a elektronové afinitě analytů a jejich ionizační energii [111].

V pozitivním módu dochází k elektronové ionizaci molekul dusíku, jak ukazuje rovnice (2.1). Vzniklé radikál kationty mohou reagovat s dalšími molekulami dusíku za vzniku N_4^{+} dle rovnice (2.2). Pokud je ve zdroji přítomna zbytková vlhkost, může docházet k reakci mezi N_4^{+} a molekulami vody za vzniku radikál kationtu H_2O^{+} dle rovnice (2.3). Reakcí vzniklého radikál kationtu s další molekulou vody dochází k přenosu protonu a vzniku oxoniového kationtu a hydroxylového radikálu a následně až ke tvorbě aduktů $H^+(H_2O)_n$ dle rovnice (2.4) a (2.5). Ionizace mechanismem přenosu protonu je založena na acidobazické reakci, kde molekula analytu vystupuje jako Brønstedova báze a reakční ionty jako Brønstedova kyselina. Analyty s dostatečnou protonovou afinitou jsou tak protonovány za tvorby $[M+H]^+$, jak ukazuje rovnice (2.6).

Za předpokladu, že je iontový zdroj zbaven zbytkové vlhkosti, může být zvýhodněn mechanismus přenosu náboje mezi N_4^{+} a analytem viz rovnice (2.7). Zbytková vlhkost může být odstraněna intenzivním proudem horkého dusíku. Například autoři Farenc a kol. za tímto účelem nechali iontovým zdrojem proudit horký dusík po dobu 2 hodin před vlastním měřením [111]. K přenosu náboje dochází v případě, že je ionizační energie analytu nižší než ionizační energie dusíku. Tento typ ionizace je typický pro méně polární látky. Přenos náboje může být potlačen záměrným přiváděním protického rozpouštědla do prostoru iontového zdroje (např. možnost přivádění referenčního roztoku nebo umístěním vialky s protickým rozpouštědlem do prostoru iontového zdroje [142]). V pozitivním módu jsou typické jednou nabitě ionty [113], dvojnásobně nabitě ionty byly pozorovány u hydroxychlorchinonů [143].

Vedle přenosu protonu a náboje byly v literatuře pozorovány i další mechanismy tvorby iontů. Například při analýze polyalfaolefinů docházelo k abstrakci vodíku za tvorby $[M-H]^+$, inkorporaci dusíku $[M+N]^+$ a vzniku $[M-2H]^+$ v důsledku ztráty H_2 z radikál kationtu M^+ [144]. Tvorba aduktových iontů, která je typická pro ESI, byla v literatuře popsána pro taurocholovou kyselinu [145]. Velmi často také vznikají dehydratované molekuly $[M-H_2O]^+$ tvořící se z molekul s hydroxylovými skupinami, které mohou být snadno odštěpeny jako molekula vody [146].

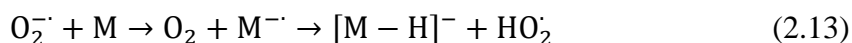
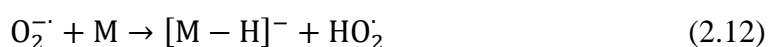
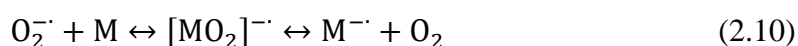
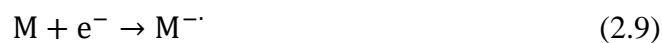


Negativní ionty vznikají elektronovým záchytem pomalých termálních elektronů z plazmy viz rovnice (2.9), disociačním elektronovým záchytem viz rovnice (2.11), abstrakcí protonu viz rovnice (2.12) a (2.13) a adicí aniontu viz rovnice (2.14).

Elektronový záchyt termálních elektronů je možný pro molekuly s kladnou elektronovou afinitou, a dochází tak ke vzniku radikál aniontu $\text{M}^{\cdot-}$. Radikál anionty mohou vznikat rovněž mechanismem popsaným ve studii autorů Dzidic a kol., kteří popisují vznik bazického radikál aniontu $\text{O}_2^{\cdot-}$ mechanismem elektronové ionizace podle rovnice (2.8). Analyty mohou s $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagovat za vzniku intermediátu $[\text{MO}]_2^{\cdot-}$, který dále podléhá disociaci na $\text{M}^{\cdot-}$ a O_2 podle rovnice (2.10) [147].

Deprotonované ionty $[\text{M} - \text{H}]^-$ vznikají abstrakcí protonu z molekuly analytu. Jedním z možných mechanismů vzniku $[\text{M} - \text{H}]^-$ je reakce analytu s bazickým $\text{O}_2^{\cdot-}$ viz rovnice (2.12). V literatuře jsou diskutovány i různé další mechanismy vzniku $[\text{M} - \text{H}]^-$. Například Song a kol. ve své studii zaměřené na mechanismus vzniku negativních iontů při APPI ionizací uvádí mechanismus dle rovnice (2.13), ve kterém je v prvním kroku přenos elektronu následován přenosem vodíku [140].

Adice chloridu (2.14) byla popsána ve studii McEvena a kol., kde autoři podpořili vznik aduktů přiváděním methylenchloridu do iontového zdroje [141].



2.4 Využití iontové mobilní separace ve spojení s hmotnostní spektrometrií

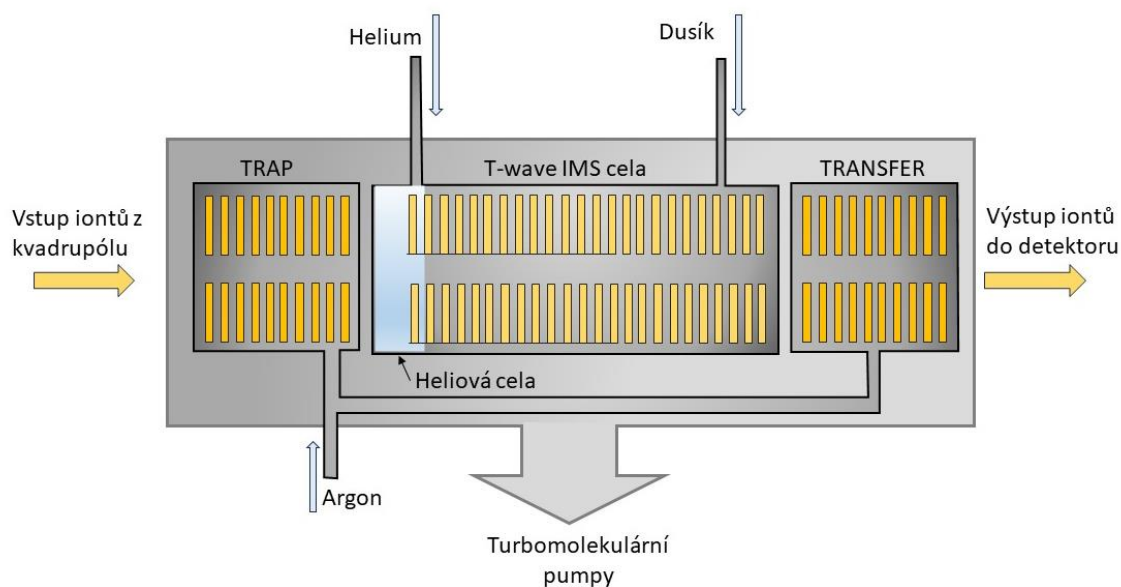
Snížená selektivita způsobená absencí úpravy vzorku a separačního kroku u přímých technik hmotnostní spektrometrie může být částečně kompenzována zařazením post ionizační separace pomocí iontové mobility. Tato technika separuje vzniklé ionty na základě tvaru, velikosti a náboje. V současnosti existuje celá řada typů iontových mobilních cel a technických řešení spojení iontové mobility s hmotnostní spektrometrií. Této problematice se věnuje velké množství přehledových článků [148–153]. Pro spojení mobilní separace a hmotnostně spektrometrické detekce se běžně využívá několik typů zařízení a to:

- Iontová mobilní spektrometrie v driftové trubici (DTIMS)
- Iontová mobilní spektrometrie s vysokonapěťovou asymetrickou vlnou (FAIMS)
- Iontová mobilní spektrometrie s putující vlnou (TWIMS)
- Iontová mobilní spektrometrie se záchytem iontů (TIMS)
- Cyklická iontová mobilní spektrometrie (cIM) s TW technologií

Na obrázku 9 je uvedeno schéma cely pro lineární iontovou mobilitu s využitím putující vlny Triwave od firmy Waters. Ionty vzniklé ionizací jsou v tomto typu zařízení zachyceny a akumulovány v první části iontové mobility nazývané Trap. Následně jsou ionty vpuštěny do druhé části cely, kde probíhá vlastní separace. Mobilní cely využívají pohybující se napěťové pulzy (vlny) aplikované na seřazené prstencové elektrody. Tyto vlny vedou ionty v protisměru k proudu driftového plynu. Jak ionty putují reagují a kolidují s driftovým plynem, jsou zpomalovány v závislosti na svém tvaru, velikosti a náboji. To způsobí, že ionty s různým tvarem, velikostí nebo nábojem putují mobilní celou různou rychlostí. Separované ionty jsou převáděny přes druhou kolizní celu (Transfer) do TOF analyzátoru. Celý cyklus separace trvá pouze desítky milisekund a je tak plně kompatibilní s analyzátozem doby letu. Trap a Transfer cely mohou být operovány v módu kolizních cel a procesem kolizí aktivované disociace produkovat z iontů analytů fragmenty, což nabízí mnoho možností pro strukturní analýzu. Iontová separace je optimalizována zejména pomocí dvou parametrů, a to výšky napěťové vlny a rychlosti jejího putování v rámci cely [152].

Spojení ASAP ionizace a iontové mobility bylo poprvé realizováno v roce 2011 při analýze nečistot ve 2-naftalenaminech [154]. V současnosti je spojení ASAP-IMS-MS běžně využívané při analýzách polymerů a v petroleomice [111, 113, 155–157]. Ještě vyšší selektivity a rozlišení je možné dosáhnout s cyklickou iontovou mobilitou, která umožňuje rovněž provádět IMSⁿ separaci a výrazně tak přispět ke spektrálnímu rozlišení [158].

Tato technika nabízí možnost zvýšení selektivity metod založených na přímé hmotnostní spektrometrii, což je ideální pro vzorky uměleckých děl, které jsou často velmi komplexní. Navíc vzhledem k rychlosti separace nedochází k prodloužení času analýzy. Ze studií využívající spojení IMS-MS v analýze kulturního dědictví je možné uvést např. studii Pauk a kol., kteří využili spojení FIA/ESI-IMS-MS pro stanovení provenience indiga [159].



Obrázek 9: Schéma cely pro lineární iontovou mobilitu TriWave (Waters)

3 Cíle disertační práce

3.1 Analýza lipidických pojiv

- Vývoj ASAP-MS metody pro klasifikaci rostlinných olejů
- Aplikace Analýzy hlavních komponent (Principal component analysis, PCA) pro nalezení látek, jejichž obsahy se v rostlinných olejích významně liší
- Využití ASAP-IMS-MS metody pro analýzu modelových vzorků temper připravených ve dvou typech lipidických pojiv, a to vaječném žloutku a lněném oleji
- Nalezení markerů, které by tato dvě pojiva rozlišily v degradovaném stavu a v přítomnosti různých pigmentů na neinertrním podkladu
- Prostudování potenciálu ASAP-IMS-MS pro rozlišení těchto dvou typů pojiv v autentických předmětech kulturního dědictví

3.2 Analýza barevných složek

- Aplikace metody ASAP-IMS-MS na charakterizaci organických materiálů v reálných archeologických směsích pro dekoraci keramiky
- Využití metod prvkové analýzy, FIA/ESI-MS a Ramanovy spektrometrie k určení zdroje barevného pigmentu a charakterizaci matrice
- Rekonstrukce receptu na přípravu barevných směsí na základě získaných výsledků

3.3 Analýza historických odlévacích forem z doby římské

- Analýza materiálu odlévacích forem metodou rentgenfluorescenční spektrometrie
- Aplikace metod Ramanovy spektrometrie, Py-GC/MS a ASAP-IMS-MS na charakterizaci organických reziduí na povrchu odlévacích forem

4 Experimentální část

4.1 Analýza pojiv na bázi lipidů metodou přímé hmotnostní spektrometrie za využití pevné sondy

4.1.1 Význam a metodické aspekty studie v kontextu historického výzkumu a památkové péče

Identifikace pojiv ve vzorcích maleb poskytuje klíčovou informaci pro každý sanační a restaurátorský zákrok a napomáhá při studiu tvorby daného umělce v uměnovědných oborech. Z historického pohledu bylo v Evropě využíváno několik základních typů pojiv a jejich směsí, jež je možné rozdělit do chemických tříd na proteiny, pryskyřice, polysacharidy a lipidy [1–3]. Základní barevná vrstva tvořená disperzí pigmentu a pojiva byla navíc často opatřena ochranným filmem, nejčastěji na bázi vosků a přírodních pryskyřic. Mimo zmíněná pojiva mohla barevná vrstva obsahovat řadu aditiv jako například sikativa, stabilizátory a další [160].

Chemická analýza takovýchto vzorků je komplikována jejich vysokou heterogenitou. Ve vzorcích také dochází k interakcím jednotlivých komponent např. kovových kationtů, které mohou s ostatními složkami díla reagovat a měnit jejich chemickou strukturu, případně katalyzovat oxidační reakce [32]. Významnými faktory, které ovlivňují kvalitativní složení poživ jsou degradační procesy. Ty probíhají vlivem mikrobiální aktivity a působením environmentálních podmínek jako jsou např. teplota, relativní vlhkost, pH nebo UV záření. Další komplikací je často nízká koncentrace pojiva ve vzorku. Odebraný vzorek je obvykle nepatrných rozměrů v řádu jednotek milimetrů a pojivo představuje pouze zhruba 10 % celkové hmotnosti vzorku [1].

Identifikace poživ je založena na detekci stabilních látek, které zůstaly v intaktním stavu a degradačních produktů, které byly zachovány, respektive vznikly v delším časovém horizontu. To představuje náročný úkol vyžadující vysoce specifické a citlivé analytické techniky [4]. Nejběžněji se pro analýzu a klasifikaci poživ na bázi acylglycerolů využívá spojení separačních technik jako je plynová a kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí [18, 52]. Tyto techniky jsou dostatečně specifické, citlivé, avšak časově náročné na přípravu vzorků i samotnou analýzu.

Vedle prací využívající spojené techniky jsou stále více publikovány studie, kde je analýza prováděna technikami přímé hmotnostní spektrometrie, a to zejména MALDI-MS [99, 100, 102, 104, 105], ionizace za využití akustické vlny (SAWN-MS) [92] nebo DESI-MS [85]. Technika ASAP-MS, případně ve spojení s iontovou mobilitou ASAP-IMS-MS, nebyla doposud aplikována na analýzu uměleckých poživ a jejich degradačních produktů za účelem nalezení markerů, které by pojiva dokázaly odlišit i v degradovaném stavu.

Jak bylo popsáno v teoretické části práce, ASAP-MS je ambientní ionizační technika prozatím bez možnosti online spojení s chromatografickou separací. Je tedy nutné vzít v úvahu její rysy před samotným hledáním markerů charakterizujících jednotlivá pojiva na bázi lipidů.

- ASAP-MS neumožňuje separaci izomerních látek a jednotlivé signály tak odpovídají sumě všech izomerních struktur. Není tedy obvykle možné přiřadit signálu konkrétní strukturu, a to ani za předpokladu zařazení iontové mobility v důsledku nedostačujících rozdílů v kolizních průřezích iontů a následně v iontových mobilitách jednotlivých izomerních acylglycerolů
- U techniky ASAP-MS jsou nevyhnutelné konkurenční a matriční efekty ve zdroji z důvodu simultánní ionizace velkého počtu komponent v jednom místě a ve stejném čase, což negativně ovlivňuje řadu analytických parametrů

- ASAP-MS je primárně metodou kvalitativní analýzy a umožňuje kvantifikaci analytů s nižší přesností (obvykle na úrovni semikvantitativní analýzy)

Všechny tyto rysy ovlivňují opakovatelnost naměřených spekter. Je tedy nutné analyzovat vzorek ve více opakováních vhodně zařazených v celé měřené sekvenci vzorků, aby byly rozdíly v profilu markerů v jednotlivých materiálech správně vyhodnoceny a spolehlivě prokázány. Rovněž je nutné jednotlivá měření prokládat slepými vzorky, aby byl kontrolován případný přenos analytů mezi měřeními a byly vyloučeny falešně pozitivní výsledky plynoucí z křížové kontaminace. Neméně důležité je přizpůsobit množství vzorku, které je do iontového zdroje přiváděno tak, aby nedošlo ke kontaminaci zdroje sledovaným analytem.

Cílem této studie bylo vyvinout ASAP-MS a ASAP-IMS-MS metodu pro analýzu pojiv na bázi lipidů a následně odlišit olejové pojivo od vaječného žloutku ve stařených vzorcích modelových temper na základě charakteristických markerů. Dále poté prostudovat potenciál metody na autentickém vzorku nástěnné malby.

4.1.2 Chemikálie

Aceton (HPLC grade, $\geq 99.8\%$, Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) pro ředění a extrakci vzorků. Roztok leucin enkefalinu (HPLC, $\geq 95\%$, Sigma Aldrich) pro korekci naměřených spekter. Mravenčan sodný pro kalibraci QqTOF analyzátoru připravený laboratorně smícháním $100\ \mu\text{L}$ $0.1\ \text{M}$ hydroxidu sodného (Fluka, Buchs, Švýcarsko), $200\ \mu\text{l}$ 10% kyseliny mravenčí ($99\text{--}100\%$, Avantor PA, USA) a $30\ \text{ml}$ směsi acetonitrilu (Honeywell, Charlotte, NC, USA) a vysoce čištěné vody Mili-Q (Merck) v poměru $80:20\ (v/v)$.

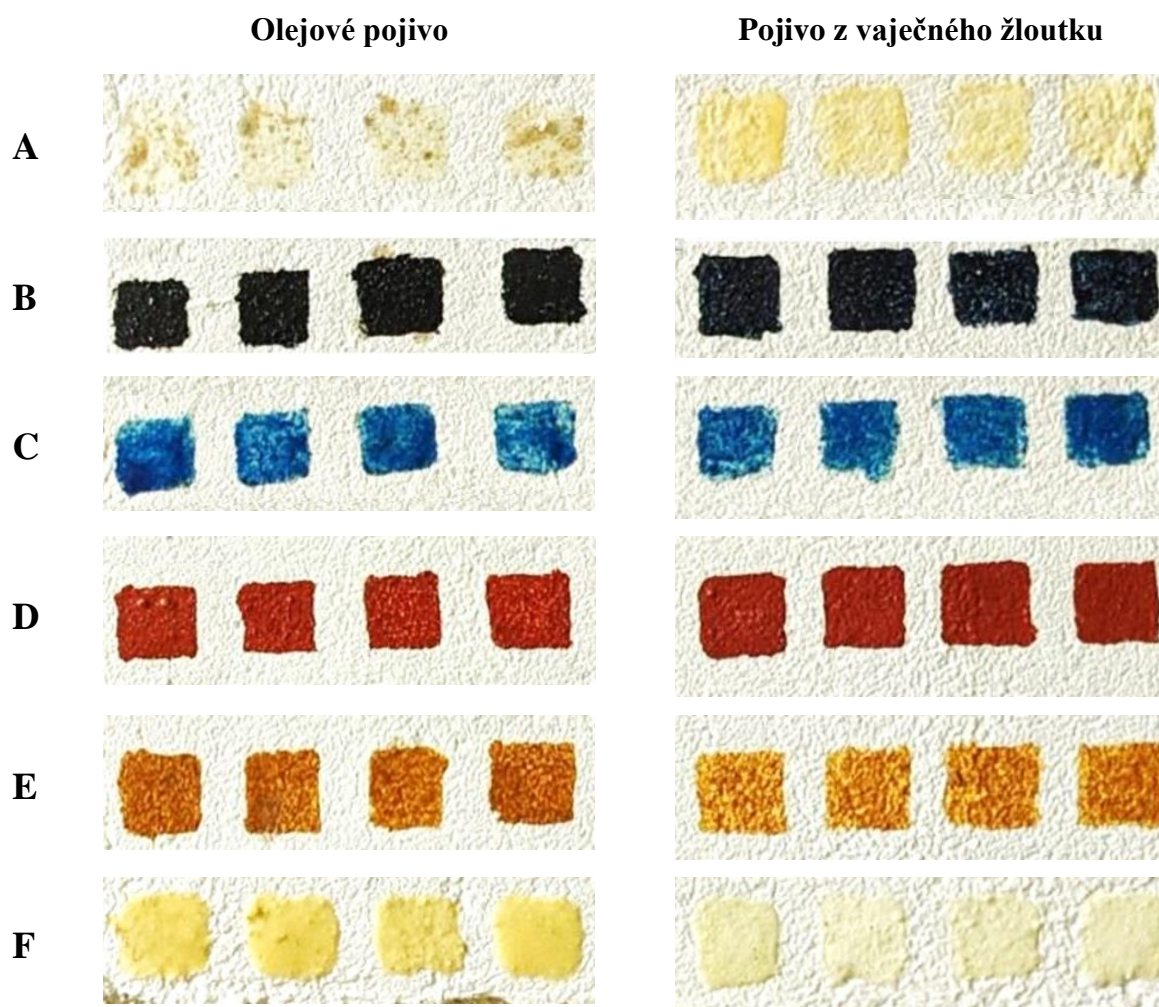
Pro ověření vhodnosti metody byly využity následující oleje zakoupené od různých dodavatelů: Iněné oleje za studena lisované značky Kremer pigmente (Německo), Rublev colours (Kalifornie), Schmincke (Německo), Iněné oleje bělené značek Aurelio (Německo), Rublev colours, Lukas (Německo), Winsor & Newton (Velká Británie), saflorové oleje Umton (Česká republika), Lefranc bourgeois (Francie), Sennelier (Francie), Schmincke, konopný olej značky Solio (Česká republika), čerstvý olej z vlašských ořechů značky Solio, oleje z vlašských ořechů zahuštěné na slunci od Rublev colours, Kremer pigmente, makové oleje od Umton, Solio, Schmincke, Sennelier, olivový olej od značky Sigma Aldrich (Missouri), hřebíčkové oleje značky Kremer Pigmente a Rublev colours.

Z pigmentů byly pro přípravu temper zvoleny následující: indigo (indigofera), egyptská modř a červená hlínka (všechny od společnosti Zecchi, Itálie), olovnato-cínčitá žluť a okr sienna od firmy Kremer pigmente.

4.1.3 Modelové vzorky temper

Malé kvádry s omítkou o rozměru 15×10×3 cm sloužící jako podklad pro tempery byly připraveny z hrubší podkladové vrstvy (jádrové omítky) a jemné povrchové vrstvy. Spodní vrstva kvádry byla připravena z bílého hašeného vápna Čerták (Vápenka Čertovy schody, Česká republika) a křemičitého písku (Tomí-písek, Česká republika). Jádrová omítka byla připravena smísením hrubého písku a hašeného vápna v poměru 3:1. Takto připravený podklad schnul několik dní ve vlhkém prostředí do zatvrdnutí, ne však úplného zaschnutí. Před nanesením jemné vrstvy omítky byla svrchní vrstva jádrové omítky stržena. Jemná omítka připravená z hašeného vápna a jemnějšího písku (částice do 2 mm v poměru 1:2) byla nanesena na připravený podklad jádrové omítky v tenké vrstvě a ponechána do mírného zaschnutí. Následně byla vrstva filcována jemným filcem a kletována hladítkem. Během úpravy povrchu byla omítka jemně kropena vodou, aby se malta lépe utáhla a vápno více vyvstalo na povrch.

Tempery byly připraveny smísením požadovaného pojiva a pigmentu. Jako olejové pojivo byla využita směs lněného polymerovaného oleje značky Umton a lněného „čištěného“ oleje (Leinöl gereinigt) od značky Schmincke. Pro vaječné tempery byl využit žloutek z vejce pocházejícího z domácího chovu. Tempery byly míchány s pojivem do požadované konzistence na skleněné desce pomocí špachtle a štětcem nanášeny na zaschlé modelové omítky jako čtverečky o straně cca 1 cm (obrázek 10).



Obrázek 10: Modelové vzorky olejových a vaječných temper. Samotné pojivo řádek (A), směsi pojiva a barviva/pigmentu řádky (B–F); indigo (B), egyptská modř (C), hlinka (D), okr (E), olovnato-cínčitá žluť (F)

4.1.4 Umělé staření vzorků v přístroji Solarbox

Umělé staření modelových vzorků bylo provedeno pomocí přístroje Solarbox 3000e RH (CO.FO.ME.GRA, Itálie) vybaveného xenonovou lampou. Podmínky staření byly následující: teplota 30 °C, vlhkost 75 %, výkon xenonové lampy 500 W/m². Jednotlivé modelové řady byly odebírány vždy po 504 hodinách (3 týdnech) po dobu 9 týdnů.

4.1.5 Metodika

Analýza nativních olejů i modelových vzorků byla realizována na vysoko rozlišujícím hmotnostním spektrometru Synapt G2-S (Waters, Milford, MA, USA) vybaveném příslušenstvím pro ionizaci pomocí pevné sondy (ASAP) a iontovou mobilní celou (TriWave). Data byla měřena a vyhodnocována v programu MassLynx V4.2 SCN 1016, Markerlynx V4.1 SCN 639 (Waters, Manchester, UK) a EZinfo 3.0.3.0 (Umetrics, Umea, Švédsko). Hybridní

analyzátor QqTOF byl kalibrován v rozsahu m/z 50–1200 pomocí ESI sondy přímou infuzí mravenčanu sodného před výměnou iontového zdroje za pevnou sondu. Na začátku a na konci každé analýzy byla v krátkých intervalech měřena spektra leucin-enkefalinu pro následnou korekci dat na přesnou hmotu (m/z 556.2771 Da). Separace obou kanálů (ESI a ASAP) byla zajištěna pomocí otočné stínící přepážky.

Pro optimalizaci metody byl využit lněný olej za studena lisovaný (Schmincke) ředěný acetonem v poměru 1:4 (v/v). Účinnost ionizace byla posuzována na základě hodnoty sumy celkového iontového proudu (TIC) a ionizačních výtěžků vybraných tri- a diacylglycerolů, které představují hlavní složky lipidických pojiv. Každý bod optimalizace teploty a výbojového proudu byl měřen v sedmi opakováních, aby bylo možné posoudit rozptyl měření (výpočet směrodatné odchylky). Optimalizace rychlosti průtoku dusíku byla měřena v pěti opakováních.

Experimentální podmínky byly po optimalizaci nastaveny následovně. Ionizační mód pozitivní, délka analýzy: 2.2 min, kolizní energie na Trapu (trap collision energy): 4 eV, kolizní energie na Transferu (transfer collision energy): 2 eV, teplota iontového zdroje (ion source temperature): 100 °C, napětí na vzorkovacím kuželu (sampling cone voltage): 80 V, výbojový proud (corona current): 2 μA , průtoková rychlost plynu (desolvation gas flow, N_2) 500 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$, mód rozlišení: resolution (dráha iontů v TOF analyzátoru ve tvaru jednoduchého písmene V). Pro experimenty zahrnující iontovou mobilitu byla nastavena délka analýzy 3 min, rychlost pohybující se vlny (travelling wave velocity) v iontové mobilitní cele: 550 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Rychlost pohybující se vlny byla optimalizována v jednom experimentu, kde kritériem byla separace mono-, di- a triacylglycerolů za současného zachování celé mobilitní separace v rámci jednoho mobilitního skenu (bez přestupu iontů mezi jednotlivými skeny). Výška vlny (wave height) v IM cele: 40 V, driftovací plyn (drift gas): helium, ostatní experimentální podmínky byly nastaveny stejně jako pro sken bez iontové mobility. Pro MS/MS experimenty byla nastavena LM hodnota (LM resolution) na 15. Kolizní energie byla nastavena pro jednotlivé molekuly individuálně a je uvedena u příslušných MS/MS spekter. Veškeré kolizní experimenty byly prováděny v kolizní cele Transfer, tak aby byla zachována IM separace iontu prekurzoru.

Ověření vhodnosti metody pro rozlišení olejů s odlišným profilem VMK bylo provedeno analýzou souboru sedmi druhů olejů. Vybrané oleje byly zakoupeny od různých dodavatelů tak, aby byla zahrnuta biologická a technologická variabilita jednotlivých typů olejů. Vzorky olejů byly zředěny acetonem v poměru 1:100 (v/v), špička testovací kapiláry (se zataveným koncem) byla vždy ponořena do připraveného roztoku, po odpaření rozpouštědla upevněna do ASAP sondy a instalována do iontového zdroje. Získaná data byla vyhodnocena analýzou hlavních komponent.

Pro analýzu modelových vzorků temper byly zvoleny dva přístupy, a to analýza extraktů a přímá analýza vzorků temper. Při analýze extraktů byly přibližně 2 mg vzorku (směs tempery s částicemi jemné omítky, která byla odškrábnuta z povrchu kvádrů) extrahovány 1 ml acetonu v ultrazvukové lázni po dobu 15 min. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 3 min při 5 000 otáčkách/min. Získaný supernatant byl odpařen do sucha a rekonstituován na výsledný objem 300 µl acetonu. Pro deponování vzorku byly využity komerčně dostupné skleněné kapiláry se zatavenými konci. Kapilára byla namočena do extraktu a po odpaření acetonu upevněna do ASAP sondy a instalována do iontového zdroje. Aby bylo zabráněno přenosu látek mezi jednotlivými analýzami, byla pro každé měření využita vždy nová kapilára. Ta byla před analýzou vzorku vypálena ve zdroji při 600 °C a následně bylo změřeno spektrum kapiláry bez vzorku jako slepé stanovení.

Ve druhém postupu byla testována možnost měřit vzorky přímo bez extrakčního kroku. Malý kousek odebraného vzorku obsahujícího pojivo, pigment a zbytky omítky (přibližně 3 mm²) byl rozdrcen v achátovém hmoždíři na jemný prášek. Konec zatavené vzorkovací kapiláry byl opakovaně otírán o rozdrcený vzorek a následně analyzován stejným způsobem jako extrakt. Před PCA analýzou byly manuálně vyloučeny signály pozadí a intenzity vybraných markerů následně dohledány pomocí software (SW) Markerlynx XS.

Tabulka 7: Zkratky VMK a acylglycerolů využívané ve studii

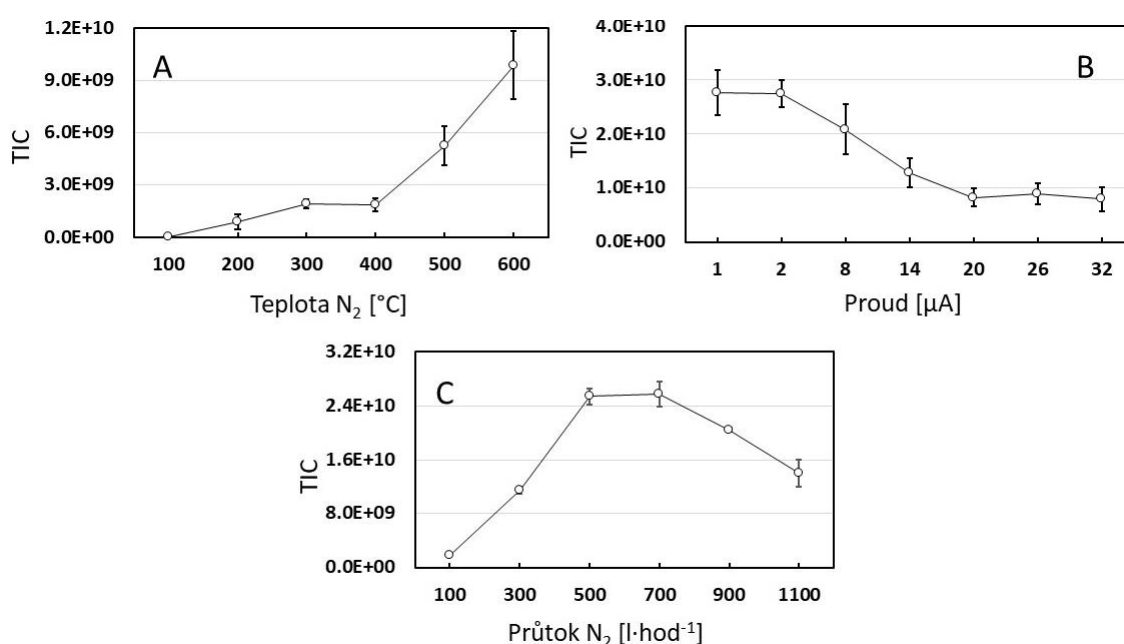
Zkratky VMK	Popis
C _{16:0}	Kyselina palmitová
C _{18:0}	Kyselina stearová
C _{18:1}	Kyselina olejová
C _{18:2}	Kyselina linolová
C _{18:3}	Kyselina linolenová

* složení řetězců tri-, di- a monoacylglycerolů je vyjadřováno formou uvedených zkratk, tedy diacylglycerol obsahující řetězec kyseliny stearové a linolové je označen zkratkou C_{18:0}C_{18:2}. Inkorporace kyslíku do molekuly je vyjádřena připsáním +O, inkorporace dvou kyslíků jako +2O

4.1.6 Výsledky a diskuse

Pro analýzu acylglycerolů, jež představují hlavní komponenty olejů a tuků, byly optimalizovány tři klíčové parametry ionizace, a to teplota dusíku, rychlost průtoku dusíku a proud mezi výbojovou jehlou a vstupem do MS. Pro optimalizaci byl využit lněný olej za

studena lisovaný, zředěný acetonem v poměru 1:4 (v/v). Teplota dusíku byla optimalizována v rozsahu 100–600 °C s krokem 100 °C, každý bod byl měřen v sedmi opakováních. Z grafu závislosti sumy celkového iontového proudu na teplotě (obrázek 11 A) je patrné, že se zvyšující se teplotou dochází k růstu signálu. Tento trend byl následně ověřen i pro vybrané acylglyceroly viz obrázek 1P. Při zvolené teplotě 600 °C byla nejvyšší odezva signálu dosažena při nižších hodnotách proudu mezi výbojovou jehlou a vstupem do MS. Pro další optimalizaci byla zvolena hodnota 2 μA (obrázek 11 B pro TIC a obrázek 2P pro vybrané acylglyceroly). Optimální rychlost průtoku dusíku byla následně dosažena při 500–700 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$, nižší směrodatná odchylka měření byla docílena při rychlosti proudění 500 $\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$ (obrázek 11 C a obrázek 3P), proto byla tato hodnota použita pro další experimenty.



Obrázek 11: Závislost TIC na parametrech ASAP zdroje, vliv teploty N₂ (A), proudu vloženém na výbojovou jehlu (B), rychlosti průtoku N₂ (C)

Optimalizovaná metoda byla testována na souboru sedmi typů olejů (lněný, ořechový, konopný, saflorový, makový, olivový a hřebíčkový). Dva z těchto olejů byly navíc rozdílně technologicky upravené, jednalo se o lněný olej panenský a bělený (slunečním zářením) a ořechový olej surový a zahuštěný na slunci. Oleje byly před analýzou stonásobně zředěny acetonem a měřeny ve čtyřech opakováních.

Spektra získaná měřením souboru olejů byla korigována na přesnou hmotu leucinu enkefalinu. Příklad MS spektra získaného analýzou lněného oleje je uveden na obrázku 12. Ve spektru jsou patrné tři významné oblasti, a to oblast intaktních triacylglycerolů v protonované formě $[\text{M}+\text{H}]^+$ a fragmentů vznikajících po ztrátě jednoho nebo dvou acylových řetězců,

v důsledku čehož vznikají ionty typu $[M - RCOO]^+$ a $[RCO + 74]^+$. Tyto fragmenty detekovali rovněž van der Berg a kol. ve studii využívající pro analýzu olejů teplotně rozlišenou přímou hmotnostní spektrometrii (DTMS) s elektronovou ionizací (energie elektronového svazku 16 eV) [103]. Nejvýznamnější molekulární ionty a fragmenty přítomné ve spektrech lněných olejů jsou uvedeny v tabulce 8. Vedle výše zmíněných molekulárních iontů a fragmentů jsou přítomny i signály o 16 a 32 Da vyšší, než jsou uvedené nominální hmotnosti iontů v tabulce 8, což poukazuje na inkorporaci jedné a dvou molekul kyslíku do struktury acylglycerolů v průběhu stárnutí materiálu. Tato inkorporace byla rovněž pozorována ve spektrech olejů metodou DTMS [103].

Na obrázku 13 je uvedeno MS/MS spektrum signálu m/z 873.6927 dominantního ve vzorcích lněného oleje. Signál odpovídá triacylglycerolu o složení $C_{18:3}C_{18:3}C_{18:3}$. Uvedené MS/MS spektrum rovněž dokazuje vznik výše zmíněných fragmentů $[M - RCOO]^+$, $[RCO + 74]^+$ i za podmínek kolizně indukované disociace. Dále je zde patrný acyliový iont m/z 261.2195 odpovídající kyselině linolenové.

Fragmentační MS spektra potvrzují, že vedle oxidovaných produktů jsou přítomny i signály intaktních diacylglycerolů a monoacylglycerolů. Například signál iontů s teoretickou hmotností m/z 613.4854 může odpovídat oxidovanému fragmentu diacylglycerolu s acylovými řetězci s různým stupněm nenasycenosti (odpovídající izomerní formy), ale může patřit i protonované molekule diacylglycerolu se dvěma řetězci kyseliny linolenové typu $[M+H]^+$ (viz struktury na obrázku 14). Jak je patrné z MS/MS spektra uvedeného signálu ve vzorku čerstvého lněného oleje na obrázku 14, iont prekursoru odštěpí molekulu vody a vzniká fragment s m/z 595.4678. Nejintenzivnějším acyliovým iontem je m/z 261.2153 odpovídající kyselině linolenové a signál m/z 335.2560 poté odpovídá fragmentu monoacylglycerolu s řetězcem kyseliny linolenové. Při porovnání MS/MS spektra nestařeného oleje s MS/MS spektrem stařeného oleje na obrázku 26 dále v diskusi je patrné, že druhým nejintenzivnějším acyliovým iontem stařeného oleje je m/z 277.2182, který odpovídá hydroxylované kyselině linolenové (a možným izomerním formám). Nejintenzivnější acyliový iont m/z 275.1989 poté může odpovídat rovněž oxidované kyselině linolenové s inkorporovanou ketoskupinou. Lauer a kol. rovněž pozorovali v APCI-MS spektrech ztrátu dvou vodíků z acyliového iontu kyseliny linolenové za vzniku $[F - 2H]^+$ [161]. V iontovém zdroji může také docházet ke spontánní dehydrataci intaktních molekul di- a monoacylglycerolů za vzniku $[M - H_2O]^+$ v důsledku vysoké teploty. Tento proces je pozorován i u jiných typů látek. Např. Ray a kol. jej popisují při analýze steroidních látek [146].

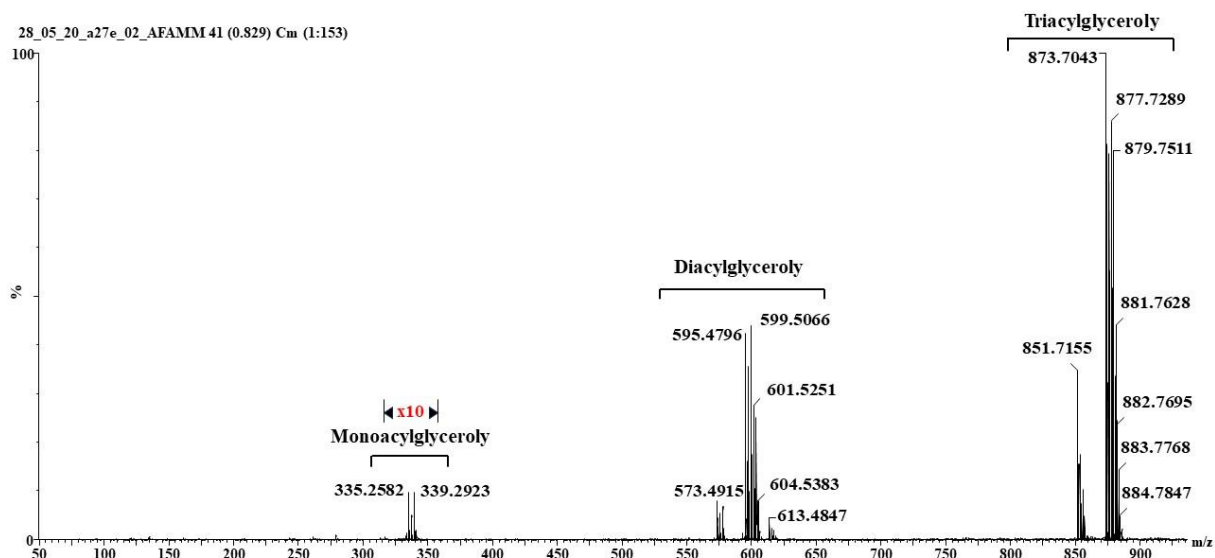
Tabulka 8: Nejintenzivnější molekulární ionty a fragmenty v ASAP-MS spektrech lněných olejů

Nominální hmotnost [Da]	Fragment/ iont	Molekulový vzorec
887, 885,....873	$[M+H]^+$	$C_{57}H_{110-2n}O_6$, kde $n=2-9$
857, 855,...851	$[M+H]^+$	$C_{55}H_{107-2n}O_6$, kde $n=3-6$
829	$[M+H]^+$	$C_{53}H_{97-2n}O_6$, kde $n=3$
607, 605,595	$[M - RCOO]^+$	$C_{39}H_{75-2n}O_4$, kde $n=0-6$
579, 577, 575, 573	$[M - RCOO]^+$	$C_{37}H_{71-2n}O_4$, kde $n=0-3$
551	$[M - RCOO]^+$	$C_{35}H_{67}O_4$
341, 339, 337, 335	$[RCO + 74]^+$	$C_{21}H_{41-2n}O_3$, kde $n=0-3$
313	$[RCO + 74]^+$	$C_{19}H_{37}O_3$

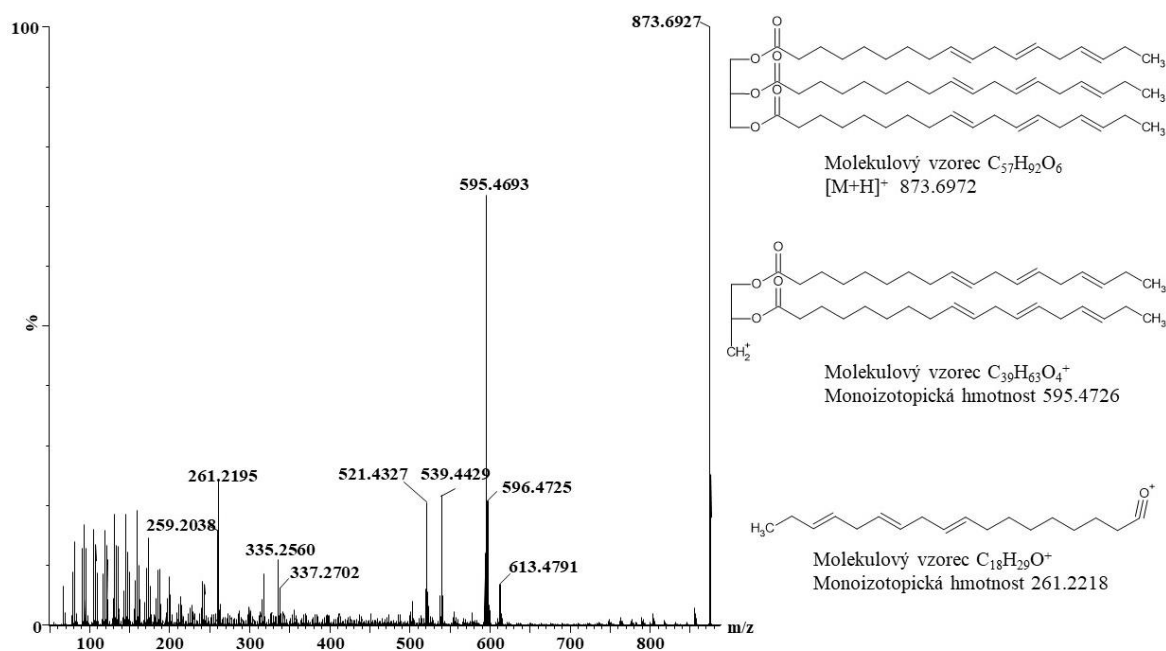
n označuje počet dvojných vazeb

R nasycený/nenasycený uhlíkový řetězec navázaný na karboxylovou skupinu

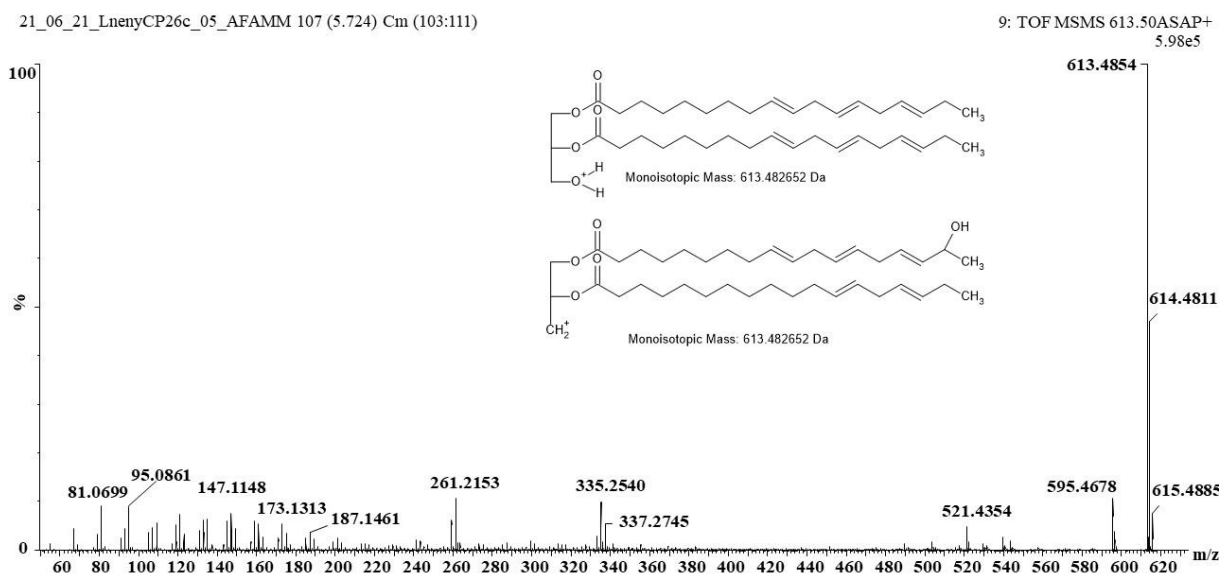
... pokračování homologické řady



Obrázek 12: ASAP-MS spektrum lněného oleje



Obrázek 13: MS/MS spektrum $C_{18:3}C_{18:3}C_{18:3}$, kolizní energie 40 V

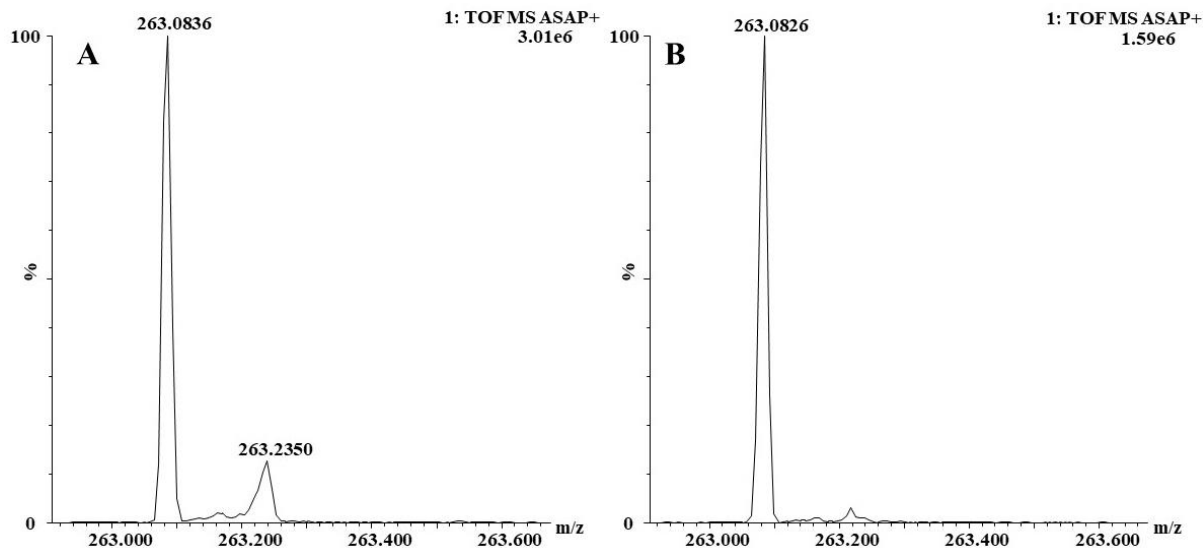


Obrázek 14: Fragmentace iontu s m/z 613.4854 v nativním lněném olej, kolizní energie na Transfer kolizní cele 30–60 V

Triacylglyceroly byly v získaných spektrech přítomny ve formě protonovaných molekul $[M+H]^+$, na rozdíl od studie autorů Pizzo a kol., kteří v ASAP-MS spektrech pozorovali triacylglyceroly dominantně ve formě radikál kationtů M^+ a v menším zastoupení protonované ionty $[M+H]^+$ [162]. Pravděpodobným vysvětlením může být fakt, že v této studii byl simultánně přiváděn do iontového zdroje vodný roztok leucin enkefalinu, což zvýšilo reziduální

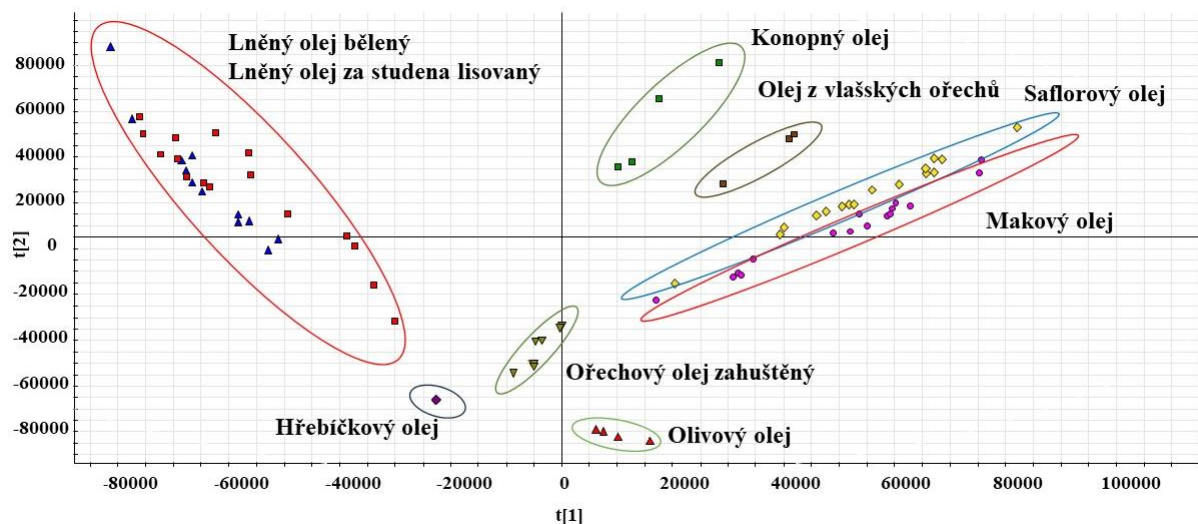
vlhkost ve zdroji a zvýhodnilo tak přenos protonu oproti přenosu náboje, který je typický pro více nepolární látky.

Signály anorganických pigmentů nebyly ve spektrech modelových temper detekovány. Pozorováno bylo pouze organické barvivo indigotin, jehož signál $[C_{16}H_{10}N_2O_2+H]^+$ byl přítomen ve spektrech olejových i vaječných temper viz obrázek 15.

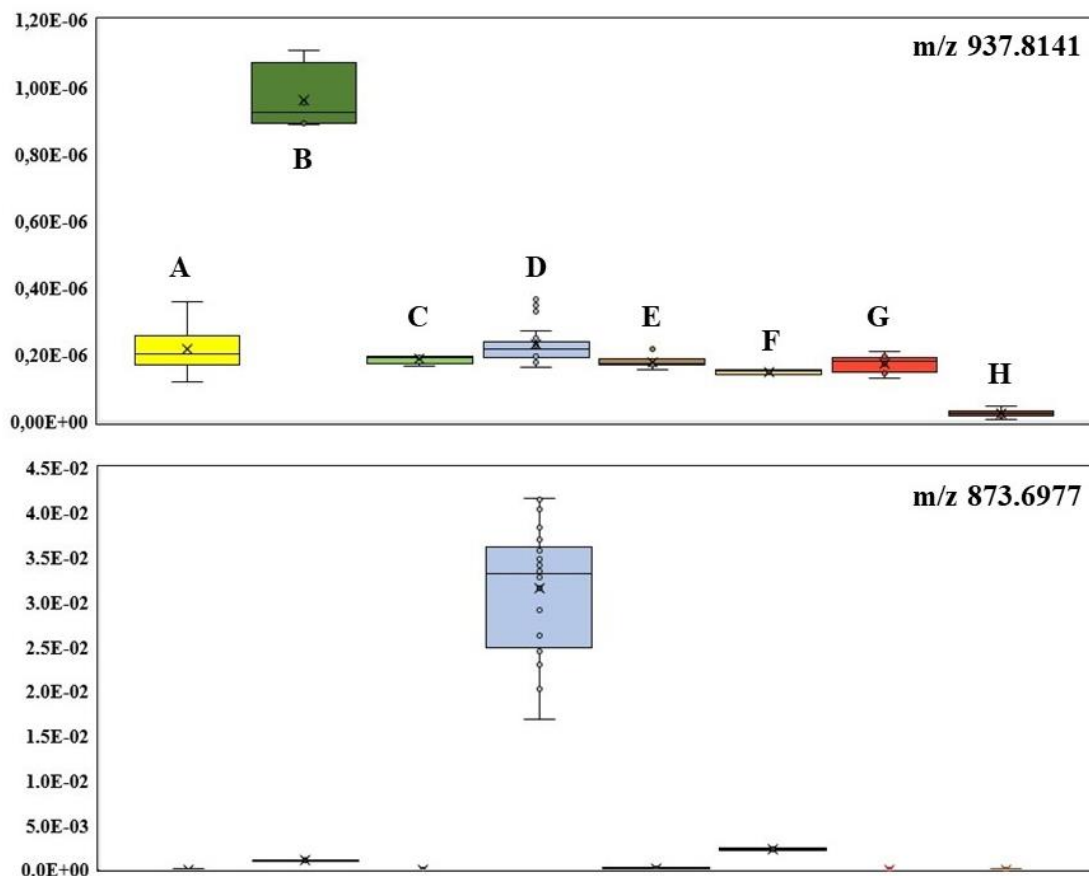


Obrázek 15: Signál indigotinu v extraktu olejové temperry (A), vaječné temperry (B) v čase T3

Ze Score plotu PCA uvedeného na obrázku 16 je patrné, že ASAP-MS metoda je schopna odlišit nativní oleje na základě jejich charakteristických spekter. Markery jednotlivých olejů byly vyhledávány pomocí diskriminační analýzy s využitím ortogonálních projekcí do latentních struktur (jinak též diskriminační analýzou s ortogonální částečnou metodou nejmenších čtverců, orthogonal partial least squares method discriminant analysis; OPLS-DA). Intenzity vybraných markerů ve spektrech byly dohledány pomocí SW Markerlynx 4.1. Nalezené intenzity jednotlivých markerů byly poděleny sumou všech signálů (TIC) a následně vyneseny do grafů ve formě box plotů. Jednotlivé oleje se liší intenzitou signálů přítomných acylglycerolů a jejich fragmentů s různým počtem uhlíků a dvojných vazeb v řetězcích jejich VMK a v některých případech intenzitou degradačních produktů vzniklých v důsledku technologického zpracování olejů. U hřebíčkového oleje byl detekován marker m/z 165.0923 ($C_{10}H_{13}O_2^+$, dtm 0.7 mDa) odpovídající na základě přesné monoizotopické hmotnosti protonované molekule eugenolu. Je vhodné uvést, že nalezené markery nejsou výlučně charakteristické pro jednotlivé oleje, ale liší se mezi oleji významně svou intenzitou. Příklad markeru pro konopný a lněný olej je uveden na obrázku 17.



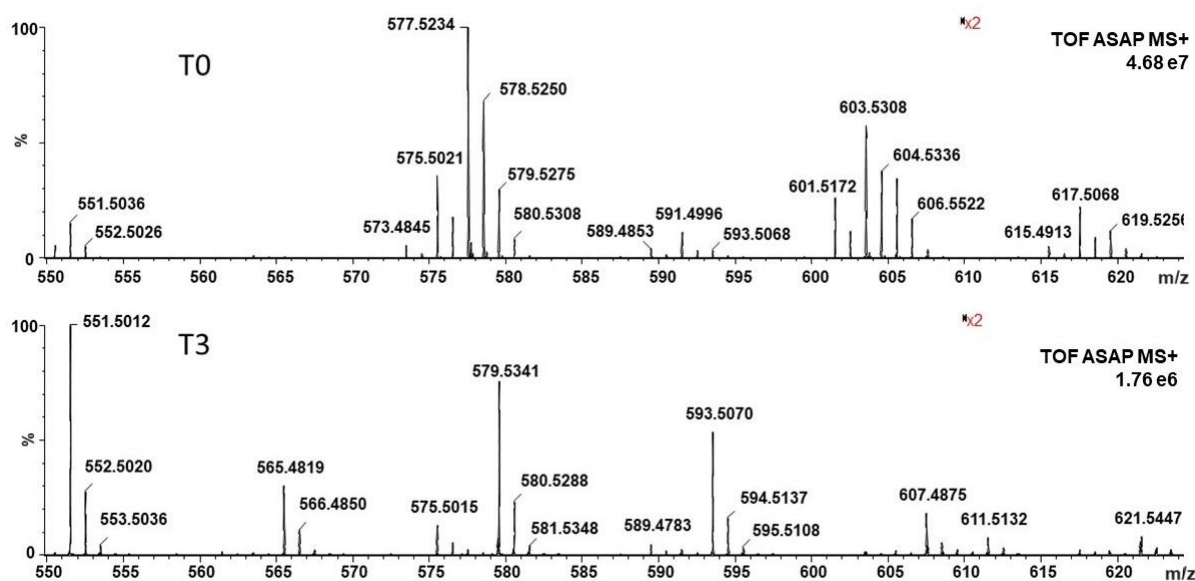
Obrázek 16: Score plot PCA dat z ASAP-MS analýz studovaných rostlinných olejů (lněné oleje bělené jsou symbolizovány červeným čtverečkem)



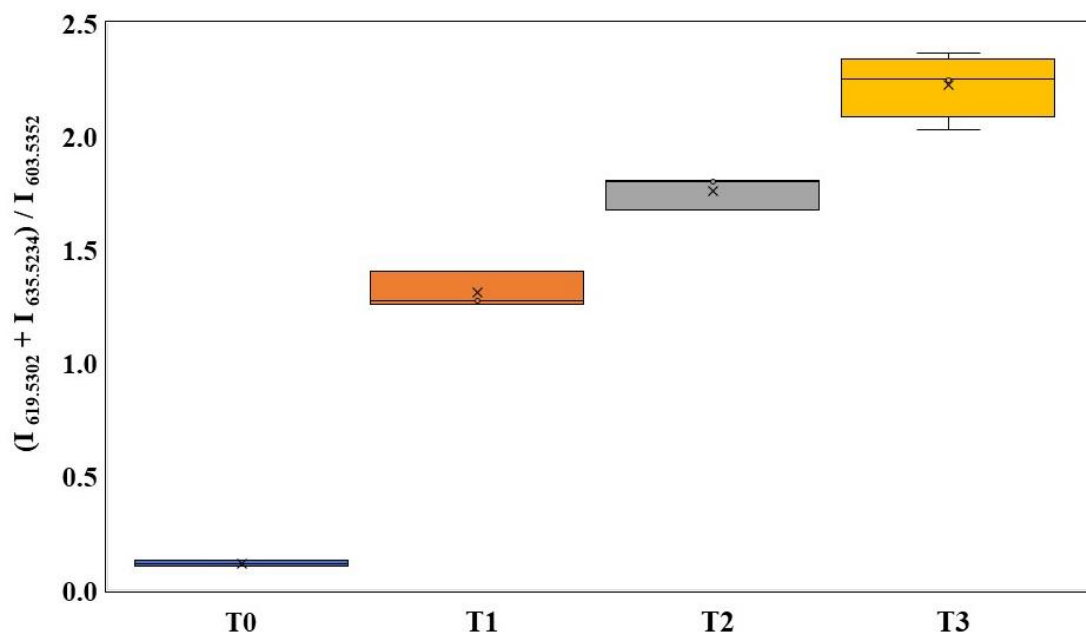
Obrázek 17: Příklad markeru konopného oleje m/z 937.8141 ($C_{61}H_{109}O_6^+$, $dtm -8.3$ mDa) a lněného oleje m/z 873.6977 ($C_{57}H_{93}O_6^+$, $dtm 0.5$ mDa); Safforový olej (A), konopný olej (B), olivový olej (C), lněný olej (D), ořechový olej (E), ořechový zahuštěný (F), makový olej (G), hřebíčkový olej (H)

Po ověření využitelnosti metody pro odlišení vzorků s rozdílnou kompozicí acylglycerolů (tj. různých typů olejů) bylo dalším cílem odlišit uměle stařené vzorky vaječných a olejových temper. Příprava vzorků temper je popsána v kapitole 4.1.3.

V prvním kroku byla posouzena vhodnost ASAP-IMS-MS metody pro sledování degradačních procesů. Jednotlivé vzorky byly extrahovány a měřeny ve čtyřech časech staření od čerstvých (zaschnutých) vzorků (T0), po vzorky stařené 3, 6 a 9 týdnů v testovací komoře přístroje Solarbox označené jako T1, T2 a T3. Ve spektrech byly jasně patrné změny, které probíhaly během procesu stárnutí modelových vzorků temper. Jednalo se o pokles signálů reprezentujících acylglyceroly s mastnými kyselinami s vyšším stupněm nenasycenosti např. signály s m/z 573.4845, 575.5021 nebo 577.5234 odpovídající diacylglycerolům se složením $C_{16:0}C_{18:3}$, $C_{16:0}C_{18:2}$, $C_{16:0}C_{18:1}$. Rozdíly v oblasti m/z 550–621 mezi spektry získanými v čase T0 a T3 jsou demonstrovány na obrázku 18. Pozorován byl rovněž zvyšující se poměr signálů oxidačních produktů k signálu odpovídajícímu jejich intaktní molekule. Příkladem potenciálně využitelným pro sledování rozsahu oxidačního stárnutí je poměr oxidovaných diacylglycerolů (m/z 603.5352+2·15.9949 ($C_{39}H_{71}O_4^+$ + 2O) a m/z 603.5352+15.9949 ($C_{39}H_{71}O_4^+$ + O)) ku signálu jejich intaktní molekuly (m/z 603.5352, ($C_{39}H_{71}O_4^+$)) viz obrázek 19. Tento uvedený trend byl lépe patrný u vzorků vaječných temper v porovnání s olejovými temperami. Další pozorovanou změnou mezi časy staření T0 a T3 byla rozsáhlá hydrolyza triacylglycerolů na nízemolekulární produkty.

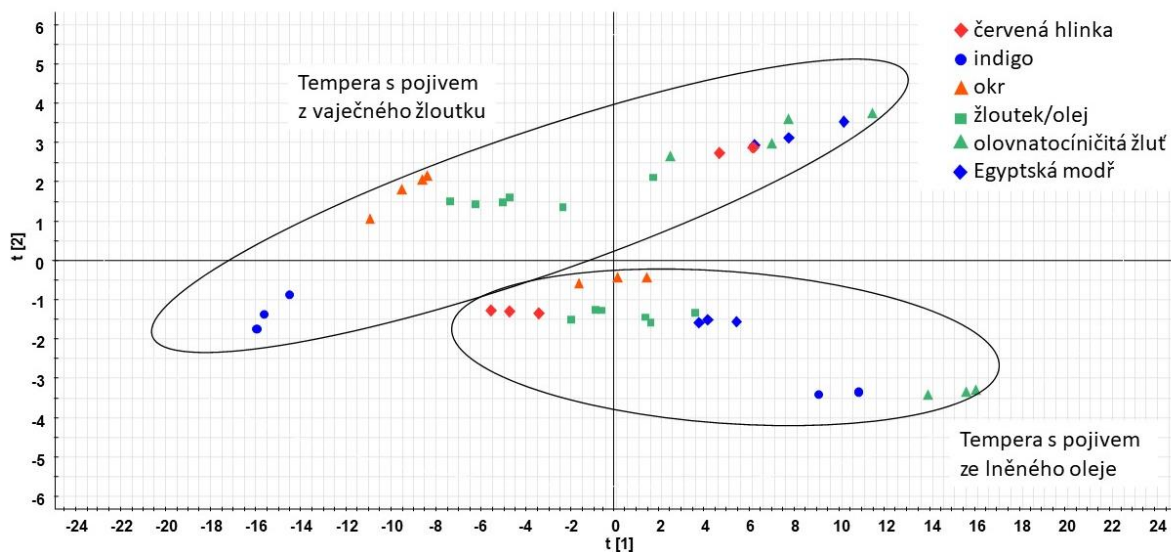


Obrázek 18: Příklad spektra vaječné tempery olovnato-cínčité žluti v čase T0 a T3



Obrázek 19: Oxidace diacylglycerolu $C_{39}H_{71}O_4^+$ v průběhu staření modelového vzorku vaječné tempery, (intenzita signálů m/z 619.5276 a 635.5234 podělena intenzitou intaktního acylglycerolu o m/z 603.5352; T0 nestářený vzorek, T1 stařený 3 týdny, T2 stařený 6 týdnů, T3 stařený 9 týdnů)

Celkový rozdíl v chemické kompozici modelových vzorků temper v čase T3 je patrný ze Score plotu PCA na obrázku 20. Data byla při tomto experimentu před statistickou analýzou filtrována tak, aby do analýzy vstupovaly jen látky s rozdílem mezi nominální a přesnou hodnotou m/z (mass defect) v rozmezí 0.11–0.57. Cílem tohoto kroku bylo zajistit, aby dataset korespondoval pouze s významnými komponentami vzorků a nebyl příliš zatížen signály pozadí. Z důvodu vysokých rozdílů mezi intenzitami řady signálů v jednotlivých vzorcích byla navíc zvolena logaritmická transformace dat, která tyto rozdíly tlumila a dovolila vyváženě popsat strukturu celého datasetu. Pro srovnání je na obrázku 4P uveden score plot PCA nefiltrovaných dat z extrahovaných vzorků bez logaritmické transformace, na obrázku 5P score plot PCA nefiltrovaných dat z extrahovaných vzorků s logaritmické transformací a na obrázku 6P poté score plot PCA filtrovaných dat z extrahovaných vzorků bez logaritmické transformace.



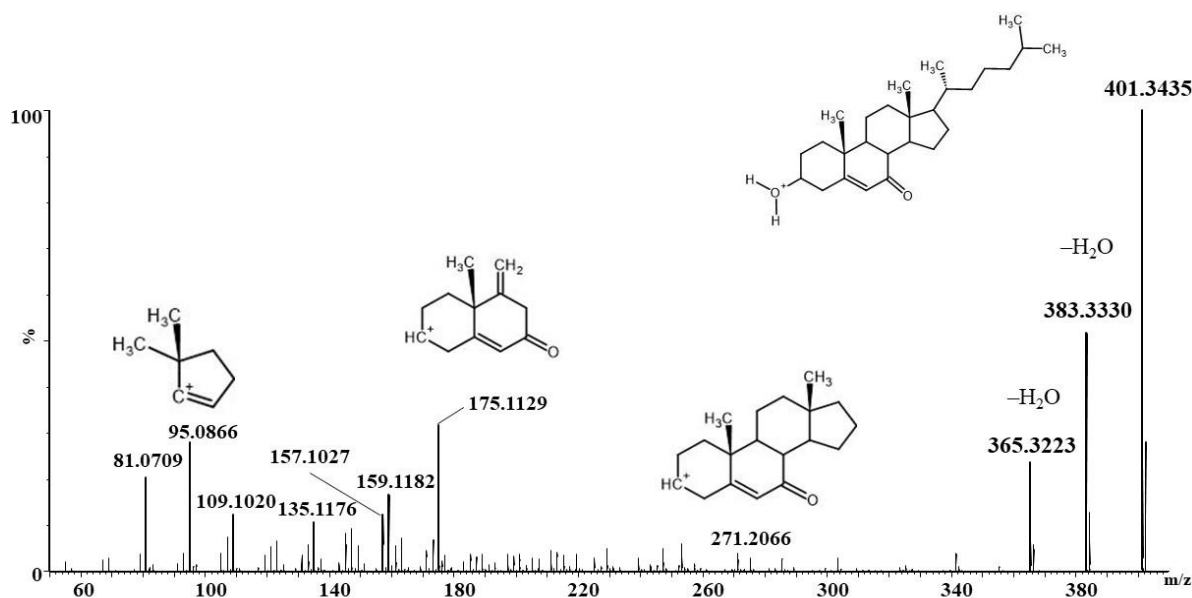
Obrázek 20: Score plot PCA dat získaných ASAP-IMS-MS analýzou stařených modelových vzorků vaječných a olejových temper v čase T3

Z uvedeného score plotu PCA na obrázku 20 jsou patrné rozdíly mezi oběma typy pojiva, a navíc částečná separace jednotlivých pigmentů v rámci daných pojiv. To může souviset s rozdílnou rychlostí stárnutí pojiv v přítomnosti různých anorganických iontů pocházejících z pigmentů [163, 164]. Některé komplexy kovů (např. Cu a Pb) mohou v přítomnosti UV záření podpořit vznik reaktivního singletového kyslíku, který díky své vysoké elektrofilitě přímo reaguje s dvojnou vazbou VMK, čímž dochází ke vzniku hydroperoxidů a urychlení procesu degradace [8, 10].

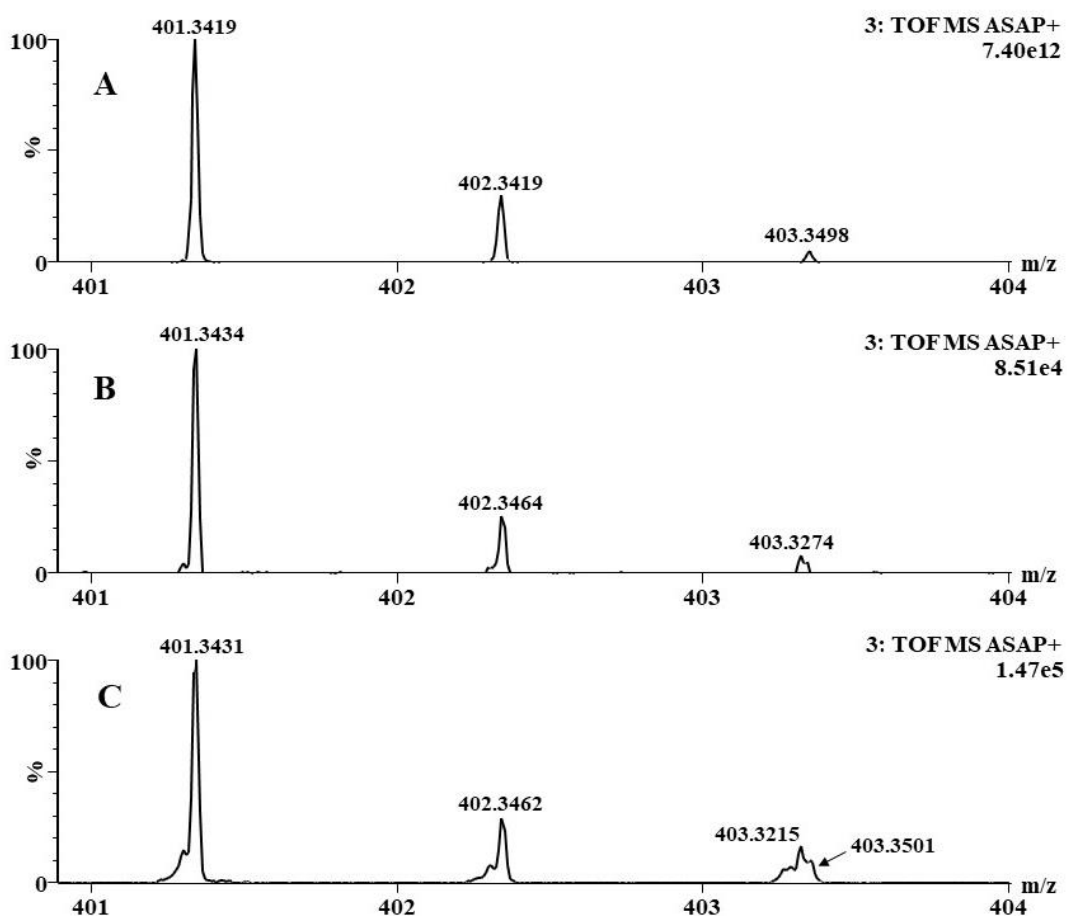
Standardně je v literatuře vaječné pojivo jednoznačně identifikováno na základě profilu proteinů a přítomnosti cholesterolu a jeho degradačních produktů [165, 166]. Cholesterol představuje za normálních podmínek poměrně stabilní molekulu. Vlivem ultrafialového záření však může docházet k fotooxidaci molekul cholesterolu na oxidační produkty, obecně známé jako oxysteroly, obsahující oproti molekule cholesterolu polární skupinu jako je např. karbonylová, hydroxylová nebo karboxylová skupina. Vedle fotooxidace může být oxidace indukována i vyšší teplotou a enzymy, pokud jsou v materiálu přítomny. Oxidace probíhá přes tvorbu reaktivních hydroperoxidů, které jsou nestabilní, a tak se přeměňují na některý z mnoha degradačních produktů [167]. Ionizace APCI se ukázala být vhodná pro analýzu všech oxidačních produktů cholesterolu [168] a rovněž metoda ASAP-MS byla již využita ve studiích pro analýzu esterů anabolických steroidů a ženských pohlavních hormonů i výše zmíněného cholesterolu [129,146]. Jako další markery vaječného pojiva je možné uvést hexadekanonitril a oktadekanonitril, které již byly popsány v Py-GC/MS spektrech [169]. Spojené techniky jsou,

jak již bylo uvedeno, časově náročné a vyžadují využití nákladných materiálů. Proto je vhodné vyvíjet i rychlé metody jako je např. analýza uvolněných plynů s hmotnostně spektrometrickou detekcí (EGA/MS), DTMS nebo právě ASAP-MS, které mohou poskytnout informaci rychle a charakterizovat využitě materiály před náročnějšími separačními technikami, které pak mohou být cíleněji využity.

V ASAP-IMS-MS spektrech byl nejvýznamnějším rozdílem mezi vaječným a olejovým pojivem signál m/z 401.3435, odpovídající molekulovému složení $C_{27}H_{45}O_2^+$ (dtm 1.5 mDa). Tento signál byl na základě přesné monoizotopické hmotnosti, MS/MS experimentu viz obrázek 21 a sledování izotopového profilu viz obrázek 22 přiřazen molekule oxidovaného cholesterolu, pravděpodobně 7-ketocholesterolu. MS/MS spektrum bylo ve shodě s publikací zaměřenou na studium fragmentačních cest vybraných oxidovaných produktů cholesterolu a struktury navržených fragmentů jsou uvedeny na obrázku 21 [168]. Spektrum z extraktu modelového vzorku bylo zatíženo interferencí zejména na signálu druhého izotopického píku, kterou se podařilo významně eliminovat pomocí iontové mobility viz obrázek 22 B, C. Mobilitní separaci však dochází k určitému snížení citlivosti, což se projevuje zejména na třetím izotopickém píku.

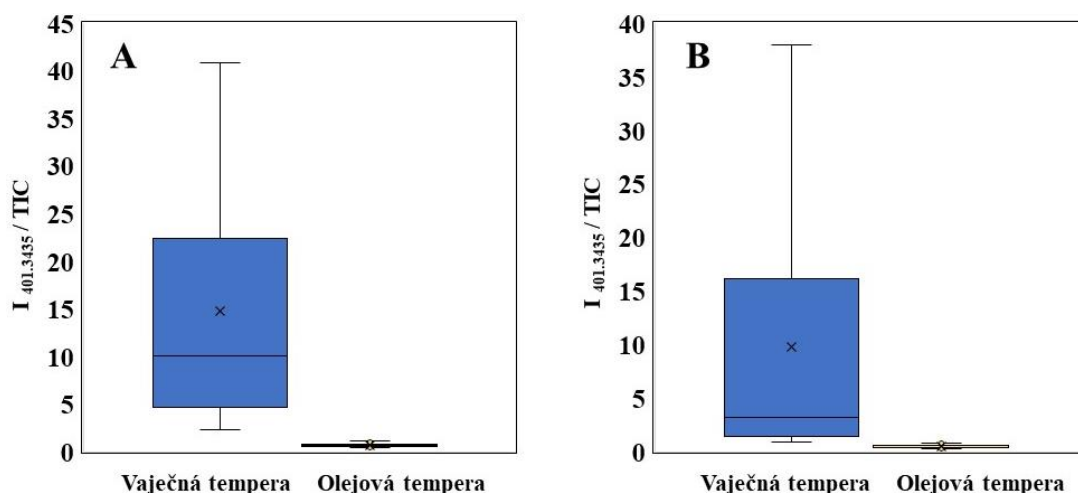


Obrázek 21: MS/MS spektrum markeru m/z 401.3435 (kolizní energie: 35 V) s návrhem struktur vznikajících fragmentů



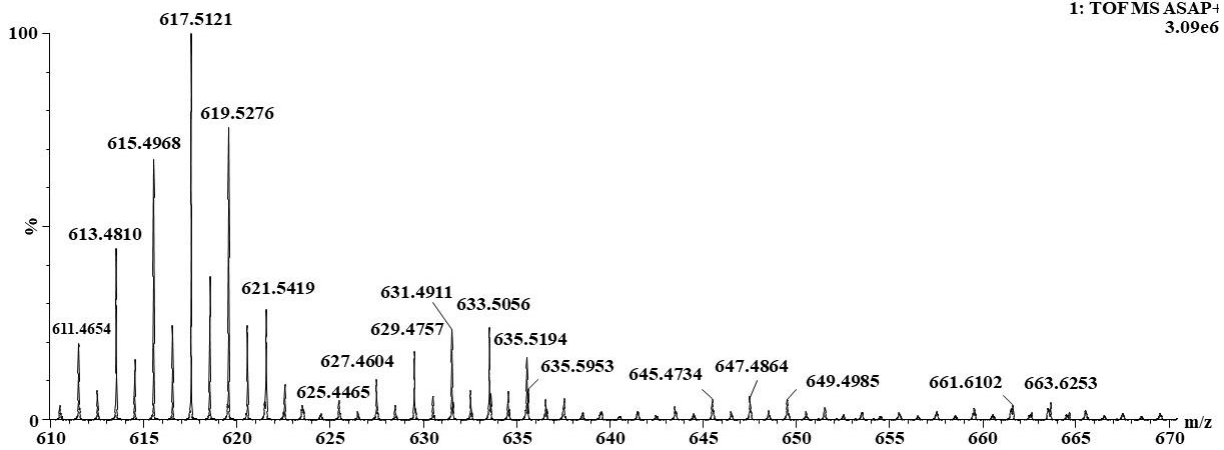
Obrázek 22: Izotopový model pro molekulární vzorec $C_{27}H_{45}O_2^+$ (A), izotopový profil $C_{27}H_{45}O_2^+$ v modelovém vzorku vaječné tempery ve směsi s egyptskou modří po odseparování nečistoty pomocí IMS (B), bez IMS separace (C)

Intenzita signálu m/z 401.3435 normalizovaná vůči sumě veškerých vybraných markerů byla významně vyšší ve všech vzorcích obsahujících vaječný žloutek jako pojivo oproti vzorkům olejových temper viz obrázek 23 A, B. To potvrzuje jeho praktickou využitelnost jako markeru pojiv obsahujících vejce. Signál cholesterolu byl v získaných spektrech rovněž detekován, ale tato molekula představuje velmi běžnou chemikálii, která neprokázala v této studii potenciál pro klasifikaci pojiva.

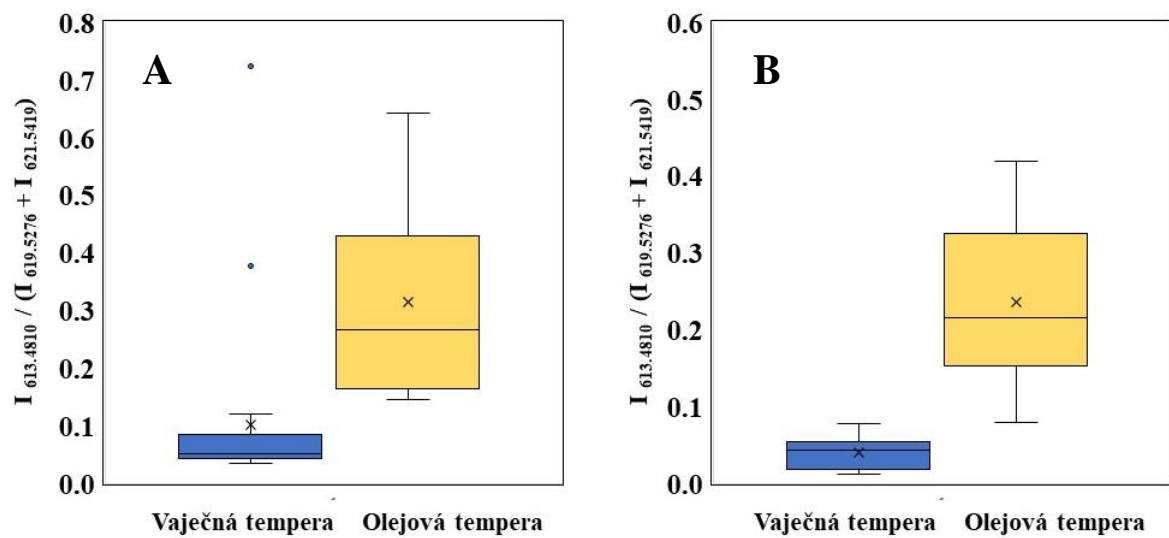


Obrázek 23: Marker získaný jako normalizovaný signál iontu s m/z 401.3435 ($I_{401.3435}/TIC$) při měření extraktů (A) a při přímém měření bez extrakce (B)

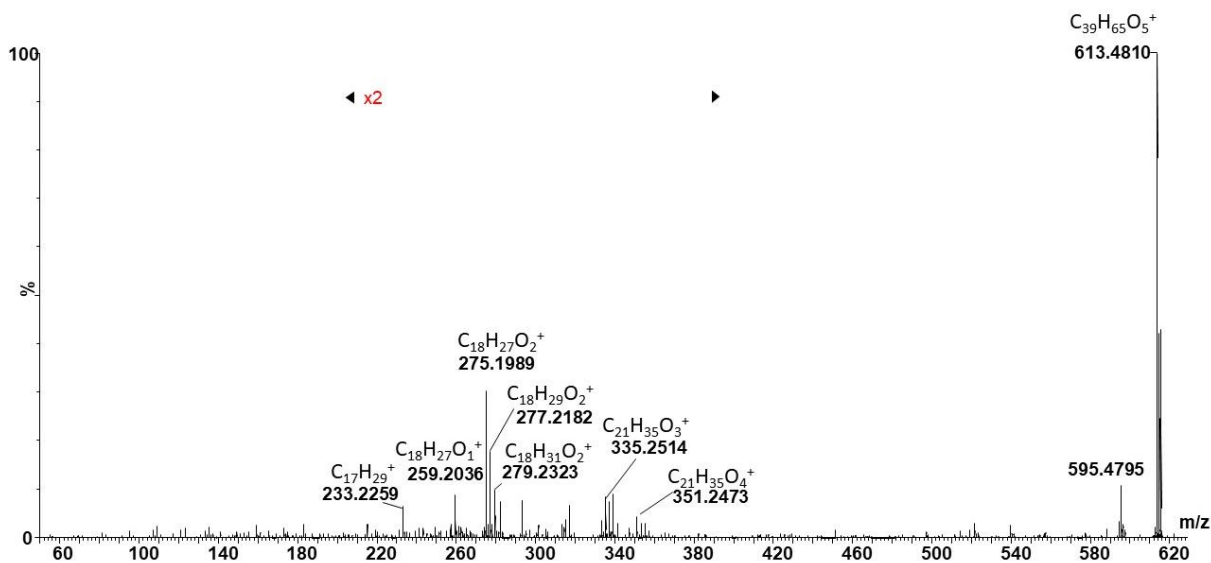
Pro sledování degradačních procesů byla zajímavá zejména oblast spekter v rozsahu m/z 600–650, ve které se nacházely i signály oxidovaných diacylglycerolů. Příklad MS spektra ukazujícího tento hmotnostní rozsah je uveden na obrázku 24. Zde jsou dobře patrné signály s m/z 613.4810, 619.5276 a 621.5419. Z intenzit těchto signálů je možno získat kombinovaný marker reprezentovaný boxplotem na obrázku 25 A, B. Tento marker byl navržen na základě úvahy, že veškeré vysychavé oleje (zejména pak lněný olej) obsahují vyšší množství polyneenasycených VMK než vaječný žloutek [170] a je vypočítán jako podíl signálu s m/z 613.4810 ($C_{39}H_{65}O_5^+$, dtm -2.2 mDa) a sumy signálů s m/z 619.5276 ($C_{39}H_{71}O_5^+$, -2.6 mDa) a 621.5419 ($C_{39}H_{73}O_5^+$, -3.9 mDa). Z boxplotu na obrázku 25 A, B je poté patrné, že tento poměr je významně vyšší pro olejovou temperu. MS/MS spektrum iontu s m/z 613.4810 je uvedeno na obrázku 26. Ze spektra je patrné, že dominantně jsou zastoupeny acyliové ionty oxidované kyseliny linolenové a možné izomerní formy s m/z 277.2182 a 275.1989. Fragment s m/z 335.2514 poté odpovídá fragmentu monoacylglycerolu substituovaného kyselinou linolenovou a m/z 351.2473 jeho oxidované formě. MS/MS spektra signálů 619.5276 a 621.5419 jsou uvedena v příloze na obrázcích 7P–8P). Ve spektru signálu m/z 619.5276 jsou významně zastoupeny acyliové ionty odpovídající oxidované kyselině olejové m/z 281.2436 a m/z 279.2329 (a možným izomerním formám). Vedle těchto acyliových iontů je velmi intenzivní signál m/z 341.3063 odpovídající fragmentu monostearyl glycerolu. V MS/MS spektru signálu m/z 621.5419 jsou nejintenzivnější acyliové ionty s m/z 281.2477 odpovídající oxidované kyselině olejové a s m/z 267.2701 odpovídající kyselině stearové. Rovněž jsou detekované signály m/z 339.2844 a 341.3060 odpovídající monooleyl glycerolu a monostearyl glycerolu.



Obrázek 24: Oblast oxidovaných diacylglycerolů v olovnato-cínčité temperě v čase T3



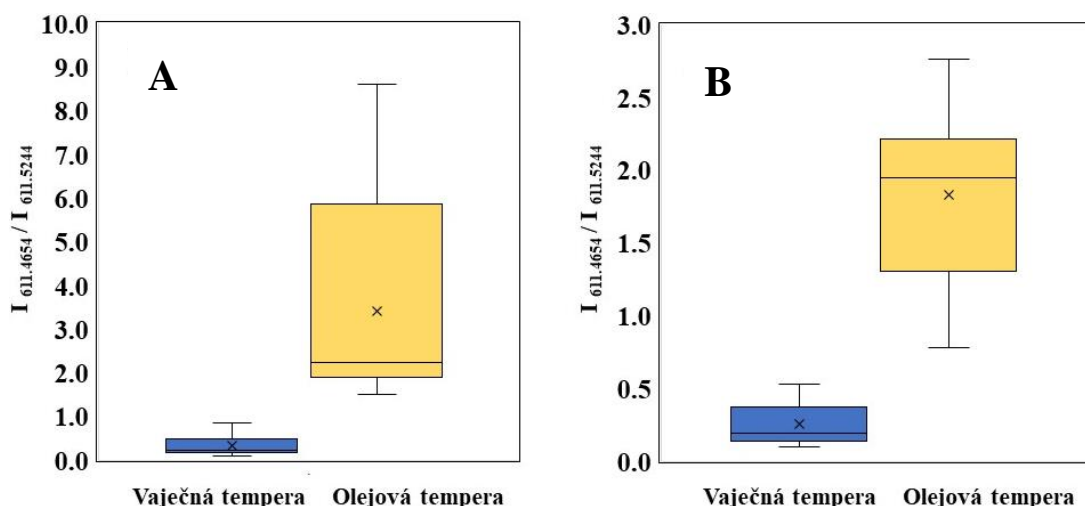
Obrázek 25: Kombinovaný marker vypočítaný z intenzit signálů s m/z 613.4810, 619.5276, 621.5419 ($I_{613.4810} / (I_{619.5276} + I_{621.5419})$) v extraktech (A) a při přímém měření materiálu bez extrakce (B)



Obrázek 26: MS/MS spektrum m/z 613.4810, kolizní energie na transferu 30 V

Ve stejné oblasti spektra byl nalezen signál s m/z 611.4654 (–2.2 mDa) a přilehlý signál m/z 611.5244 (–0.7 mDa), které odpovídají elementárnímu složení $C_{39}H_{63}O_5^+$ a $C_{37}H_{71}O_6^+$. Poměr těchto signálů byl vyšší pro všechny modelové vzorky olejových temper, jak ukazuje obrázek 27 A, B (MS/MS spektra jsou uvedena v příloze na obrázku 9P–10P). V MS/MS spektru iontu s m/z 611.4654 jsou nejintenzivnější signály fragmentů s m/z 275.2029 a 277.2173 odpovídající oxidované kyselině linolenové (a možným izomerním formám). Dále jsou patrné fragmenty m/z 335.2609 a 337.2734, které odpovídají fragmentům monoacylglycerolů s navázanou kyselinou linolenovou a linolovou. Ve fragmentačním MS spektru signálu m/z 611.5244 je dominantní signál s m/z 593.5175 vznikající po ztrátě molekuly vody z iontu prekursoru. Dále jsou přítomny signály s m/z 313.2762 odpovídající monopalmitylglycerolu a m/z 355.2859 odpovídající oxidovanému monooleylglycerolu. Z acyliových iontů je patrný signál s m/z 281.2553 odpovídající oxidované kyselině olejové. Dominantním acyliovým iontem je i m/z 263.2389 odpovídající kyselině linolové. Je však možné, že se jedná o fragment interferující z „přilehlého“ iontu s m/z 611.4654.

Oba kombinované markery vypočítané z intenzit signálů s m/z 613.4810, 619.5276, 621.5419, 611.4654 a 611.5244 tedy $I_{613.4810}/(I_{619.5276}+I_{621.5419})$ a $I_{611.4654}/I_{611.5244}$ jsou potenciálně dobře využitelnými indikátory přítomnosti olejových poživ, například při odlišení olejových a vaječných poživ. Zjištění těchto markerů navrhovanou metodou však vyžaduje hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením. Možnosti nasazení metody v památkářské praxi budou logicky limitovány obsahem reziduí poživ v materiálu, velikostí dostupného vzorku i jeho správným odběrem.



Obrázek 27: Kombinovaný marker vypočítaný z intenzit signálů s m/z 611.4654 a 611.5244 ($I_{611.4654}/I_{611.5244}$) v extraktech (A) a při přímém měření bez extrakce (B)

Obdobných výsledků bylo dosaženo i přímým měřením, kdy byl prášek připravený ze vzorku deponován na kapiláru. Přebytek vzorku byl z kapiláry odstraněn Kimtech ubrouskem, aby nedošlo ke kontaminaci iontového zdroje odpadnutím přebytečného vzorku z povrchu kapiláry. Data získaná přímým měřením jsou porovnatelná s daty z měření extraktů, což je patrné z obrázků 23, 25 a 27. Navíc při přímém měření nebyly v případě markeru demonstrovaného boxplotem na obrázku 25 přítomny odlehlé výsledky jako v případě měření extraktů. Odlehlé výsledky byly způsobeny nízkou intenzitou vybraných signálů ve vzorcích olejové tempery s indigem. Je tedy zřejmé, že přímé měření zvyšuje citlivost metody. Úprava vzorku při přímém měření je vypuštěním extrakčního kroku snížena na minimum.

ASAP-IMS-MS spektra v porovnání s dříve publikovanými výsledky z MALDI-MS analýzy neobsahují signály polárnějších látek jako jsou fosfolipidy a proteiny, které jsou pro vaječné pojivo charakteristické. MALDI-MS metoda navíc dokáže tyto dvě skupiny látek simultánně sledovat během jednoho měření. Na druhou stranu navržená MALDI-MS metoda zahrnuje extrakci s malými výtěžky cholesterolu. Navíc signály cholesterolu a oxisterolů byly ve spektru ovlivněny interferenty z matrice [104]. Obě metody mají tedy výhody i nevýhody a jsou do určité míry komplementární.

Následně byla vyvinutá ASAP-IMS-MS metoda aplikována na autentický vzorek z mikroděru nástěnné malby v kapli státního hradu a zámku Bečov nad Teplou v rámci jejího průzkumu před restaurátorským zásahem (Východní stěna, výjev Smrti Panny Marie, červenohnědá svatozář, pravá figura ve spodní řadě postav, odběr v prasklině; vzorek DJ 17). Pro měření reálného vzorku byl zvolen přímý způsob měření bez extrakce tak, aby bylo

docíleno co nejvyšší citlivosti a spotřeba autentického vzorku byla minimalizována. Fragment nástěnné malby byl rozetřen v achátové třecí misce. Skleněná kapilára byla otírána o rozdrcený vzorek a následně podrobena analýze. Signály diagnostických markerů však nebyly detekovány. Ve spektru byly přítomny pouze signály běžných stabilnějších diacylglycerolů jako jsou například $C_{16:0}C_{16:0}$, $C_{16:0}C_{18:0}$, $C_{16:0}C_{18:1}$. Signál 7-ketocholesterolu nepřevyšoval interference z pozadí. Kromě diacylglycerolů byly ve spektru přítomny signály s m/z 561.5635, 563.5726 a 565.5906, které na základě přesných monoizotopických hmotností odpovídají fragmentům esterů, přítomným ve včelím vosku (MS spektra reálného vzorku a včelího vosku jsou uvedena na obrázku 11P v příloze). Detailní interpretace těchto struktur je předmětem následujícího výzkumu přesahujícího rámec této práce.

4.1.7 Závěr

V předložené studii bylo optimalizováno nastavení ASAP ionizace pro analýzu acylglycerolů obsažených v rostlinných olejích. Optimalizace zahrnovala nastavení teploty dusíku, rychlosti průtoku dusíku a výbojového proudu v iontovém zdroji. Optimalizovaná ionizační metoda byla aplikována na analýzu sedmi typů rostlinných olejů. Získaná spektra byla zpracována pomocí PCA a OPLS-DA. Na základě získaných výsledků bylo možné nalézt látky, v jejichž obsahu se tyto oleje významně odlišují. Metoda ASAP-MS tedy umožnila rozlišení studovaných olejů a získaná data mohou být použita pro jejich klasifikaci v různých oblastech včetně materiálových výzkumů v památkové péči.

Hmotnostní spektrometrie s ionizací ASAP rozšířená o post ionizační separaci pomocí iontové mobility byla aplikována na modelové vzorky temper připravených ve dvou typech lipidických pojiv, vaječném žloutku a směsi lněných olejů nanesených na vápennou omítku. Navržené experimenty zahrnují interakci temper s omítkou, a mají tak blíže k reálným podmínkám nástěnných maleb, než je tomu u dříve publikovaných studií, kde bylo staření temper a pojiv provedeno na inertních sklech [18, 104]. Vzorky byly analyzovány bez urychleného staření a následně po 3, 6 a 9 týdnech staření v testovací komoře přístroje Solarbox, kde byly kontrolovaně vystaveny UV záření, teplotě 30 °C a vlhkosti 75 %. Chemická kompozice obou pojiv byla v průběhu staření významně změněna procesem oxidace a hydrolýzy intaktních acylglycerolů. Získaná spektra byla zpracována statistickou metodou PCA na základě jejichž výsledků byly vyhledány látky, které tato pojiva odlišily i v degradovaném stavu. Významným markerem umožňujícím odlišení vaječné tempery od olejové byl oxidovaný cholesterol (pravděpodobně 7-ketocholesterol), který poskytl signál

m/z 401.3435. Dále byly nalezeny dva kombinované markery se strukturou oxidovaných diacylglycerolů, které byly významně zvýšené v olejových směsích oproti vaječným $I_{613.4810} / (I_{619.5276} + I_{621.5419})$ a $I_{611.4654} / I_{611.5244}$. Porovnání absolutních signálů markerů poskytlo, i vzhledem k poměrně významnému rozptylu dat, jen velmi omezené možnosti rozlišení stařených lipidických pojiv. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo, pokud se použily normalizované signály vztahované na TIC nebo na vhodně volenou sumu vybraných signálů. Tímto přístupem byla podstatně zvýšena statistická významnost a robustnost použití navrženého markeru.

Následně byla metoda aplikována na analýzu reálného vzorku. Kvůli množství a rozměru vzorku byla zvolena přímá metoda měření bez extrakce. V reálném vzorku však nebyly sledované markery detekovány. Příčinou je patrně velmi nízká koncentrace reziduí pojiv nebo vyšší stupeň degradace pojiva zahrnující i rozklad výše popisovaných markerů. Autentický vzorek byl odebrán z nástěnné malby, umístěné v prostorách hradu Bečov (východní Čechy). Malba byla po staletí vystavena ambientním podmínkám, které je náročné v laboratorních podmínkách simulovat. V reálném vzorku byly detekovány pouze signály stabilních diacylglycerolů a signály pravděpodobně odpovídající reziduím vosku.

Výsledky této studie byly prezentovány na konferenci České společnosti pro hmotnostní spektrometrii 2019 a Chiralanu 2022 [171, 172]. Výsledky jsou rovněž podkladem k publikování v rámci chystané komplexní studie zahrnující výsledky analýz ASAP-IMS-MS ASAP-cIMS-MS a GC/MS (P. Krejčí, K. Slavíková, J. Nádvorníková, P. Barták, K. Lemr, P. Bednář, v přípravě).

4.2 Chemická analýza historických keramických glazur

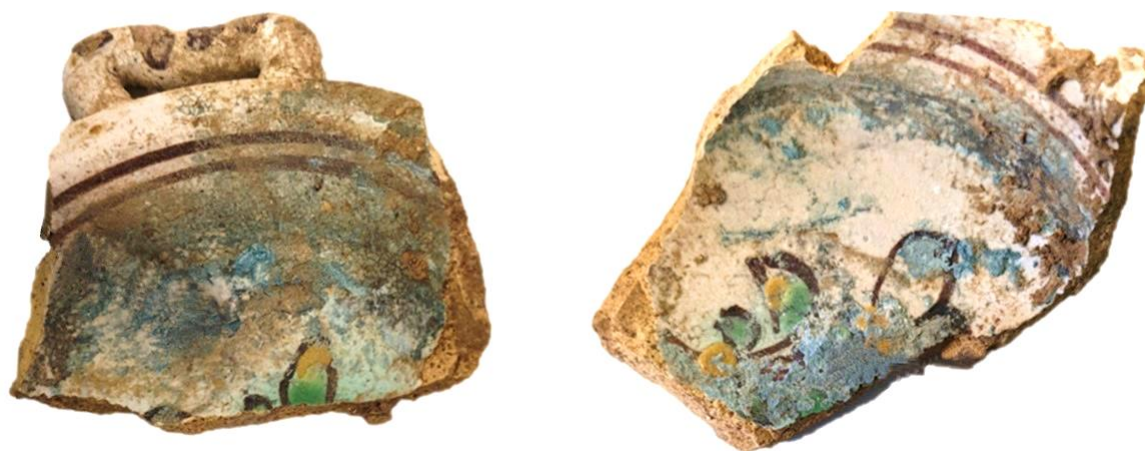
4.2.1 Význam a metodické aspekty studie v kontextu historického výzkumu a památkové péče

Během archeologického průzkumu lokality Vodní ulice (tehdejší Wassergrasse) v Prostějově se archeologům podařilo v roce 2016 nalézt dvě střepoviště, která nasvědčovala přítomnosti keramických výrobků. Nalezeno bylo velké množství artefaktů od hrnčírských pomůcek až po různé fragmenty meziproductů a hotových výrobků typů fajáns, jak ukazuje obrázek 28. Nálezy byly datovány na přelom 18. a 19. století.

Zcela unikátním nálezem byl zlomek kameninové misky se zbytky směsi pro bílou polevu a dva fragmenty nádob se stopami pigmentů modré a růžové barvy (viz obrázky 29 a 30). Podle cechovních knih zmíněných v publikaci *Moravská lidová keramika* bylo možné dohledat majitele původně zde stojícího domku, kterým byl toufarský mistr Jan Skřivánek. Mimo něj pracovalo v Prostějově na přelomu 18. a 19. století nejméně osm dalších toufarských mistrů. Kvůli vysoké konkurenci drželi mistři své technologické postupy a recepty na přípravu pigmentů, polev a dalších směsí v tajnosti [173, 174].



Obrázek 28: Archeologické nálezy z dílny toufarského mistra Jana Skřivánka [174]



Obrázek 29: Kameninový střep s modrou směsí [175]



Obrázek 30: Odebrané vzorky modré, bezbarvé a růžové směsi

Chemická charakterizace keramických nálezů představuje náročný úkol, neboť je k dispozici obvykle pouze malé množství unikátního vzorku se složitou maticí. Jednotlivé komponenty vzorku jsou navíc nenávratně transformovány procesem výpalu. V literatuře je možné nalézt celou řadu rozsáhlých studií charakterizující keramické nálezy [176–185]. Cílem uvedených studií byla charakterizace keramické matrice, identifikace pigmentů a aditiv glazury, rekonstrukce výrobního procesu a určení původu nálezu.

Pro prvkovou charakterizaci se v materiálovém průzkumu obvykle využívá SEM-EDX a rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF). Nevýhodou těchto metod je jejich nízká citlivost. Pro detekci stopových prvků s vysokou citlivostí je výhodné využít hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem. Spojení ICP-MS s laserovou ablací navíc umožňuje prostorové zobrazování (tzv. imaging), který se hojně využívá při analýze nábrusů [3, 6, 11–13]. Mimo výše zmíněné techniky se v literatuře setkáváme i s hmotnostní spektrometrií s termální ionizací [182, 183], hmotnostní spektrometrií sekundárních iontů [186], spektroskopií laserem buzeného plazmatu [187], neutronovou aktivační analýzou nebo

metodou částicově indukované emise rentgenového a gama záření [179, 180]. Pro mineralogickou charakterizaci se využívají metody molekulární spektrometrie jako jsou Ramanova a infračervená spektrometrie [188, 189]. Doposud však nebyla publikována práce, z jejichž výsledků by mohl být rekonstruován kompletní technologický postup výroby keramických glazur, jelikož jsou k analýzám dostupné pouze finální produkty. Ve vypálených předmětech již není možné stanovit organická aditiva, která byla nenávratně přeměněna během procesu výpalu. Zaremba a kol. při analýze mísy datované do období Ptolemaiů detekovali pomocí termální analýzy CO₂ a amoniak. Autoři předpokládají, že přítomnost těchto plynů v pórech keramiky poukazuje na možné využití organických látek během výroby. Ani v tomto případě však nebylo možné identifikovat zdroj a původ organické hmoty [190].

Cílem této studie byla chemická charakterizace výše zmíněných dekoračních směsí za účelem odhalení jejich receptů a doplnění informací týkajících se technologické produkce keramiky na přelomu 18. a 19. století. Naplánovány byly analýzy anorganických i organických složek všech tří nalezených směsí. Prvkové analýzy byly realizovány metodou SEM-EDX a ICP-MS. Identifikace organických složek byla provedena metodami přímé vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie se dvěma typy ionizačních technik, a to ASAP a LDI. Identifikace modrého pigmentu byla navíc provedena metodou Ramanovy spektrometrie a FIA/ESI-MS.

4.2.2 Chemikálie a vzorky

Pro studii byly použity následující chemikálie: kyselina abietová (Lachema, Brno, ČR) a kyselina dehydroabietová (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA) pro měření referenčních MS a MS/MS spekter, aceton (HPLC čistota $\geq 99.8\%$, Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) pro přípravu suspenzí vzorků, roztok leucin enkefalinu (HPLC $\geq 95\%$, Sigma Aldrich) pro korekci naměřených spekter, kyselina chlorovodíková (Analpure, 34–37%, Analytika, Praha, Česká republika), kyselina fluorovodíková (Analpure, 48%) a kyselina dusičná (Analpure, 67–69%) pro rozklad vzorků před ICP-MS analýzou. Methanol (LC-MS $\geq 99.9\%$, Honeywell), vysoce čištěná voda vyráběná v laboratoři pomocí Mili-Q systému (Merck), hexakynoželeznan železitý připravený laboratorně z hexakynoželeznanu draselného (Lach-Ner, p.a.) a hexahydrátu chloridu železitého (Lach-Ner, p.a.), hydroxid sodný (Penta, p.a., Brno, Česká republika) pro FIA/ESI-MS experimenty. Červený fosfor (Sigma Aldrich) pro kalibraci analyzátoru QqTOF Synaptu G1. Mravenčan sodný pro kalibraci QqTOF analyzátoru Synaptu G2 (připravený viz kapitola 4.1.2 Chemikálie). Včelí vosk a borovicová pryskyřice (Kremer pigmente, Německo) pro měření referenčních MS a MS/MS spekter.

Vzorky hrnčírských směsí laskavě poskytl PhDr. Pavel Fojtík z Ústavu archeologické památkové péče Brno. Vzorky pro jednotlivé analýzy byly odebrány pracovníky katedry analytické chemie.

4.2.3 Metodika

Přímá hmotnostně spektrometrická analýza organických složek vzorků

ASAP-IMS-MS a FIA/ESI-MS analýzy hrnčírských směsí byly realizovány na vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometru Synapt G2-S (Waters, Milford, MA, USA) vybaveném celou pro iontově mobilní separaci (TriWave). Detailní popis přístroje je uveden v kapitole 4.1.5 Metodika.

LDI-MS analýzy byly provedeny na vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometru Synapt G1 vybaveném hybridním QqTOF analyzátozem a vakuovým MALDI iontovým zdrojem (Waters, Milford, MA, USA). Na obou přístrojích bylo pracováno v resolution módu.

➤ **ASAP-IMS-MS:** Vzorky pro ASAP-IMS-MS analýzu byly připraveny ve formě acetonové suspenze o koncentraci $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato suspenze byla nasáta kapilární elevací do skleněné kapiláry s otevřeným koncem. Po odpaření acetonu byla připravená kapilára upevněna do ASAP sondy, instalována do iontového zdroje a podrobena analýze. Před každou analýzou vzorku bylo naměřeno spektrum kapiláry bez vzorku. Experimentální podmínky měření jsou popsány v kapitole 4.1.5 metodika pro ASAP-IMS-MS analýzu.

➤ **FIA/ESI-MS:** Tento typ ionizace byl využit pro identifikaci rozloženého modrého barviva ze vzorku modré směsi. Příprava vzorků a metodika byly převzaty ze studie [191]. Parametry ionizace byly nastaveny následovně: ionizační mód negativní, napětí na kapiláře 2.30 kV, napětí na vzorkovacím kuželu 30 V, délka analýzy 2 min, energie na Trap kolizní cele 4 V, energie na Transfer kolizní cele 2 V, teplota iontového zdroje 120 °C, teplota dusíku 250 °C, rychlost proudění dusíku $360 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$, tlak zmlžovače 6 barů, hmotnostní rozsah měřených spekter m/z 50–600, rychlost skenování 1 s, směs methanolu a vody 1:1 (v/v) byla využita jako nosná kapalina, objem nástřiku vzorku 5 μl . Z laboratorně syntetizovaného hexakynoželeznatanu železitého byl připraven standardní roztok o koncentraci $0.05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 0.04 M roztoku NaOH. Rozklad komplexu pruské modři v roztoku NaOH byl podpořen ultrazvukovou lázní po dobu 30 min. Pro rozklad barviva ze vzorku bylo naváženo 2.5 mg směsi a barvivo bylo rozloženo v 10 ml 0.04 M NaOH. Roztoky standardu i vzorku byly před analýzou desetkrát zředěny a přefiltrovány přes stříkačkový filtr. Jako slepý vzorek byl změřen 0.04 M roztok NaOH.

➤ **LDI-MS:** Vzorky směsí byly na MALDI destičku fixovány pomocí oboustranné lepicí pásky. Jako lock-mass byla využita suspenze červeného fosforu v acetonu ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) deponovaná na vybrané pozice MALDI destičky. Parametry ionizace byly nastaveny následovně: ionizační mód pozitivní i negativní, sample plate 10 V, hexapol bias 10, energie na Trap kolizní cele 6 eV, energie na Transfer kolizní cele 4 eV, energie laseru 500 (arb), průtok chladicího plynu $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, průtok kolizního plynu v Trap kolizní cele $1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, laser firing rate 200. Zaměření laseru bylo prováděno manuálně bodově.

Prvková analýza

➤ **ICP-MS:** Pro mineralizaci vzorku byl využit mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 Mega (Itálie). Před rozkladem byly vzorky manuálně rozemlety a homogenizovány. Následně bylo přibližně 20 mg vzorku rozloženo směsí HNO_3 (1 ml), HCl (3 ml) a HF (0.125 ml) za využití sedmikrovového rozkladného programu. Po rozkladu a ochlazení byly vzorky zředěny deionizovanou vodou na objem 10 ml, převedeny do PE zkumavek a uchovány v lednici při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Slepé vzorky byly připraveny ze směsi výše uvedených kyselin za stejných podmínek. ICP-MS analýzy byly provedeny na přístroji 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japonsko) vybaveném autosamplerem ASX-520, mikrokonzentrickým zmlžovačem (MicroMist), chlazenou mlžnou komorou dle Scotta a oktapólovou kolizní/reakční celou. Podmínky semikvantitativní analýzy byly nastaveny následovně: RF power 1600 W, plazmový plyn argon, průtoková rychlost plazmového plynu $15.0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, průtok pomocného plynu (argonu) $0.61 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, průtok zmlžovacího plynu (argonu) $0.36 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, průtok kolizního plynu (helium) $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Veškeré ICP-MS analýzy byly provedeny v šesti opakováních. Data byla vyhodnocena v SW MassHunter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

➤ **SEM-EDX:** Vzorky hrnčičských směsí byly naneseny na uhlíkovou fólii (tloušťka uhlíkové vrstvy 25 nm). Analýzy byly realizovány na přístroji SEM-EDX (JEOL JXA-8600). U minerálů, které bylo možné zaměřit laserem, bylo stanoveno chemické složení. V případě velmi jemně namleté růžové směsi byla zaměřena větší plocha vzorku a výsledky tak odpovídají celkovému složení směsi. Podmínky měření byly nastaveny následovně: urychlující napětí 15 kV, proud paprsku 10 nA, rozlišení paprsku 1–5 μm , délka měření 60 s. Kvantifikace výsledků byla provedena pomocí SW IdFix software (remX GmbH) a využity byly následující standardy: albit (Na), diopsid (Mg, Ca), mikrokolid (Si, Al, K), apatit (P), baryt (Ba, S), ilmenit (Ti, Fe), strontianit (Sr) od Smithsonian Institution a olovo (Pb) od Astimex scientific Ltd standards.

➤ **Ramanova spektrometrie:** Ramanova spektra byly naměřena na Ramanově mikroskopu DXR2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Parametry analýzy byly

nastaveny následovně: vlnová délka laseru 785 nm, výkon laseru 1 mW, apertura 50 μm , délka expozice 2 s, počet expozic 16. Pro vyhodnocení dat byl využit SW Omnic 9 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

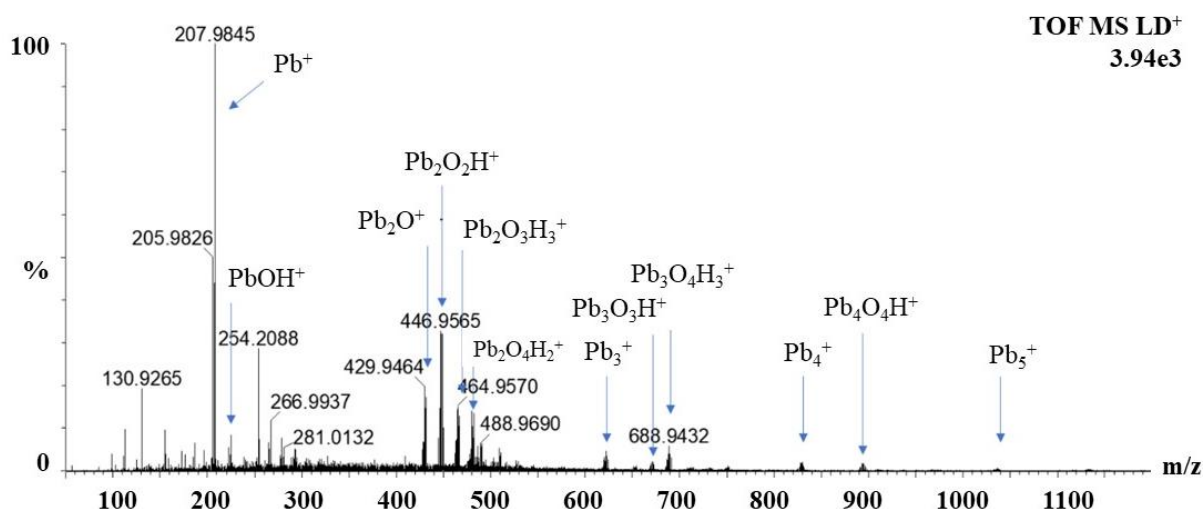
4.2.4 Výsledky a diskuse

Identifikace pigmentu způsobující růžové zbarvení dekorační směsi byla realizována metodami SEM-EDX a ICP-MS. Pomocí SEM-EDX se nepodařilo jednoznačně odhalit minerál, který byl využit pro dosažení růžového odstínu, jelikož nebylo možné v důsledku jemného namletí směsi zaměřit jednotlivé krystaly. Získané výsledky SEM-EDX a ICP-MS analýz jsou shrnuty v tabulce 9 a tabulce 10.

Jedním z nejvyžívanějších typů červených pigmentů v glazurách a směsích pro fajáns byl hematit $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, díky kterému bylo možné docílit červených až hnědých odstínů podle podmínek během výpalu keramiky. Červených odstínů bylo dosaženo při oxidačních podmínkách a teplotách vyšších než 700 $^\circ\text{C}$ [192]. Dalšími minerály, kterých bylo využíváno k dosažení červených barev byly např. kuprit Cu_2O , krokoit PbCrO_4 nebo oxid olovnato-olovičitý Pb_3O_4 [192–194]. Na základě výsledků ICP-MS i SEM-EDX připadá v úvahu, že využitým minerálem byl oxid železitý. Obsah železa byl pomocí ICP-MS stanoven na $0.50 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Měď ve formě kupritu nebo nanočástic mědi byla rovněž využívána jako zdroj červené barvy při výrobě skel [195, 196]. V takových případech byl ale obsah mědi přibližně stokrát vyšší než v růžové směsi, ve které bylo množství mědi stanovené ICP-MS $0.26 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Zvýšený obsah olova ve všech třech směsích byl způsoben pravděpodobně záměrným přidáváním minerálů olova jako tavidla než jako pigmentu. Přítomnost olova byla v barevných směsích rovněž potvrzena metodou LDI-MS. Příklad získaného spektra v pozitivním módu je uveden na obrázku 31 (pro růžovou směs) a na obrázku 12P (pro modrou směs). V LDI-MS spektrech byly v pozitivním módu detekovány signály iontů olova Pb^+ , Pb_2^+ , Pb_3^+ , Pb_4^+ a Pb_5^+ a řady iontů o složení $\text{Pb}_x\text{O}_y\text{H}_z^+$. V negativním módu byly vedle iontů o složení $\text{Pb}_x\text{O}_y\text{H}_z^-$ přítomny i ionty obsahující nejspíše uhličitanovou skupinu např. PbCO_4H^- viz obrázek 13P (pro modrou směs). Detailně je tvorba těchto iontů popsána v diplomové práci T. Závodné [175]. Tavidla byla přidávána do glazur za účelem snížení teploty tání a slinutí směsi, zvýšení lesku, hladkosti a odolnosti proti praskání. Tavidlo také napomáhalo vytvořit spojení mezi pigmentem a glazurou [178, 186, 197]. Zdrojem olova mohl být sekundární minerál galenitových rud lithargit (oxid olovnatý), který vzniká rovněž jako vedlejší produkt při tavení olovnato-stříbrných rud [198]. Nevýhodou olova jako tavidla v glazurách je jeho toxicita.

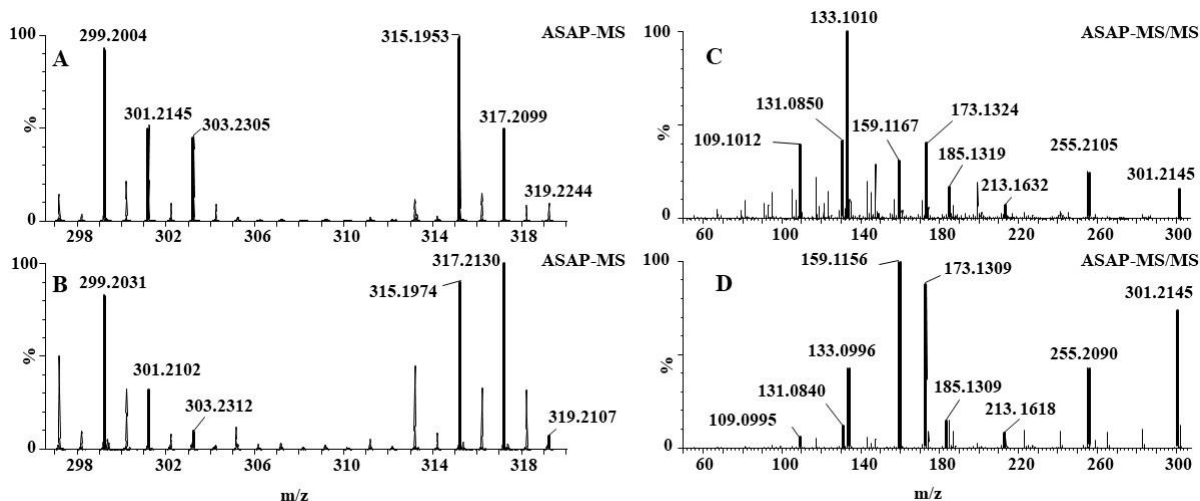
V případě kontaktu olovnaté glazury s potravinami mohlo docházet k uvolňování olova, což zvyšovalo u populace jeho příjem a mohlo vést až k intoxikaci [199].



Obrázek 31: LDI-MS spektrum růžové směsi v pozitivním módu ([200], Supplementary Material)

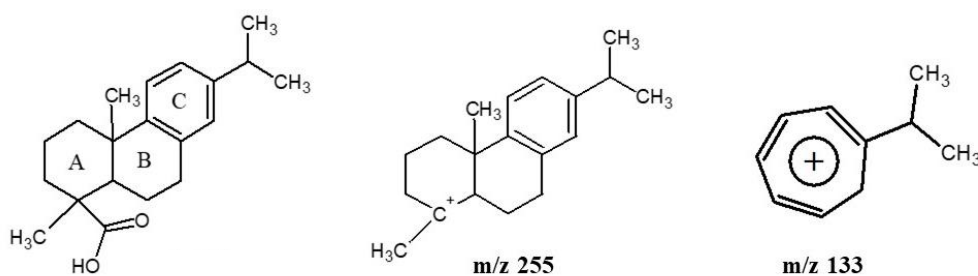
Vedle oxidů olova obsahovala růžová směs i oxidy P_2O_5 , CaO a MgO . Jejich množství však bylo nižší, než bylo nalezeno v habánské keramice z průzkumů na Moravě v lokalitě obce Strachotín [197]. V citované studii autoři na základě stanovení těchto oxidů předpokládali využití kostního popelu, nebo popelu z paroží jako kalidla. Bez využití kalidel jsou glazury po výpalu spíše průhledné.

Analýza organických komponent pomocí ASAP-IMS-MS odhalila přítomnost tří skupin látek, a to diterpenových kyselin, diacylglycerolů a esterů kyseliny palmitové. Na obrázku 32 je zobrazen detail oblasti diterpenových kyselin ve vzorku růžové směsi (A) a v borovicové pryskyřici (B). Signály o m/z 299.2004, 301.2145 a 303.2305 přiřazují ve své studii Scalarone a kol. [98] protonovaným molekulám dehydro-DHA, DHA a kyselinám abietanového a pimaránového typu. Signál m/z 299.2004 může také vznikat vlivem oxidačních podmínek ve zdroji (přítomnost hydroxylového radikálu OH^\cdot), kdy dle Bai a kol. dochází k abstrakci vodíku z molekuly DHA [201]. Signály o m/z 315.1953 a 317.2009 reprezentují oxidační produkty DHA po inkorporaci kyslíku ve formě keto- a hydroxyskupiny. Další inkorporací kyslíku vznikají ionty s m/z 331.1900 a 333.2047, které byly v ASAP-IMS-MS rovněž detekovány (MS spektrum je uvedeno v příloze na obrázku 14P). Fragmentační spektra kyseliny dehydroabietové ($C_{20}H_{29}O_2^+$ 301.2145 Da, dtm -2.3 mDa) ve vzorku a standardu jsou uvedena na obrázku 32 C, D. Spektrum odpovídá výsledkům, které získali van der Berg a kol. při fragmentaci kyseliny dehydroabietové metodou HPLC-APCI-MS/MS.



Obrázek 32: MS spektrum oblasti diterpenových kyselin ve vzorku (A), MS spektrum diterpenových kyselin v borovicové pryskyřici (B), MS/MS spektrum signálu m/z 301.2145 ve vzorku, kolizní energie 20 V (C), MS/MS spektrum signálu m/z 301.2145 ve standardu kyseliny dehydroabietové, kolizní energie 20 V (D)

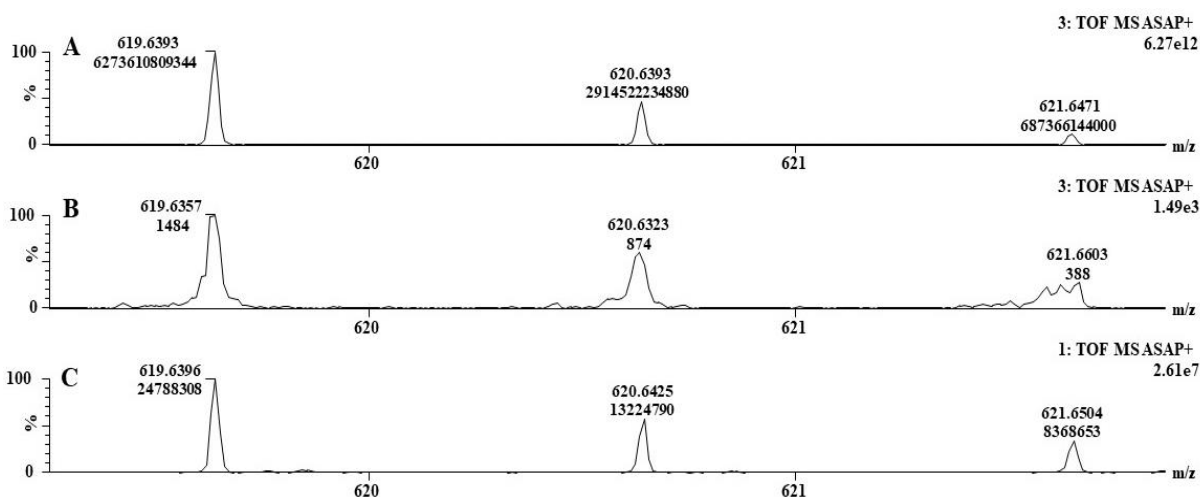
Fragment o m/z 255.2105 odpovídá iontu $[M+H-H_2CO_2]^+$ po ztrátě karboxylové skupiny z iontu prekurzoru. Fragment m/z 133.1010 je ve studii [33] označen jako isopropyl-tropyliový kation. Tvorba tohoto fragmentu vyžaduje rozštěpení dvou vazeb uhlík-uhlík v cyklu B viz obrázek 33. Fragment s m/z 173.1324 vzniká v důsledku ztráty 128 Da z iontu prekurzoru. Tato ztráta byla rovněž pozorována při fragmentaci 7-oxo-DHA a 15-OH-7-oxo-DHA. V citované studii autoři předpokládají, že fragmentační proces probíhá na kruhu A a náboj zůstává na straně aromatického cyklu. Vzniklý fragment je pravděpodobně bicyklický (kruh B a C).



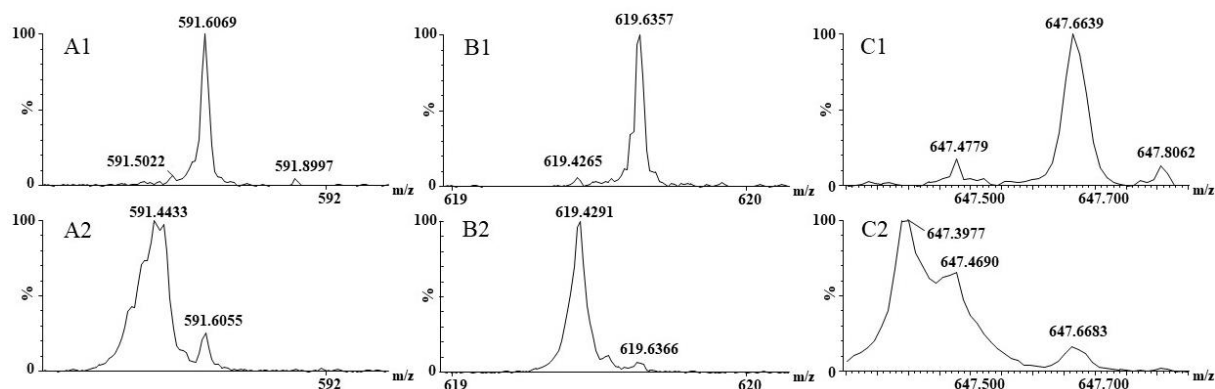
Obrázek 33: Struktura molekuly DHA a navržených fragmentů m/z 255.2105 a m/z 133.1010 [33]

Dále byly ve spektrech přítomny signály s m/z 463.4858, 491.5186 a 519.5491 odpovídající elementárním složením $C_{32}H_{63}O_1^+$, $C_{34}H_{67}O_1^+$ a $C_{36}H_{71}O_1^+$ s odchylkou od teoretické monoizotopické hmotnosti -2.1 , -0.6 a -1.4 mDa. Tyto látky jsou na základě porovnání s MS spektrem včelího vosku (porovnání přesných monoizotopických hmotností) pravděpodobně fragmenty esterů kyseliny palmitové. Přímým důkazem přítomnosti včelího vosku byla detekce signálu s m/z 619.6357 (dtm -3.6 mDa), který podle přesné monoizotopické hmotnosti a MS/MS spektra odpovídá esteru kyseliny palmitové s dlouhým řetězcem mastného alkoholu C_{26} (MS/MS spektrum je uvedeno v přílohách na obrázku 15P). Signál protonované molekuly $[M+H]^+$ esteru se 42 uhlíky by teoreticky měl odpovídat hodnotě m/z 621.6706. Detekovaná molekula $C_{42}H_{84}O_2^+$ však obsahovala o dva vodíky méně, a odpovídala tak iontu typu $[M - H]^+$. Možným vysvětlením je, že se při ionizaci nepolárních molekul uplatňuje i mechanismus abstrakce vodíku, který při ASAP-MS analýzách polyalfaolefinů popisuje Mendéz a kol. [144]. Na obrázku 34 B je zobrazeno přiblížení oblasti sledovaného signálu m/z 619.6357 ve vzorku růžové směsi po mobilní separaci. Ze spektra je zde patrné, že v iontovém zdroji mohou být přítomny i formy M^+ a $[M+H]^+$ sledované molekuly. V uvedeném spektru ale signály forem M^+ a $[M+H]^+$ interferují s prvním a druhým izotopickým píkem signálu m/z 619.6357. Poměr intenzit mezi druhým a prvním izotopickým píkem v izotopickém modelu je 0.46 a mezi třetím a prvním 0.11. V reálném vzorku jsou tyto poměry 0.59 a 0.26 a v referenčním vzorku včelího vosku potom 0.53 a 0.34. Vzhledem k vyšší hodnotě poměrů izotopických píků v reálném vzorku a ve vzorku včelího vosku lze očekávat, že pod izotopickými píky formy $[M - H]^+$ jsou přítomny i formy M^+ a $[M+H]^+$.

Signál m/z 619.6357 a další signály odpovídající esterům kyseliny palmitové byly v MS spektru vzorku přítomny s nízkou intenzitou, a navíc hned vedle mnohem vyšších signálů, se kterými interferovaly. V tomto případě se významně uplatnila mobilní separace viz obrázek 35, kde je patrné, že se podařilo z původního spektra signály esterů izolovat a zlepšit tak spolehlivost určení jejich molekulové hmotnosti i v poměrně komplexním vzorku.

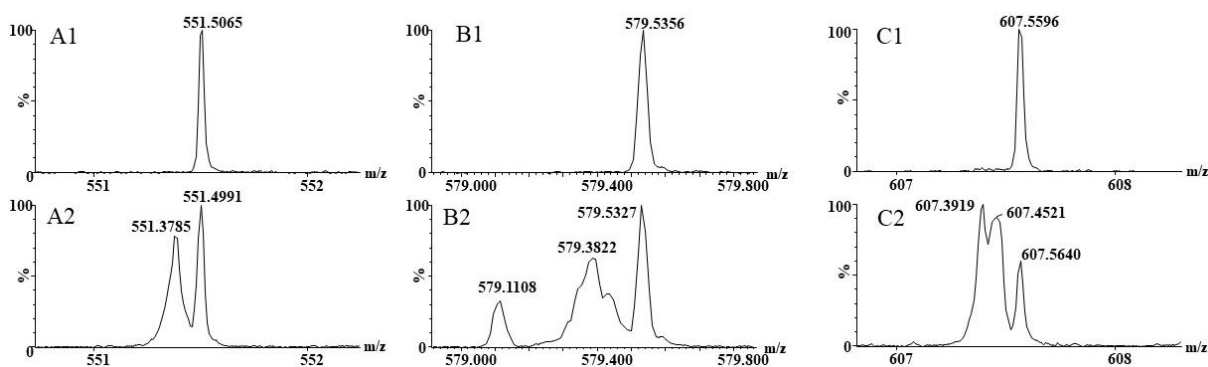


Obrázek 34: Teoretický izotopový profil molekuly $C_{42}H_{84}O_2^+$, m/z 619.6393 (A), signál m/z 619.6357 v růžové směsi (B) a signál m/z 619.6396 v referenčním vzorku včelího vosku (C)



Obrázek 35: Odseparování interferujících složek pomocí iontové mobility, signály esterů včelího vosku po IM separaci (A1, B1, C1), signály esterů bez IM separace (A2, B2, C2)

Ze skupiny acylglycerolů byly přítomny signály m/z 607.5640 ($C_{39}H_{75}O_4^+$, dtm -2.5 mDa), odpovídající molekule $C_{18:0}C_{18:0}$, m/z 579.5327 ($C_{37}H_{71}O_4^+$, dtm -2.5 mDa), odpovídající $C_{16:0}C_{18:0}$ a m/z 551.4991 ($C_{35}H_{67}O_4^+$, dtm -4.8 mDa) odpovídající $C_{16:0}C_{16:0}$. MS/MS spektra jsou uvedena v příloze na obrázcích 16P–18P. Díky separaci na základě rozdílných kolizních průřezů v iontové mobilitě je možné, stejně jako v případě esterů, odstranit ze spektra těchto látek interferující signály viz obrázek 36.

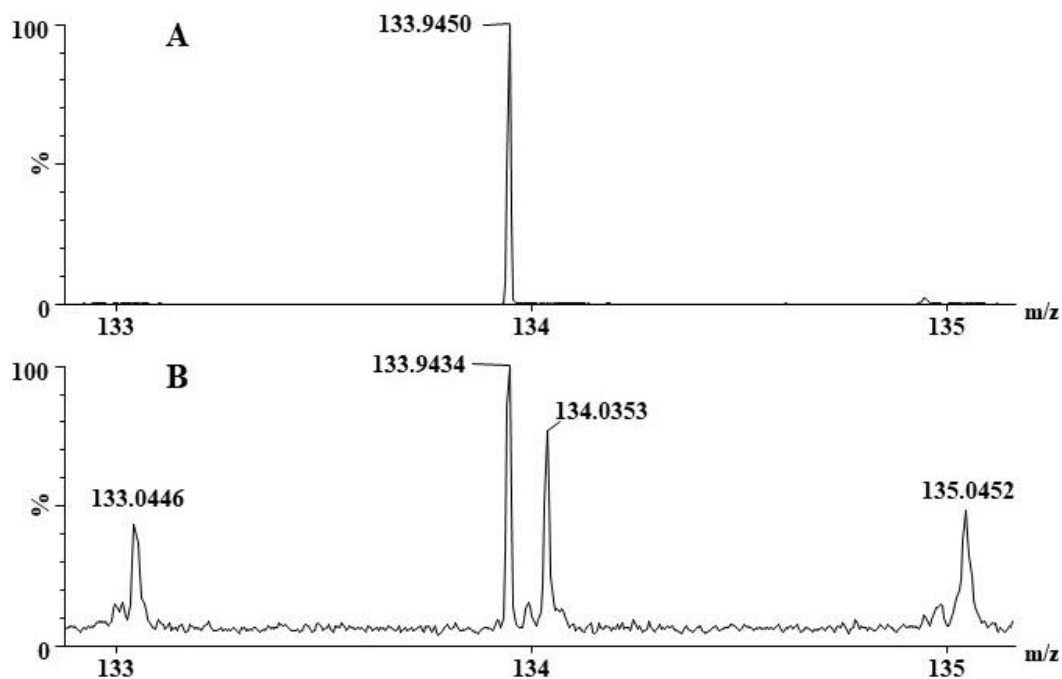


Obrázek 36: Odseparování interferujících složek pomocí iontové mobility, detekované diacylglyceroly po IM separaci (A1, B1, C1), detekované diacylglyceroly bez IM separace (A2, B2, C2)

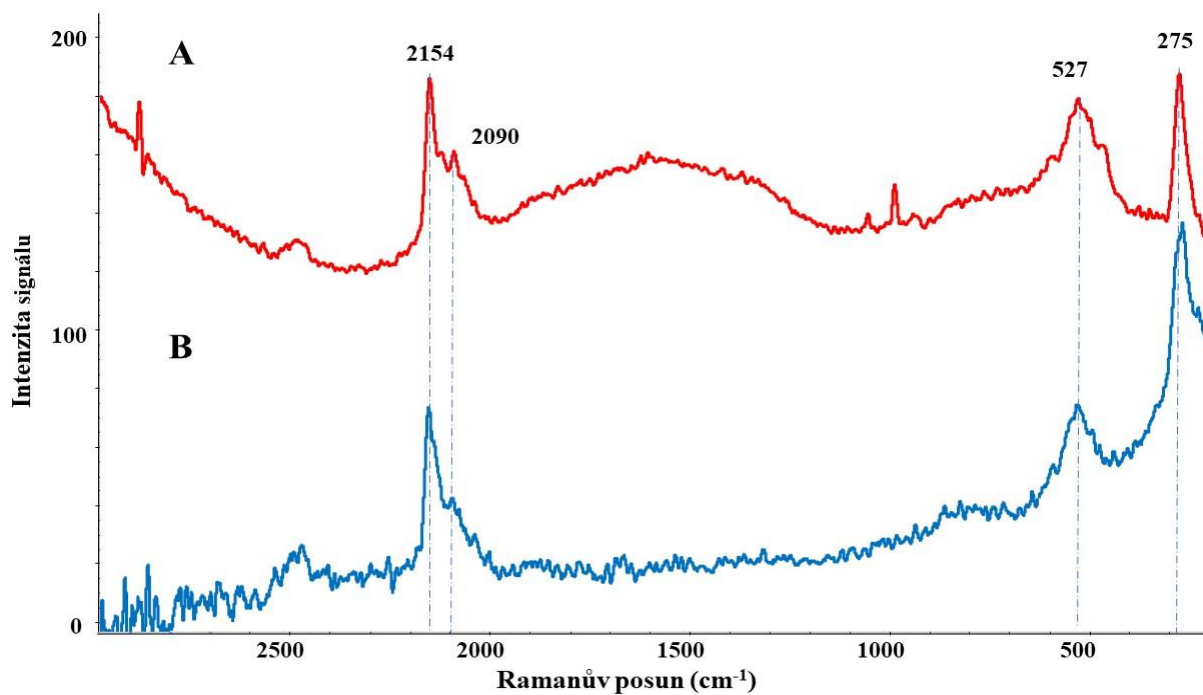
Z látek identifikovaných ve vzorku je tedy možné předpokládat, že mistr Jan Skřivánek přidával do růžové směsi jehličnanovou pryskyřici, včelí vosk a tuk nebo olej. Směs byla tedy pravděpodobně připravována obdobným způsobem jako olejové barvy. B. Slánský v knize *Technika malby* popisuje přípravu olejové barvy jako smísení anorganického pigmentu a oleje s dalšími přísadami, často včelím voskem a pryskyřicí [15].

Modrých odstínů bylo v glazurách obvykle dosaženo přidáváním minerálů obsahujících chrom, kobalt nebo měď [11, 26, 38], ale ani jeden prvek nebyl v modré směsi detekován. Podle výsledků SEM-EDX a ICP-MS byla ve směsi zvýšená koncentrace železa, přibližně $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Železo může být rovněž zdrojem modrého barviva, a to ve formě komplexu hexakynoželeznanu železitého $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ známého pod názvem pruská modř, který ale v glazurách nebyl běžný. Jde tedy o poměrně zajímavý nález. Pruská modř byla následně prokázána metodami FIA/ESI-MS a Ramanovy spektrometrie.

Spektrum laboratorně připravené pruské modři získané FIA/ESI-MS obsahovalo nejintenzivnější signál $[\text{Fe}(\text{CN})_3]^-$ s m/z 133.9450. Tento signál byl následně detekován i ve vzorku modré směsi m/z 133.9434 s odchylkou od teoretické hmoty -0.8 mDa viz obrázek 37. Tyto výsledky byly potvrzeny naměřením Ramanova spektra, které je uvedeno na obrázku 38. Pozice pásu se shoduje se studií Morretiho a kol., kteří se zaměřili na studium fotosenzitivity pruské modři. Nejintenzivnější pás 2154 cm^{-1} odpovídá valenční vibraci $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$. Pás 2090 cm^{-1} náleží vibraci $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ vibračního stavu $[\text{Fe}(\text{II}), \text{Fe}(\text{III})]$. Pásky v oblasti nižších vlnočtů 527 a 275 cm^{-1} jsou interpretovány jako vibrace mřížky $\nu(\text{Fe}-\text{C})$ a deformační vibrace vazeb $\delta(\text{Fe}-\text{CN}-\text{Fe})$ [202]. Získané spektrum bylo rovněž porovnáno se spektrem laboratorně připravené pruské modři a jednotlivé pásky se shodovaly.



Obrázek 37: FIA/ESI-MS spektrum referenčního vzorku pruské modři (A), vzorku připraveného z modré směsi (B)



Obrázek 38: Ramanovo spektrum vzorku modré směsi (A), referenčního vzorku pruské modři (B)

Zvýšený obsah síry ve vzorku modré směsi, který byl stanoven ICP-MS i SEM-EDX by mohl poukazovat na tradiční výrobu pruské moři, při které byl využíván zelený vitriol ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a sušená dobytčí krev [192]. Hlavním důvodem, proč nebyla pruská modř využívána v glazurách je její termální nestabilita. Komplex by za vysokých teplot výpalu podlehl rozkladu. V redukčních podmínkách výpalu by však mohl vznikat iont Fe^{2+} , který poskytuje v glazurách modrý odstín [192]. Je tedy možné, že mistr Jan Skřivánek sice připravil glazuru s pigmentem, který pro barvení glazur není vhodný, ale nakonec modrého zbarvení dosáhl redukčním výpalem. Přístup kyslíku k vypalovanému předmětu určuje převažující typ atmosféry v peci, která má významný vliv na barvu střepu a glazury [203]. Typ výpalu je možné na základě podmínek v peci dělit na oxidační, redukční nebo smíšený. Jako redukční výpal se označuje výpal, kdy je obsah kyslíku v peci udržován pod 1 %. V reálné hrncířské peci nebylo ovšem možné dosáhnout čistě oxidačních a redukčních podmínek. Proto je v souvislosti s typem výpalu vhodné uvádět spíše termín převládající typ atmosféry. Vliv na průběh a atmosféru výpalu má podoba vypalovacího zařízení, kterých historicky existovala celá řada, od otevřených ohnišť až po výpaly prováděné v různých typech milířů a pecí. Podobu tufarských pecí využívaných historicky na Moravě detailně popisuje K. Černohorský [204]. K. Těsnohlídková ve své disertační práci uvádí, že atmosféru v peci je možné také ovlivnit typem paliva. Převažující redukční podmínky byly dosahovány v uzavřených systémech pecí vyhřívaných spalováním dřeva nebo větví s listím [205]. Redukčních podmínek mohlo být docíleno i v otevřených vypalovacích zařízeních, pokud se zamezilo přístupu vzduchu k předmětům izolací pomocí vrstvy z nehořlavého nebo těžce hořlavého materiálu jako jsou drny, mokrá sláma nebo zetlelé listí [206].

Dle literatury přichází v úvahu i možnost, že byla modrá směs využívána k dekoraci produktů po druhém výpalu až na vypálenou polevu. Tato dekorační technika byla na Moravě dobře známá zhruba od 60. let 18. století pod německým názvem Überglasumalerei (neboli barva na polevu) a používala se pro barvy, které byly nestabilní za vyšších teplot. Takto dekorovaný předmět bylo nutné vypálit ještě potřetí a k tomuto účelu se využívaly tzv. mufle (hliněné schránky), které chránily předmět před přímým žářem pece nebo byly použity speciální muflové pece [204].

Na rozdíl od růžové směsi byl v modré směsi detekován i zvýšený obsah barya ve formě barytu. Baryt byl stejně jako minerály olova využíván jako tavidlo, napomáhal zvýšit lesk výsledné glazury a snižoval množství bublinek v tavenině [207, 208].

Analýza reziduí organických látek byla provedena metodami ASAP-IMS-MS a LDI-MS. V porovnání s růžovou směsí obsahovala modrá směs výrazně méně látek organického původu. Metodou ASAP-IMS-MS byly detekovány pouze stabilní diacylglyceroly o složení $C_{18:0}C_{18:0}$, $C_{18:0}C_{16:0}$, $C_{16:0}C_{16:0}$, jejichž MS/MS spektra jsou uvedena v příloze na obrázcích 19P–21P. Metodou LDI-MS v negativním ionizačním módu byly detekovány kyselina olejová, stearová a palmitová (spektra jsou uvedena v příloze na obrázcích 13P a 22P).

Na základě SEM-EDX výsledků se bezbarvá směs skládala z rozdrčených kousků skla. Díky hrubší struktuře směsi bylo možné pomocí SEM-EDX zaměřit jednotlivé fragmenty skla a určit jejich složení. Na základě výsledků bylo zjištěno, že se bezbarvá směs skládá minimálně ze dvou typů skel. Jedná se o sklo s vyšším obsahem olova a téměř čistý SiO_2 . Takovéto směsi skla se využívaly jako tzv. frity, které se následně smíchaly s pigmenty a vodou a byly nanášeny na keramiku před druhým výpalem [207]. Zvýšený obsah olova byl potvrzen i pomocí ICP-MS. Na rozdíl od růžové a modré směsi neobsahovala bezbarvá směs žádné komponenty organického původu.

Tabulka 9: Výsledky ICP-MS analýz v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

Vzorek	P	S	Ca	Na	Mg	Al	Si	K	Ti	V	Mn	Fe	Cu	Zn	Ga	Sr	Sn	Sb	Ba	Hg	Pb
Bezbarvá směs	0.3	0.6	<LOD	34.6	0.8	32	317	5.2	0.86	0.02	0.02	2.0	0.08	0.01	0.02	0.02	0.44	0.01	0.3	<LOD	6
Růžová směs	3.2	3.3	4.4	1.1	1.3	51	223	4.0	0.07	0.03	0.01	0.5	0.26	0.02	0.22	0.15	0.02	0.05	4.3	0.01	35
Modrá směs	0.6	14.0	14.0	1.2	0.6	11	101	0.9	0.04	0.03	0.03	4.0	0.13	0.10	4.84	3.52	0.17	0.10	86.0	0.43	232

Tabulka 10: Výsledky SEM-EDX v hmotnostních procentech

Číslo analýzy	Vzorek	Na	Mg	Al	Si	P	S	K	Ca	Ti	Fe	Sr	Ba	Pb	Suma
1	Bezbarvá směs	0.98	0.17	8.52	65.21	0.05	0.22	2.42	0.22	ND	0.94	ND	0.27	11.76	90.76
2		0.85	0.27	6.40	66.54	0.05	0.15	1.87	0.27	ND	1.30	ND	ND	18.13	95.82
3		0.36	0.28	0.62	101.83	0.42	0.43	0.11	0.05	ND	0.05	ND	ND	0.13	104.26
4		1.37	0.69	9.21	75.92	0.54	0.65	2.16	0.33	1.45	1.70	ND	ND	6.59	100.62
1 (celek)	Růžová směs	0.26	0.60	20.95	38.58	1.39	1.31	1.69	4.21	0.69	0.60	ND	ND	1.97	72.24
1 (celek)	Modrá směs	<LOD	<LOD	4.23	9.17	<LOD	8.51	0.04	0.83	ND	1.33	0.19	20.34	9.22	53.84
3 (celek)		0.03	0.32	21.92	33.99	2.67	1.11	1.08	4.22	ND	7.85	0.67	0.27	8.21	82.34
2 (baryt)		ND	ND	ND	ND	ND	17.81	ND	<LOD	ND	<LOD	<LOD	52.60	<LOD	70.40
4 (baryt)		<LOD	<LOD	<LOD	ND	ND	27.83	<LOD	<LOD	ND	<LOD	<LOD	56.26	<LOD	84.09

ND nedetekováno, <LOD pod limitem detekce dané metody

4.2.5 Závěr

Chemické složení tří hrnčířských směsí bylo analyzováno za účelem identifikace anorganických i organických sloučenin. Zdrojem růžového zbarvení směsi byl pravděpodobně červeně zbarvený hematit, běžně využívaný jako pigment, který při oxidačním výpalu poskytuje červené odstíny. Obdobné barvy surové směsi mohlo být dosaženo přítomností oxidu měďného Cu_2O . Měď však byla metodou ICP-MS a SEM-EDX stanovena v poměrně nízkém množství a pravděpodobněji se tak jeví využití Fe_2O_3 . Růžová směs byla bohatá na obsah organických sloučenin. Metodou ASAP-IMS-MS byly stanoveny diterpenové kyseliny a jejich degradační produkty, které indikují přítomnost jehličnanové pryskyřice ve vzorku. Kromě těchto látek byly identifikovány residua tuků anebo olejů (diacylglyceroly o složení $\text{C}_{18:0} \text{C}_{18:0}$, $\text{C}_{16:0} \text{C}_{16:0}$ a $\text{C}_{18:0} \text{C}_{16:0}$) a třetí skupinou organických látek byly fragmenty dlouhých řetězců esterů, které byly rovněž nalezeny ve včelím vosku. Přítomnost včelího vosku byla potvrzena nalezením signálu m/z 619.6357 který dle získaného fragmentačního spektra odpovídá esteru kyseliny palmitové. Tyto výsledky dokazují, že byly organické složky přidávány do dekoračních směsí využívaných při tvorbě keramiky a mohly pravděpodobně plnit funkci pojiva.

Ve všech třech směsích byl stanoven vysoký obsah olova a v modré směsi bylo navíc nalezeno baryum. Oba tyto prvky ve formě svých minerálů byly historicky běžně přidávány do glazur jako tavidla [178, 186, 207, 208]. Nízký obsah kalických minerálů znamená, že se jedná o glazury s nižší kryvostí.

Původ modrého zbarvení směsi byl určen jednoznačně metodou FIA/ESI-MS a Ramanovy spektrometrie. Po alkalickém rozkladu ve vodném prostředí bylo modré barvivo rozloženo a následnou analýzou FIA/ESI-MS byl modrý pigment na základě signálu m/z 133.9434 ($[\text{Fe}(\text{CN})_3]^-$) identifikován jako pruská modř. Přítomnost pruské modři byla potvrzena naměřením Ramanova spektra standardu a vzorku. Jedná se tak vůbec o první stanovení pruské modři ve směsi určené pro dekoraci keramiky. Oproti růžové směsi obsahovala modrá směs podstatně nižší obsah organických látek. Metodou ASAP-IMS-MS byly stanoveny pouze stabilní diacylglyceroly. Přítomnost reziduí tuků/olejů byla potvrzena i v LDI-MS spektrech, ve kterých byly detekovány signály mastných kyselin.

Bezbarvá směs byla složena z fragmentů různých typů skel a neobsahovala žádná organická residua. Tato směs pravděpodobně sloužila jako tzv. frit, která byla později smíšena s pigmentem a nanášena na keramické výrobky po prvním výpalu.

Výsledky této studie byly publikovány v práci K. Jagošová, M. Moník, J. Kapusta, R. Pechancová, J. Nádvorníková, P. Fojtik, O. Kurka, T. Závodná, P. Bednář, L. Richtera, L. Kučera, Secret recipe revealed: Chemical evaluation of raw colouring mixtures from early 19th century Moravia, *Molecules* 27 (2022) 5205.

4.3 Chemická analýza odlévacích forem z doby římské

4.3.1 Význam a metodické aspekty studie v kontextu historického výzkumu a památkové péče

Studium produkce neželezných předmětů na barbarském území v Centrální Evropě je jedním z cílů současného výzkumu Římské éry [209–211]. Využití hmotnostní spektrometrie v analýze odlévacích forem (neboli kadlubů) není příliš běžné. Příkladem je práce Baronové a kol., kteří analyzovali povrch měděného kadlubu datovaného do období kultury popelnicových polí 1000–900 před n.l. nalezeného v Polsku poblíž vesnice Gaj Olawski. Povrch kadlubu byl pokryt patinou typickou pro bronzové předměty a na vnitřní straně byla nalezena tmavá vrstva. Tato vrstva byla analyzována metodou infračervené spektrometrie a GC/MS. Výsledky odhalily přítomnost lineárních řetězců n-alkanů a volné řetězce vyšších primárních alkoholů. Na základě získaných dat autoři předpokládají, že vrstva pravděpodobně obsahovala včelí vosk a mohla sloužit k ochraně formy od slnutí s roztaveným materiálem [212]. Autoři Wang a kolektiv studovali rezidua na vnitřním povrchu keramických forem pro odlévání bronzových předmětů nalezených na jihozápadě provincie Shanxi v Číně. Metodou Py-GC/MS detekovali alifatické alkany, ethery a estery a rovněž ve studovaných vzorcích předpokládají přítomnost včelího vosku, nebo živočišných tuků [213]. Chastain ve své disertační práci uvádí různé hypotézy důvodů aplikace těchto vrstev [214]:

- Ochranná funkce formy
- Zvýšení kvality povrchu odlitého produktu
- Snazší oddělení hotového výrobku od formy

Mimo tyto nálezy byly směsi vosků v metalurgii rovněž využívány jako součást forem pro techniku odlévání nazývanou metoda ztraceného vosku [215].

Předmětem této studie byla chemická analýza kadlubů nalezených na území jižní Moravy, kde ve druhém a třetím století našeho letopočtu sídlily germánské kmeny. Tyto formy byly využívány germánskými řemeslníky k odlévání kovových předmětů. Kadlub 1 (obrázek 39) nalezený v lokalitě Klenovice na Hané sloužil k výrobě spony opaskového kování, tzv. nákončí

a kadlub 2 (obrázek 39) nalezený v lokalitě Mikulov Mušlov byl využíván k odlévání součásti koňského postroje. Cílem studie bylo získat informace o prvkovém složení materiálu nalezených kadlubů metodou rentgenfluorescenční spektrometrie a charakterizovat materiál olupělý na povrchu kadlubů pomocí Ramanovy spektrometrie, Py-GC/MS a ASAP-IMS-MS.

4.3.2 Chemikálie a vzorky

Pro kalibraci QqTOF analyzátoru hmotnostního spektrometru Synapt G2-S byl využit mravenčan sodný (připravený viz kapitola 4.1.2 Chemikálie). Vzorky pro ASAP-IMS-MS analýzu byly extrahovány acetonem (Penta, p.a., ČR). Pro korekci naměřených spekter byl využit roztok leucin enkefalinu (HPLC ≥ 95 %, Sigma Aldrich). Vzorek ceresinu byl poskytnut ze sbírky materiálů Národního památkového ústavu ČR paní dott. Janou Michalčákovou, Ph.D. et Ph.D. Kadluby k analýzám laskavě poskytl pan PhDr. Jan Jílek Ph.D.



Obrázek 39: Kadlub 1 (délka 57.0 mm, šířka 23.0 mm tloušťka 9.6 mm) nalezený v lokalitě Klenovice na Hané, kadlub 2 (délka 38.0 mm, šířka 45.0 mm, tloušťka 11.0 mm) nalezený v lokalitě Mikulov Mušlov [216]

4.3.3 Metodika

- **Rentgenfluorescenční spektrometrie:** Pro XRF analýzu byly z každého kadlubu odebrány tři vzorky z intaktní vrstvy předmětu. Celkové množství činilo zhruba 100 mg. Vzorky byly odvrtnuty vrtačkou Proxxon Micromot 60/EF s karbidovým vrtákem 0.75 mm a změřeny přenosným rentgenfluorescenčním spektrometrem Vanta (Olympus, Southborough, MA, USA). Parametry měření byly nastaveny následovně: mód přístroje analytický, excitační energie v rozsahu 8–40 kV, délka expozice 310 s.
- **Ramanova spektrometrie:** Černé částičky nalezené na povrchu kadlubů byly analyzovány metodou Ramanovy mikroskopie na přístroji DXR2 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Parametry analýzy byly nastaveny následovně: vlnová délka laseru 785 nm, výkon laseru 1 mW, apertura 50 μm , délka expozice 2 s, počet expozic 16. Pro vyhodnocení dat byl

využit SW Omnic 9 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Jako standard bylo využito aktivní uhlí (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

➤ **Py-GC/MS:** Analýzy vzorků byly provedeny na plynovém chromatografu Agilent 8890 spojeném s hmotnostním detektorem Agilent 5977B (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Pro pyrolýzu byl využit pyrolyzátor EGA/PY-3030D (Frontier Lab, New Ulm, MN, USA). Vzorek byl podroben pyrolýze při 500 °C po dobu 0.5 min. Separace byla realizována na kapilární koloně Ultra Alloy (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) UA5-30M-0.25F 20072108S (Frontier Laboratories Ltd., Fukushima, Japonsko). Jako nosný plyn bylo využito helium s konstantním průtokem 1.2 ml·min⁻¹. Dusík byl využit jako kolizní plyn, jeho průtok byl nastaven na 1.5 ml·min⁻¹. Teplotní program termostatu kolony byl nastaven následovně: počáteční teplota termostatu 70 °C byla držena po dobu 1 min, následně byla teplota zvýšena teplotním krokem 30 °C·min⁻¹ na 320 °C. Finální teplota byla držena 10 min. Dále byly nastaveny následující parametry: teplota inletu 300 °C, poměr děliče nástřiku 50:1, délka sběru dat 19.3 min. Celkové množství vzorku k analýze 10 mg. Získaná data byla zpracována v SW Mass Hunter (Agilent technologies, Palo Alto, Ca, USA).

➤ **ASAP-IMS-MS:** Necílená analýza vzorků byla provedena na vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometru Synapt G2 S (Waters, Milford, MA, USA) vybaveném mobilní celou (TriWave). Vzorky byly zpracovány následovně: 5 mg vzorku bylo extrahováno 300 μl acetonu za využití ultrazvukové lázně po dobu 15 min. Vzorky byly následně centrifugovány 5 min při 5000 otáčkách za minutu. Odebraný supernatant byl odpařen proudem dusíku a odparek byl rekonstituován ve 100 μl acetonu. Extrakt byl následně deponován na skleněnou kapiláru a podroben analýze. Pro zvýšení citlivosti byla využita i modifikovaná kapilára s otevřeným koncem, do níž byl extrakt nadávkován kapilární elevací. Detailní nastavení metody je popsáno v kapitole 4.1.5 Metodika. Parametry pro kolizní měření byly nastaveny následovně: LM hodnota 15, kolizní energie na Transfer kolizní cele 30 V.

4.3.4 Výsledky a diskuse

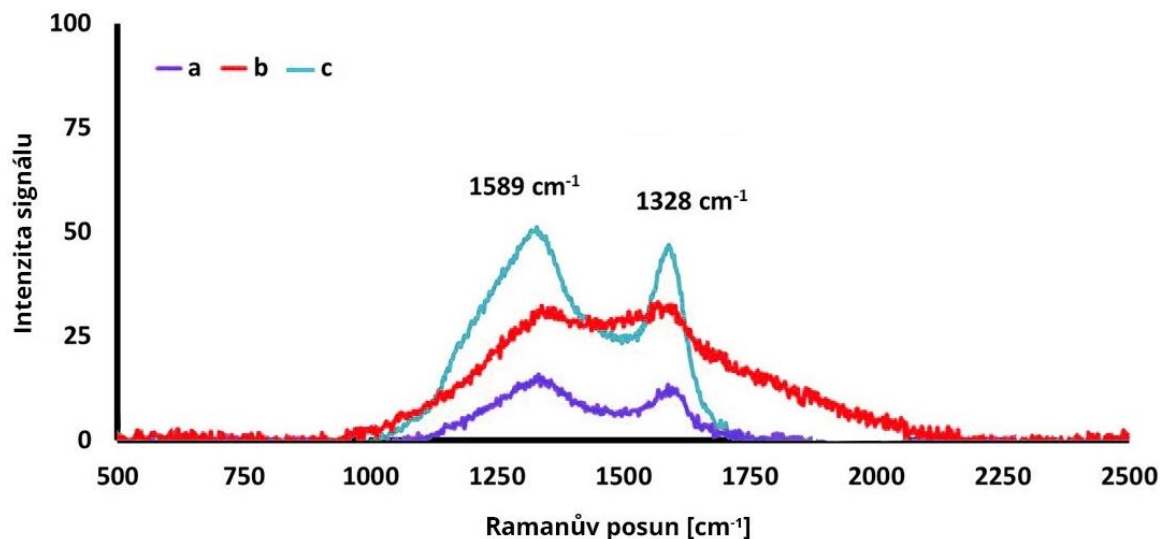
Vzorky odebrané z intaktní vrstvy kadlubů byly podrobeny XRF analýzám za účelem zjištění elementárního složení. Při tomto typu analýzy je nutné kvalitně odebrat vzorek z vrstvy, která není pokryta patinou a ovlivněna korozi tak, aby bylo zajištěno, že je měřen nedegradovaný materiál [217]. Z výsledků je patrné, že oba kadluby jsou vyrobeny z mědi a obsahují poměrně vysoké zastoupení olova, zinku a dále také cínu viz tabulka 11. Obdobně vysoké množství olova bylo stanoveno i u fragmentu měděného výlitku ústí odlévacího kanálku nalezeného v lokalitě Boršov na Svitavsku (10.25 % Pb) [218] a v bronzové formě sloužící

k odlévání kolénkovité spony typu Algrem 132 nalezené ve Východních Čechách u Chrudimi (19.70 % Pb) [219]. Slitiny se zvýšeným obsahem olova byly v Římské říši využívány pro výrobu soch, masivních součástí toreutických produktů (toreutika – výtvarná technika zdobení kovových předmětů) [209, 210, 220] a určitých typů spon a jejich součástí [220, 221]. Olovo se do slitin přidávalo za účelem zlepšení vlastností taveniny (vyšší tekutost), která pak lépe vyplnila odlévací formu [222, 223]. Slitiny olova však nebyly na barbarském území Germánie příliš využívané pro produkci malých kovových předmětů jako jsou spony a opaskové kování, protože neměly požadovanou odolnost vůči následnému zpracování [210]. Při uvážení oblíbenosti olověných slitin na území Římské říše [210] (zejména pak ve 2.–4. století našeho letopočtu) je možné předpokládat, že analyzované kadluby byly vyrobeny přetavením římských předmětů.

Tabulka 11: Výsledky XRF analýz vzorků odebraných z kadlubu 1 a kadlubu 2 (normalizovaná procenta, průměr ze 3 měření)

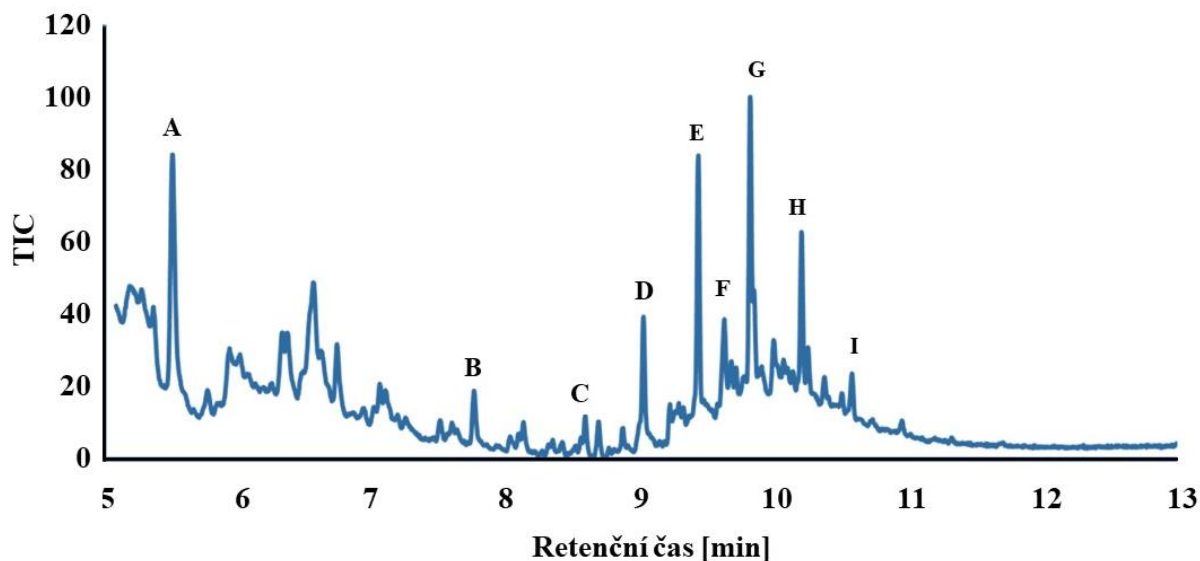
prvek	Kadlub 1		Kadlub 2	
	Průměr (%)	Směrodatná odchylka	Průměr (%)	Směrodatná odchylka
Cu	88.64	3.62	79.33	4.15
Pb	5.35	2.33	14.61	2.93
Zn	2.82	0.06	1.62	0.06
Sn	2.69	1.55	3.97	1.21
Fe	0.37	0.19	0.13	0.02
Ni	0.06	0.01	0.05	0.01
Ti	0.04	0.03	0.08	0.00
Co	0.01	0.02	<LOD	-
Au	<LOD	-	<LOD	-
Zr	<LOD	-	0.01	0.00
Cr	<LOD	-	0.01	0.00
Sr	<LOD	-	<LOD	-
Nb	<LOD	-	<LOD	-
Bi	<LOD	-	0.03	0.01
Mn	<LOD	-	0.01	0.01
S	<LOD	-	<LOD	-
Ag	<LOD	-	0.15	0.11

Černé částičky, které se nacházely na vnitřní straně kadlubů, byly odebrány pomocí skalpelu a změřeny na Ramanově spektrometru. Naměřená spektra vzorků jsou uvedena na obrázku 40 a, b a jsou na nich patrné dva absorpční pásy s maximy 1589 cm^{-1} a 1328 cm^{-1} . Sadecky a kol. interpretovali tyto absorpční pásy ve vzorcích saz jako vibrace vazeb uhlíku [224]. Výsledky byly následně potvrzeny analýzou standardu aktivního uhlí viz obrázek 40 c.

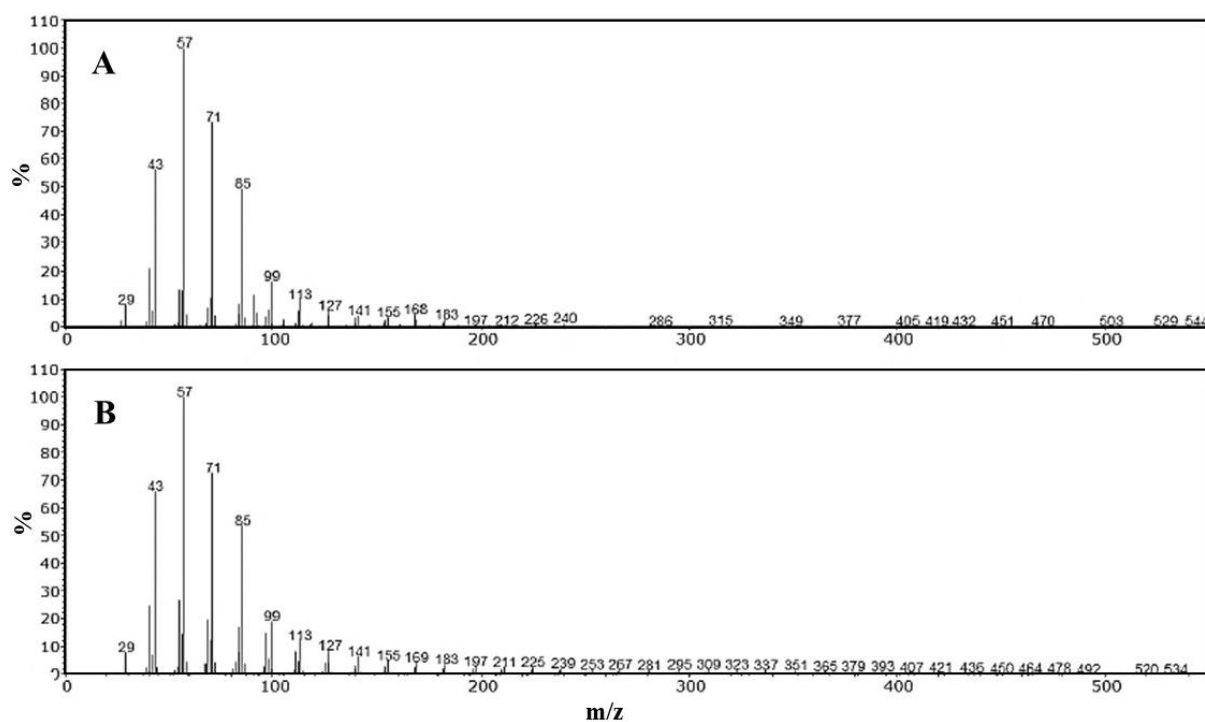


Obrázek 40: Ramanova spektra černých částic odebraných z povrchu kadlubu 1 (a), kadlubu 2 (b) a standardu aktivního uhlí (c)

Vzorky krusty odebrané z povrchu kadlubu 1 a 2 byly podrobeny Py-GC/MS analýze za účelem detekce organických reziduí na povrchu těchto kadlubů. Na obrázku 41 je uveden pyrogram získaný analýzou vzorku odebraného z kadlubu 2. Ve spektrech byly identifikovány signály n-alkanů a rozvětvených alkanů v rozsahu C14–C19. Vyšší alkany nebyly ve spektrech patrné. Možným vysvětlením absence vyšších alkanů je, že delší řetězce byly během pyrolýzy termálně rozštěpeny. V pyrogramu byl rovněž detekován naftalen, který potvrzuje přítomnost organických látek ve vzorku. Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu F-Search (verze 3.6.3, Frontier Lab, New Ulm, MN, USA), který umožňuje porovnat kombinované spektrum ze všech detekovaných látek s interní databází polymerů. Vyhledáváním byla nalezena shoda mezi kombinovaným spektrem vzorku a spektrem ozokeritu (tzv. zemního vosku) viz obrázek 42. Ve vzorku odebraném z kadlubu 1 nebyla metodou Py-GC/MS detekována žádná organická rezidua.



Obrázek 41: Pyrogram vzorku odebraného z kadlubu 2 (A furfural, B naftalen, C tetradekan, D pentadekan, E hexadekan, F 2,6,10-trimethylpentadekan, G heptadekan, H oktadekan, I nonadekan)

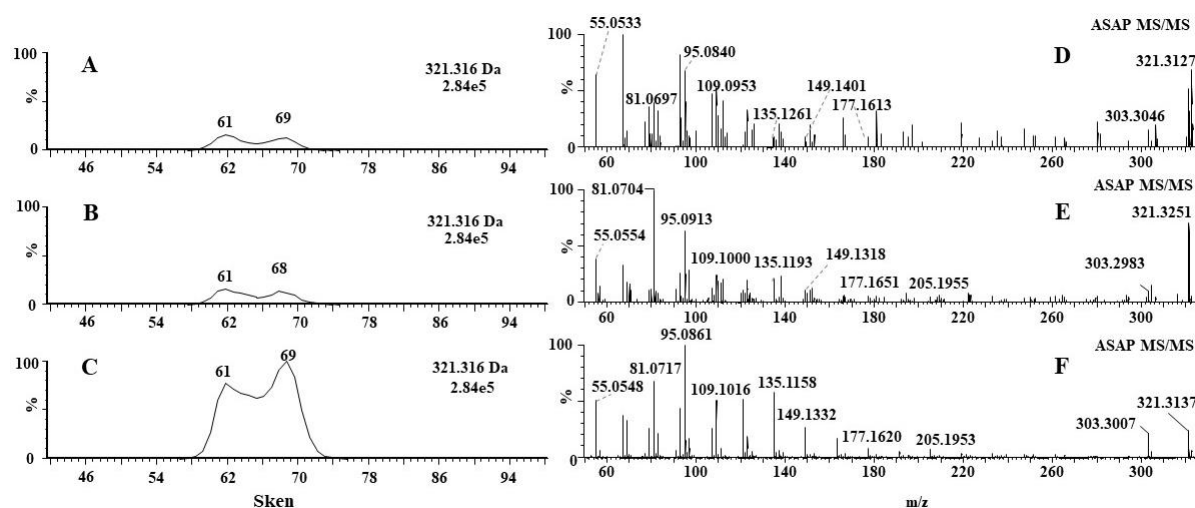


Obrázek 42: Kombinované hmotnostní spektrum všech detekovaných látek v pyrogramu v rozsahu 8.0–19.0 min ze vzorku odebraného z kadlubu 2 (A), referenční hmotnostní spektrum ozokeritu z databáze C1–C40 (B)

Jako konfirmační metoda byla zvolena technika ASAP-IMS-MS. Spektra získaná analýzou vzorků byla v prvním kroku porovnána se spektry získanými analýzou včelího vosku. Estery kyseliny palmitové, které jsou v archeologických nálezích spolehlivé markery včelího vosku a v ASAP-MS spektrech jsou dobře patrné, nebyly ve spektrech vzorků kadlubů detekovány.

Hypotézu, že byl při technologickém procesu využit zemní vosk, podpořila detekce signálu m/z 321.3122 ($C_{22}H_{41}O^+$, dtm 3.5 mDa) v MS spektru kadlubu 2 (viz obrázek 23P, B). Tento signál byl detekován rovněž jako součást ceresinu (viz obrázek 23P, C), který je přečištěným produktem zemního vosku. V MS/MS spektru kadlubu 2 uvedeném na obrázku 43 E je patrná ztráta molekuly vody za vzniku fragmentu s m/z 303.2983. Další fragmenty vznikají štěpením jednotek C_2H_4 (ztráta 28 Da). Shodnost signálu ve vzorcích a ceresinu potvrdil i driftový čas viz obrázek 43 A–C.

Ačkoliv je ozokerit označován jako minerální vosk (v závislosti na geologickém původu obsahuje n-alkany v širokém rozsahu molekulových hmotností s různým stupněm nasycenosti a větvení [225, 226]), v jeho přečištěném produktu ceresinu stanovili Vicente a kol. i kyslíkaté složky, např. VMK [227]. Signál m/z 321.3181 (dmt –2.4 mDa) byl s nižší intenzitou detekován v MS spektru vzorku z kadlubu 1 (viz obrázek 23P, A).



Obrázek 43: Extrahovaný mobilogram ze vzorku kadlubu 1 (A), kadlubu 2 (B), ceresinu (C), ASAP-IMS-MS/MS spektrum kadlubu 1 (D), kadlubu 2 (E), ceresinu (F)

Identifikace organických látek a jejich degradačních produktů ve vzorcích archeologických nálezů, které byly po staletí umístěny v půdě je komplikovaná mnoha faktory. Vlivem environmentálních podmínek dochází k degradaci, migraci a dalším procesům, které snižují množství původních složek a vedou k významným změnám v chemickém složení nálezů. Rezidua vosku také nemusela ulpět na kadlubu během technologického procesu odlévání rovnoměrně. Následné podmínky uložení předmětů mohly nehomogenitu ještě zvýšit. Tento fakt může být důvodem absence alkanů v pyrogramu vzorku odebraného z kadlubu 1. Kontakt kadlubů s roztaveným kovem mohl v důsledku vysoké teploty rovněž zapříčinit významné chemické změny. Dle Baronové a kol. mohou zbytky vosku na vnitřním povrchu formy

poukazovat na fakt, že kadlub nebyl pro účely odlévání využit [212]. Rovněž je možné, že nalezené kadluby sloužily jako formy pro výrobu voskových modelů, které byly následně využity pro metodu lití na vytavitelný model (metoda ztraceného vosku).

4.3.5 Závěr

XRF analýza vzorků odebraných z kadlubů odhalila jako hlavní materiál předmětů měď. Cín byl detekován v poměrně nízkém množství na to, aby mohla být slitina označena jako bronz. Kromě uvedených prvků byl ve vzorcích detekován zvýšený obsah olova a zinku. Na základě archeologické rešerše je možné, že kadluby byly vyrobeny přetavením předmětů římského původu, u kterých je vysoký obsah olova a zinku v měděných slitinách běžný. Metodou Ramanovy spektrometrie byly analyzovány černé částičky odebrané z povrchu kadlubů. Na získaných spektrech byly patrné dva intenzivní absorpční pásy, které odpovídají vibračním uhlíkových vazeb. Tyto výsledky poukazují na přítomnost sazí ulpělých na povrchu kadlubů.

Na základě výsledků Py-GC/MS a ASAP-IMS-MS analýz je možné předpokládat, že na povrchu nalezených kadlubů byla nalezena rezidua minerálního vosku ozokeritu. Pro další podpoření této hypotézy by bylo ovšem vhodné provést experimenty zahrnující i analýzy nálezů ozokeritu, který ale bohužel nebyl pro naši studii dostupný.

Výsledky této studie byly publikovány v práci K. Jagošová, J. Jilek, P. Fojtik, I. Čižmář, M. Popelka, O. Kurka, L. Kučera, First evidence of „earth wax“ inside the casting molds from the Roman era, *Molecules* 26 (2021) 4259.

5 Závěr disertační práce

Přímá ionizační technika využívající pevnou sondu pracující za atmosférického tlaku ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí a separací iontovou mobilitou prokázala využitelnost v analýzách vzorků kulturního dědictví.

V první studii bylo možné navrženou a optimalizovanou ASAP-MS metodou odlišit sedm typů rostlinných olejů, které byly a jsou využívány jako pojiva pro uměleckou tvorbu. Následně byla metoda rozšířena o post-ionizační separaci pomocí iontové mobilitní spektrometrie (ASAP-IMS-MS). Tato metoda byla aplikována na analýzu modelových vzorků temper, které byly připraveny ve dvou typech pojiva a podrobeny urychlenému staření v testovací komoře přístroje Solarbox využívaného pro studium odolnosti materiálů vůči vlhkosti, teplotě a UV záření. Získaná data byla vyhodnocena statistickou metodou PCA. Na základě výsledků bylo možné odlišit vaječné pojivo od olejového i v degradovaných modelových vzorcích. Navrhované markery však nebyly detekovány v dostupném autentickém vzorku nástěnné malby, což poukazuje na možná omezení metody ve vztahu k velmi starým uměleckým dílům. Určení rozsahu použití metody vyžaduje její další testování v širších časových i geografických kontextech.

Ve druhé studii byla metoda ASAP-IMS-MS aplikována na analýzu organických reziduí v reálných archeologických nálezích hrnčířských směsí z přelomu 17. a 18. století. Simultánně se podařilo metodou ASAP-IMS-MS v jednom vzorku identifikovat tři typy organických látek. Jednalo se o acylglyceroly, dlouhé estery kyseliny palmitové a diterpenové kyseliny. Kombinací metod prvkové analýzy, Ramanovy spektrometrie a FIA/ESI-MS bylo možné identifikovat pruskou modř jako zdroj modrého zbarvení jedné dekorační směsi. Jedná se tak o vůbec první detekování tohoto pigmentu ve směsích pro dekoraci keramiky.

Ve třetí studii byla metoda ASAP-IMS-MS využita jako konfirmační technika k Py-GC/MS pro analýzu vzorků odebraných z povrchu měděných kadlubů datovaných do období říše Římské. Výsledky Py-GC/MS a ASAP-IMS-MS shodně poukazují na pravděpodobné využití ozokeritu při procesu odlévání kovových předmětů na barbarském území.

Na základě získaných výsledků je možné o technice ASAP-IMS-MS uvést následující:

- ASAP-IMS-MS je technika vhodná pro rychlý, cílený, kvalitativní screening, poskytující informace o kompozici vzorku
- Umožňuje přímou analýzu kapalných i pevných vzorků

- Jedná se o techniku vhodnou pro simultánní stanovení několika typů chemických látek, jak ukazuje studie v kapitole 4.2 (acylglyceroly, estery vyšších mastných kyselin, diterpenové kyseliny)
- Ve spojení s metodami vícerozměrné statistiky (PCA a OPLS-DA) je možné určit markery vhodné pro klasifikaci předmětů hmotného kulturního dědictví a pro účely materiálového i historického výzkumu
- S využitím iontové mobility je možné snížit šum, odstranit část matričních efektů a získat čistější MS spektra
- Spojení ASAP-IMS-MS/MS umožňuje rozšířit možnosti uspořádání MS/MS experimentů

6 Literatura

- [1] J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworth Heinemann, Oxford, 1994.
- [2] L. C. Giannossa, I. D. van der Werf, Overview of materials in cultural heritage, in: L. Sabbatini, I.D. van der Werf (ed.), *Chemical analysis in cultural heritage*, De Gruyter, Berlin, 2020. pp. 3–28.
- [3] M.P. Colombini, F. Modugno, *Organic Materials in Art and Archaeology*, in: M.P. Colombini, F. Modugno (ed.), *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, Wiley, Chichester 2009: pp. 1–36.
- [4] E. Geddes Da Filicaia, R.P. Evershed, D.A. Pegg, Review of recent advances on the use of mass spectrometry techniques for the study of organic materials in painted artworks, *Anal. Chim. Acta* 1246 (2023) 340575. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340575>.
- [5] J. La Nasa, M. Zanaboni, D. Uldanck, I. Degano, F. Modugno, H. Kutzke, E.S. Tveit, B. Topalova-Casadiago, M.P. Colombini, Novel application of liquid chromatography/mass spectrometry for the characterization of drying oils in art: Elucidation on the composition of original paint materials used by Edvard Munch (1863–1944), *Anal. Chim. Acta* 896 (2015) 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.023>.
- [6] W. Hamm, Oil production and processing, in B. Caballero, L.C. Trugo, P.M. Finglas (ed.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, second edition, Academic Press, Cambridge, 2003. pp.5904–5916
- [7] M. Lída, M. Holčapek, Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1198–1199 (2008) 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.037>.
- [8] R.J. Hamilton, C. Kalu, E. Prisk, F.B. Padley, H. Pierce, Chemistry of free radicals in lipids, *Food chemistry*, 60 (1997) 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00351-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00351-2).
- [9] J.B. Marcus, *Lipids Basics: Fats and oils in foods and health*, in: J.B. Marcus (ed.) *Culinary Nutrition*, Academic press, Amsterdam, 2013. pp. 231–277.
- [10] E.N. Frankel, Photooxidation of unsaturated fats, in: E.N. Frankel *Lipid Oxidation*, second ed., Woodhead publishing, Cambridge, 2012: pp. 51–66.
- [11] J. Davídek, *Chemie potravin: určeno pro posluchače fakulty potravinářské a biochemické technologie*, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 1991.
- [12] E.N. Frankel, Hydroperoxide decomposition, in: E.N. Frankel *Lipid Oxidation*, second ed., Woodhead publishing, Cambridge, second ed., 2012: pp. 67–98
- [13] A. Filopoulou, S. Vlachou, S.C. Boyatzis, Fatty Acids and Their Metal Salts: A Review of Their Infrared Spectra in Light of Their Presence in Cultural Heritage, *Molecules* 26 (2021) 6005. <https://doi.org/10.3390/molecules26196005>.
- [14] K. Keune, *Binding Medium, Pigments and metal soaps characterised and localised in paint cross-sections*, Ph.D. thesis, University of Amsterdam, 2005.
- [15] B. Slánský, *Technika malby I. Díl, Malířský a conservační materiál*, Státní Nakladatelství Krásné Literatury, Hudby a Umění, Praha, 1953.
- [16] J.M. Madariaga, Analytical chemistry in the field of cultural heritage, *Anal. Methods* 7 (2015) 4848–4876. <https://doi.org/10.1039/C5AY00072F>.

- [17] J. La Nasa, E. Ghelardi, I. Degano, F. Modugno, M.P. Colombini, Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer, *J. Chromatogr. A* 1308 (2013) 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.015>.
- [18] I. Degano, J. La Nasa, E. Ghelardi, F. Modugno, M.P. Colombini, Model study of modern oil-based paint media by triacylglycerol profiling in positive and negative ionization modes, *Talanta* 161 (2016) 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.017>.
- [19] M.S. Copley, H.A. Bland, P. Rose, M. Horton, R.P. Evershed, Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopic investigations of organic residues of plant oils and animal fats employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt, *The Analyst* 130 (2005) 860. <https://doi.org/10.1039/b500403a>.
- [20] F. Modugno, F. Di Gianvincenzo, I. Degano, I.D. Van Der Werf, I. Bonaduce, K.J. Van Den Berg, On the influence of relative humidity on the oxidation and hydrolysis of fresh and aged oil paints, *Sci. Rep.* 9 (2019) 5533. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41893-9>.
- [21] M. Schilling, D. Carson, H. Khanjian, Gas chromatographic determination of the fatty acid and glycerol content of lipids IV. Evaporation of fatty acids and the formation of ghost images by framed oil paintings, In Proceedings of the ICOM Committee for Conservation Preprints, 11th Triennial Meeting, Edinburgh, UK, 1–6 September 1996; pp. 220–227
- [22] J.D.J. Van Den Berg, K.J. Van Den Berg, J.J. Boon, Identification of non-cross-linked compounds in methanolic extracts of cured and aged linseed oil-based paint films using gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 195–211. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00049-3).
- [23] I. Bonaduce, E. Ribechini, F. Modugno, M.P. Colombini, Analytical Approaches Based on Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) to Study Organic Materials in Artworks and Archaeological Objects, *Top. Curr. Chem.* 374 (2016) 6. <https://doi.org/10.1007/s41061-015-0007-x>.
- [24] M.P. Colombini, F. Modugno, M. Giacomelli, S. Francesconi, Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 113–124. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00344-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00344-1).
- [25] C.I. Keeling, J. Bohlmann, Diterpene resin acids in conifers, *Phytochemistry* 67 (2006) 2415–2423. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.019>.
- [26] E. Ragazzi, A. R. Schmidt, Amber in J. Reitner, V. Thiel (ed.) *Encyclopedia of geobiology*, Springer, Dordrecht, 2011. pp. 24–36.
- [27] C. Azemard, M. Menager, C. Vieillescazes, Analysis of diterpenic compounds by GC-MS/MS: contribution to the identification of main conifer resins, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6599–6612. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9772-9>.
- [28] D. Scalarone, J. Van Der Horst, J.J. Boon, O. Chiantore, Direct-temperature mass spectrometric detection of volatile terpenoids and natural terpenoid polymers in fresh and artificially aged resins, *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 607–617. <https://doi.org/10.1002/jms.470>.
- [29] I. Pastorova, K.J. Van Der Berg, J.J. Boon, J.W. Verhoeven, Analysis of oxidised diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMAH, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 43 (1997) 41–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(97\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(97)00058-2).

- [30] A.M. Pollard, C. Heron, R.D. Gillard, The chemistry and use of resinous substance in A.M. Pollard, C. Heron, R.D. Gillard (ed.), *Archaeological Chemistry*, second ed., Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), 2008. 235-261
- [31] E. Manzano, L.R. Rodríguez-Simón, N. Navas, R. Checa-Moreno, M. Romero-Gómez, L.F. Capitán-Vallvey, Study of the GC–MS determination of the palmitic–stearic acid ratio for the characterisation of drying oil in painting: La Encarnación by Alonso Cano as a case study, *Talanta* 84 (2011) 1148–1154. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.012>.
- [32] K.J.V.D. Berg, J.J. Boon, I. Pastorova, L.F.M. Spetter, Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acids in Old Master paintings, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 512–533. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200004\)35:4<512::AID-JMS963>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200004)35:4<512::AID-JMS963>3.0.CO;2-3).
- [33] K.J. van den Berg, Mass spectrometric methodology for the analysis of highly oxidized diterpenoid acid in Old Master paintings part 2. LCMS and DTMS studies. Index for the degree of oxidation., in *Molart report 10 Analysis of diterpenoid resins and polymers in paint media and varnishes: with an atlas of mass spectra*, FOM Institute AMOLF; Amsterdam, 2003. pp.33-48
- [34] C.D. Doan, C.M. To, M. De Vrieze, F. Lynen, S. Danthine, A. Brown, K. Dewettinck, A.R. Patel, Chemical profiling of the major components in natural waxes to elucidate their role in liquid oil structuring, *Food Chem.* 214 (2017) 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.123>.
- [35] N. Garnier, C. Cren-Olivé, C. Rolando, M. Regert, Characterization of Archaeological Beeswax by Electron Ionization and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4868–4877. <https://doi.org/10.1021/ac025637a>.
- [36] P.E. Kolattukudy (ed.), *Chemistry and biochemistry of natural waxes*, Elsevier, New York, 1976.
- [37] A.P. Tulloch, Beeswax: Structure of the esters and their component hydroxy acids and diols, *Chem. Phys. Lipids* 6 (1971) 235–265. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(71\)90063-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(71)90063-6).
- [38] M. Regert, S. Colinart, L. Degrand, O. Decavallas, Chemical Alteration and Use of Beeswax Through Time: Accelerated Ageing Tests and Analysis of Archaeological Samples from Various Environmental Contexts, *Archaeometry* 43 (2001) 549–569. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.00036>.
- [39] S. Charters, R.P. Evershed, P.W. Blinkhorn, V. Denham, evidence for the mixing of fats and waxes in archaeological ceramics, *Archaeometry* 37 (1995) 113–127. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1995.tb00730.x>.
- [40] V. Pitthard, M. Griesser, S. Stanek, T. Bayerova, Study of Complex Organic Binding Media Systems on Artworks Applying GC-MS Analysis: Selected Examples from the Kunsthistorisches Museum, Vienna, *Macromol. Symp.* 238 (2006) 37–45. <https://doi.org/10.1002/masy.200650606>.
- [41] B. Witkowski, A. Duchnowicz, M. Ganeczko, A. Laudy, T. Gierczak, M. Biesaga, Identification of proteins, drying oils, waxes and resins in the works of art micro-samples by chromatographic and mass spectrometric techniques, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 630–638. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700937>.
- [42] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, third ed., Wiley, Chichester, 2007.

- [43] M. Abdel-Ghani, H.G.M. Edwards, B. Stern, R. Janaway, Characterization of paint and varnish on a medieval Coptic-Byzantine icon: Novel usage of dammar resin, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 73 (2009) 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.10.050>.
- [44] J. Blaško, R. Kubinec, B. Husová, P. Přikryl, V. Pacáková, K. Štulík, J. Hradilová, Gas chromatography/mass spectrometry of oils and oil binders in paintings, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1067–1073. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700449>.
- [45] I. Bonaduce, C. Blaensdorf, P. Dietemann, M.P. Colombini, The binding media of the polychromy of Qin Shihuang's Terracotta Army, *J. Cult. Herit.* 9 (2008) 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2007.08.002>.
- [46] L.R. Čukovska, B. Minčeva – Šukarova, A. Lluveras-Tenorio, A. Andreotti, M.P. Colombini, I. Nastova, Micro-Raman and GC/MS analysis to characterize the wall painting technique of Dicho Zograph in churches from Republic of Macedonia, *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 1685–1693. <https://doi.org/10.1002/jrs.4183>.
- [47] H. Ling, N. Maiqian, G. Chiavari, R. Mazzeo, Analytical characterization of binding medium used in ancient Chinese artworks by pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry, *Microchem. J.* 85 (2007) 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.08.003>.
- [48] I.D. Van Der Werf, R. Gnisci, D. Marano, G.E. De Benedetto, R. Laviano, D. Pellerano, F. Vona, F. Pellegrino, E. Andriani, I.M. Catalano, A.F. Pellerano, L. Sabbatini, San Francesco d'Assisi (Apulia, South Italy): Study of a manipulated 13th century panel painting by complementary diagnostic techniques, *J. Cult. Herit.* 9 (2008) 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2007.10.003>.
- [49] M.P. Colombini, A. Andreotti, I. Bonaduce, F. Modugno, E. Ribechini, Analytical Strategies for Characterizing Organic Paint Media Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 715–727. <https://doi.org/10.1021/ar900185f>.
- [50] A. Casoli, P.C. Musini, G. Palla, Gas chromatographic-mass spectrometric approach to the problem of characterizing binding media in paintings, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 237–246. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01194-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01194-3).
- [51] I. Bonaduce, M.P. Colombini, Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry procedures, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.086>.
- [52] A. Andreotti, I. Bonaduce, M.P. Colombini, G. Gautier, F. Modugno, E. Ribechini, Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy, Resinous, and Proteinaceous Materials in a Unique Paint Microsample, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4490–4500. <https://doi.org/10.1021/ac0519615>.
- [53] M.P. Colombini, F. Modugno, R. Fuoco, A. Tognazzi, A GC-MS study on the deterioration of lipidic paint binders, *Microchem. J.* 73 (2002) 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(02\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00062-0).
- [54] G. Gautier, M. Colombini, GC–MS identification of proteins in wall painting samples: A fast clean-up procedure to remove copper-based pigment interferences, *Talanta* 73 (2007) 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.008>.
- [55] I. Bonaduce, M. Cito, M.P. Colombini, The development of a gas chromatographic–mass spectrometric analytical procedure for the determination of lipids, proteins and resins in

- the same paint micro-sample avoiding interferences from inorganic media, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5931–5939. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.033>.
- [56] M.P. Colombini, G. Giachi, F. Modugno, P. Pallecchi, E. Ribechini, The characterization of paints and waterproofing materials from the shipwrecks found at the archeological site of the Etruscan and Roman harbour of Pisa (Italy), *Archaeometry* 45 (2003) 659–674. <https://doi.org/10.1046/j.1475-4754.2003.00135.x>.
- [57] L. Rampazzi, F. Cariati, G. Tanda, M.P. Colombini, Characterisation of wall paintings in the Sos Furrighesos necropolis (Anela, Italy), *J. Cult. Herit.* 3 (2002) 237–240. [https://doi.org/10.1016/S1296-2074\(02\)01180-9](https://doi.org/10.1016/S1296-2074(02)01180-9).
- [58] I. Degano, F. Modugno, I. Bonaduce, E. Ribechini, M.P. Colombini, Recent Advances in Analytical Pyrolysis to Investigate Organic Materials in Heritage Science, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 7313–7323. <https://doi.org/10.1002/anie.201713404>.
- [59] J. De La Cruz-Cañizares, M.-T. Doménech-Carbó, J.-V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, F. Bosch-Reig, Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 177–194. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.058>.
- [60] V. Pauk, P. Barták, K. Lemr, Characterization of natural organic colorants in historical and art objects by high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3393–3410. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400650>.
- [61] I. Degano, E. Ribechini, F. Modugno, M.P. Colombini, Analytical Methods for the Characterization of Organic Dyes in Artworks and in Historical Textiles, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 363–410. <https://doi.org/10.1080/05704920902937876>.
- [62] E. Rosenberg, Characterisation of historical organic dyestuffs by liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 33–57. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1977-0>.
- [63] S. Orsini, A. Yadav, M. Dilillo, L.A. McDonnell, I. Bonaduce, Characterization of Degraded Proteins in Paintings Using Bottom-Up Proteomic Approaches: New Strategies for Protein Digestion and Analysis of Data, *Anal. Chem.* 90 (2018) 6403–6408. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00281>.
- [64] S. Kuckova, I.C.A. Sandu, M. Crhova, R. Hynek, I. Fogas, V.S. Muralha, A.V. Sandu, Complementary cross-section based protocol of investigation of polychrome samples of a 16th century Moravian Sculpture by optical, vibrational and mass spectrometric techniques, *Microchem. J.* 110 (2013) 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.07.002>.
- [65] J. La Nasa, F. Modugno, I. Degano, Liquid chromatography and mass spectrometry for the analysis of acylglycerols in art and archeology, *Mass Spectrom. Rev.* 40 (2021) 381–407. <https://doi.org/10.1002/mas.21644>.
- [66] I. Degano, Liquid chromatography: Current applications in Heritage Science and recent developments, *Phys. Sci. Rev.* 4, no 5 (2019) 20180009. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0009>.
- [67] F.-F. Hsu, J. Turk, Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 587–599. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(99\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(99)00035-5).

- [68] R.M. Alberici, R.C. Simas, G.B. Sanvido, W. Romão, P.M. Lalli, M. Benassi, I.B.S. Cunha, M.N. Eberlin, Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world,” *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 265–294. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3808-3>.
- [69] J.T. Shelley, S.P. Badal, C. Engelhard, H. Hayen, Ambient desorption/ionization mass spectrometry: evolution from rapid qualitative screening to accurate quantification tool, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4061–4076. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1023-9>.
- [70] D.R. Ifa, A.U. Jackson, G. Patila, R.G. Cooks, Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 1995–2008. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2659-2>
- [71] X.-L. Zhang, H. Zhang, X.-C. Wang, K.-K. Huang, D. Wang, H.-W. Chen, Advances in Ambient Ionization for Mass Spectrometry, *Chin. J. Anal. Chem.* 46 (2018) 1703–1713. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(18\)61122-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61122-3).
- [72] M.D.B. Ena, D.A. Cowan, V. Abbate, Ambient ionization mass spectrometry applied to new psychoactive substance analysis, *Mass Spectrom. Rev.* 42 (2023) 3–34. <https://doi.org/10.1002/mas.21695>.
- [73] R.G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, J.M. Wiseman, Ambient Mass Spectrometry, *Science* 311 (2006) 1566–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1119426>.
- [74] B.J. McCullough, K. Patel, R. Francis, P. Cain, D. Douce, K. Whyatt, S. Bajic, N. Lumley, C. Hopley, Atmospheric Solids Analysis Probe Coupled to a Portable Mass Spectrometer for Rapid Identification of Bulk Drug Seizures, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31 (2020) 386–393. <https://doi.org/10.1021/jasms.9b00020>.
- [75] T. Schneider, B.L. Oyler, S.H. Yoon, T. Liang, G.S. Yen, D.P.A. Kilgour, E. Nilsson, D.R. Goodlett, Rapid Food Product Analysis by Surface Acoustic Wave Nebulization Coupled Mass Spectrometry, *Food Anal. Methods* 11 (2018) 2447–2454. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1232-z>.
- [76] C. Selvius DeRoo, R.A. Armitage, Direct Identification of Dyes in Textiles by Direct Analysis in Real Time-Time of Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6924–6928. <https://doi.org/10.1021/ac201747s>.
- [77] P. Humphrey, The Use of Mass Spectrometry to Differentiate Blue Dyes From Indigo and Woad, *McNair Scholars Research Journal* 10 (2017) article 7.
- [78] A. Alvarez-Martin, T.P. Cleland, G.M. Kavich, K. Janssens, G.A. Newsome, Rapid Evaluation of the Debromination Mechanism of Eosin in Oil Paint by Direct Analysis in Real Time and Direct Infusion-Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10856–10863. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02568>.
- [79] D. Fraser, C.S. DeRoo, R.B. Cody, R.A. Armitage, Characterization of blood in an encrustation on an African mask: spectroscopic and direct analysis in real time mass spectrometric identification of haem, *The Analyst* 138 (2013) 4470. <https://doi.org/10.1039/c3an00633f>.
- [80] R.A. Armitage, P. Bueno-Ramírez, R. De Balbín-Behrmann, R. Martineau, F. Carrera-Ramírez, T. Fairchild, J. Southon, Charcoal-painted images from the French Neolithic Villevenard hypogea: an experimental protocol for radiocarbon dating of conserved and in situ carbon with consolidant contamination, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 12 (2020) 123. <https://doi.org/10.1007/s12520-020-01077-3>.

- [81] J. Geiger, R.A. Armitage, C.S. DeRoo, Identification of Organic Dyes by Direct Analysis in Real Time-Time of Flight Mass Spectrometry, in: P.L. Lang, R.A. Armitage (ed.), ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, 2012. pp. 123–129.
- [82] M. Manfredi, E. Robotti, G. Bearman, F. France, E. Barberis, P. Shor, E. Marengo, Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry for the Nondestructive Investigation of Conservation Treatments of Cultural Heritage, *J. Anal. Methods Chem.* 2016 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/6853591>.
- [83] P. Aguilar-Rodríguez, A. Mejía-González, S. Zetina, A. Colin-Molina, B. Rodríguez-Molina, N. Esturau-Escofet, Unexpected behavior of commercial artists' acrylic paints under UVA artificial aging, *Microchem. J.* 160 (2021) 105743. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105743>.
- [84] R.A. Armitage, K. Jakes, C. Day, Direct analysis in real time-mass spectroscopy for identification of red dye colourants in Paracas Necropolis Textiles, *STAR Sci. Technol. Archaeol. Res.* 1 (2015) 60–69. <https://doi.org/10.1179/2054892315Y.0000000009>.
- [85] K.E. Watts, A.F. Lagalante, Method development for binding media analysis in painting cross-sections by desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018) 1324–1330. <https://doi.org/10.1002/rcm.8184>.
- [86] E. Sandström, C. Vettorazzo, C.L. Mackay, L.G. Troalen, A.N. Hulme, Historical Textile Dye Analysis Using DESI-MS, *Heritage* 6 (2023) 4042–4053. <https://doi.org/10.3390/heritage6050212>.
- [87] Z. Zhou, L. Shen, N. Wang, X. Ren, J. Yang, Y. Shi, H. Zhang, Identification of Organic Materials Used in Gilding Technique in Wall Paintings of Kizil Grottoes, *ChemistrySelect* 5 (2020) 818–822. <https://doi.org/10.1002/slct.201903688>.
- [88] A. Kramell, F. Porbeck, R. Kluge, A. Wiesner, R. Csuk, A fast and reliable detection of indigo in historic and prehistoric textile samples, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 1039–1043. <https://doi.org/10.1002/jms.3625>.
- [89] L. Kučera, J. Peška, P. Fojtík, P. Barták, P. Kučerová, J. Pavelka, V. Komárková, J. Beneš, L. Polcerová, M. Králík, P. Bednář, First direct evidence of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) in Central Europe, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 11 (2019) 4221–4227. <https://doi.org/10.1007/s12520-019-00798-4>.
- [90] J. Campos Ayala, S. Mahan, B. Wilson, K. Antúnez De Mayolo, K. Jakes, R. Stein, R.A. Armitage, Characterizing the Dyes of Pre-Columbian Andean Textiles: Comparison of Ambient Ionization Mass Spectrometry and HPLC-DAD, *Heritage* 4 (2021) 1639–1660. <https://doi.org/10.3390/heritage4030091>.
- [91] A. Astefanei, M. Van Bommel, G.L. Corthals, Surface Acoustic Wave Nebulisation Mass Spectrometry for the Fast and Highly Sensitive Characterisation of Synthetic Dyes in Textile Samples, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (2017) 2108–2116. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1716-x>.
- [92] A. Astefanei, K.J. Van Den Berg, A. Burnstock, G. Corthals, Surface Acoustic Wave Nebulization–Mass Spectrometry as a New Tool to Investigate the Water Sensitivity Behavior of 20th Century Oil Paints, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32 (2021) 444–454. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00272>.
- [93] S. Mirabaud, C. Rolando, M. Regert, Molecular Criteria for Discriminating Adipose Fat and Milk from Different Species by NanoESI MS and MS/MS of Their Triacylglycerols:

Application to Archaeological Remains, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6182–6192. <https://doi.org/10.1021/ac070594p>.

[94] I. Bonaduce, M.P. Colombini, I. Degano, F. Di Girolamo, J. La Nasa, F. Modugno, S. Orsini, Mass spectrometric techniques for characterizing low-molecular-weight resins used as paint varnishes, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1047–1065. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6502-9>.

[95] N. Garnier, C. Rolando, J.M. Høtje, C. Tokarski, Analysis of archaeological triacylglycerols by high resolution nanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th century BC–4th century AD oil lamps from Olbia (Ukraine), *Int. J. Mass Spectrom.* 284 (2009) 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2009.03.003>.

[96] Y. Liu, X. Ma, Z. Lin, M. He, G. Han, C. Yang, Z. Xing, S. Zhang, X. Zhang, Imaging Mass Spectrometry with a Low-Temperature Plasma Probe for the Analysis of Works of Art, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 4435–4437. <https://doi.org/10.1002/anie.200906975>.

[97] S. Vahur, A. Teearu, T. Haljasorg, P. Burk, I. Leito, I. Kaljurand, Analysis of dammar resin with MALDI-FT-ICR-MS and APCI-FT-ICR-MS: Study of dammar resin with MALDI-FT-ICR-MS and APCI-FT-ICR-MS, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 392–409. <https://doi.org/10.1002/jms.2971>.

[98] D. Scalarone, M.C. Duursma, J.J. Boon, O. Chiantore, MALDI-TOF mass spectrometry on cellulosic surfaces of fresh and photo-aged di- and triterpenoid varnish resins, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 1527–1535. <https://doi.org/10.1002/jms.893>.

[99] C.D. Calvano, I.D. Van Der Werf, F. Palmisano, L. Sabbatini, Identification of lipid and protein-based binders in paintings by direct on-plate wet chemistry and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1015–1022. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8359-6>.

[100] T. Dutta, T. Steklý, L. Kučera, K. Lemr, Dual-polarity MALDI mass spectrometry and imaging of oil binders and fatty acids in artworks using cyanographene as a single matrix, *Talanta* 242 (2022) 123291. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123291>.

[101] F.G. Hoogland, J.J. Boon, Development of MALDI-MS and nano-ESI-MS methodology for the full identification of poly(ethylene glycol) additives in artists' acrylic paints, *Int. J. Mass Spectrom.* 284 (2009) 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2009.03.001>.

[102] O.F. Van Den Brink, J.J. Boon, P.B. O'Connor, M.C. Duursma, R.M.A. Heeren, Matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of oxygenated triglycerides and phosphatidylcholines in egg tempera paint dosimeters used for environmental monitoring of museum display conditions, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 479–492. <https://doi.org/10.1002/jms.145>.

[103] J.D.J. Van Den Berg, N.D. Vermist, L. Carlyle, M. Holčapek, J.J. Boon, Effects of traditional processing methods of linseed oil on the composition of its triacylglycerols, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 181–199. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301610>.

[104] C.D. Calvano, I.D. Van Der Werf, F. Palmisano, L. Sabbatini, Fingerprinting of egg and oil binders in painted artworks by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of lipid oxidation by-products, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2229–2240. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4919-1>.

[105] I.D. Van Der Werf, C.D. Calvano, F. Palmisano, L. Sabbatini, A simple protocol for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-

MS) analysis of lipids and proteins in single microsamples of paintings, *Anal. Chim. Acta* 718 (2012) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.056>.

[106] R. Hynek, S. Kuckova, J. Hradilova, M. Kodicek, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as a tool for fast identification of protein binders in color layers of paintings, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1896–1900. <https://doi.org/10.1002/rcm.1570>.

[107] T. Tripković, C. Charvy, S. Alves, A.Đ. Lolić, R.M. Baošić, S.D. Nikolić-Mandić, J.C. Tabet, Identification of protein binders in artworks by MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry, *Talanta* 113 (2013) 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.071>.

[108] S. Zumbühl, R. Knochenmuss, S. Wülfert, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi, A Graphite-Assisted Laser Desorption/Ionization Study of Light-Induced Aging in Triterpene Dammar and Mastic Varnishes, *Anal. Chem.* 70 (1998) 707–715. <https://doi.org/10.1021/ac970574v>.

[109] P. Dietemann, M.J. Edelmann, C. Meisterhans, C. Pfeiffer, S. Zumbühl, R. Knochenmuss, R. Zenobi, Artificial Photoaging of Triterpenes Studied by Graphite-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Helv. Chim. Acta* 83 (2000) 1766–1777. [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(20000809\)83:8<1766::AID-HLCA1766>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1522-2675(20000809)83:8<1766::AID-HLCA1766>3.0.CO;2-X).

[110] C.N. McEwen, R.G. McKay, B.S. Larsen, Analysis of Solids, Liquids, and Biological Tissues Using Solids Probe Introduction at Atmospheric Pressure on Commercial LC/MS Instruments, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7826–7831. <https://doi.org/10.1021/ac051470k>.

[111] M. Farenc, Y.E. Corilo, P.M. Lalli, E. Riches, R.P. Rodgers, C. Afonso, P. Giusti, Comparison of Atmospheric Pressure Ionization for the Analysis of Heavy Petroleum Fractions with Ion Mobility-Mass Spectrometry, *Energy Fuels* 30 (2016) 8896–8903. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b01191>.

[112] C. Wu, K. Qian, C.C. Walters, A. Mennito, Application of atmospheric pressure ionization techniques and tandem mass spectrometry for the characterization of petroleum components, *Int. J. Mass Spectrom.* 377 (2015) 728–735. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.08.019>.

[113] A. Ahmed, Y.J. Cho, M. No, J. Koh, N. Tomczyk, K. Giles, J.S. Yoo, S. Kim, Application of the Mason–Schamp Equation and Ion Mobility Mass Spectrometry To Identify Structurally Related Compounds in Crude Oil, *Anal. Chem.* 83 (2011) 77–83. <https://doi.org/10.1021/ac101934q>.

[114] O. Järvik, V. Oja, Molecular Weight Distributions and Average Molecular Weights of Pyrolysis Oils from Oil Shales: Literature Data and Measurements by Size Exclusion Chromatography (SEC) and Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectroscopy (ASAP MS) for Oils from Four Different Deposits, *Energy Fuels* 31 (2017) 328–339. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02452>.

[115] M. Driffield, E. Bradley, L. Castle, A. Lloyd, M. Parmar, D. Speck, D. Roberts, S. Stead, Use of atmospheric pressure solids analysis probe time-of-flight mass spectrometry to screen for plasticisers in gaskets used in contact with foods, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 1603–1610. <https://doi.org/10.1002/rcm.7255>.

[116] G. Gaiffe, R.B. Cole, S. Lacpatia, M.C. Bridoux, Characterization of Fluorinated Polymers by Atmospheric-Solid-Analysis-Probe High-Resolution Mass Spectrometry (ASAP/HRMS) Combined with Kendrick-Mass-Defect Analysis, *Anal. Chem.* 90 (2018) 6035–6042. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05116>.

- [117] D. Lebeau, M. Ferry, Direct characterization of polyurethanes and additives by atmospheric solid analysis probe with time-of-flight mass spectrometry (ASAP-TOF-MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 7175–7187. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8881-1>.
- [118] Y.-G. Wang, X.-Y. Wei, J. Liu, Z.-K. Li, S.-Z. Wang, Y.-H. Wang, G.-J. Kang, X. Fan, Z.-M. Zong, Analysis of some coal-related model compounds and coal derivatives with atmospheric solids analysis probe mass spectrometer, *Fuel* 128 (2014) 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.03.005>.
- [119] P. Li, Z.-M. Zong, F.-J. Liu, Y.-G. Wang, X.-Y. Wei, X. Fan, Y.-P. Zhao, W. Zhao, Sequential extraction and characterization of liquefaction residue from Shenmu–Fugu subbituminous coal, *Fuel Process. Technol.* 136 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.04.013>.
- [120] Z.-K. Li, X.-Y. Wei, Z.-S. Yang, H.-L. Yan, Z.-H. Wei, Y. Li, Z.-M. Zong, Characterization of Extracts from Geting Bituminous Coal, *Anal. Lett.* 48 (2015) 1494–1501. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.989529>.
- [121] X. Xiao, L.L. Miller, K.J. Parchert, D. Hayes, J.M. Hochrein, Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for the rapid identification of pollens and semi-quantification of flavonoid fingerprints, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30 (2016) 1639–1646. <https://doi.org/10.1002/rcm.7601>.
- [122] D. Carrizo, I. Nerín, C. Domeño, P. Alfaro, C. Nerín, Direct screening of tobacco indicators in urine and saliva by Atmospheric Pressure Solid Analysis Probe coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry (ASAP-MS-Q-TOF-), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124 (2016) 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.033>.
- [123] M. Cechová, I. Hradilová, P. Smýkal, P. Barták, P. Bednář, Utilization of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry for analysis of fatty acids on seed surface, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1551-3>.
- [124] E. Jagerdeo, J.A. Clark, J.N. Leibowitz, L.J. Reda, Rapid analysis of forensic samples using an atmospheric solid analysis probe interfaced to a linear ion trap mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 205–212. <https://doi.org/10.1002/rcm.7097>.
- [125] D. Fabregat-Safont, D. Felis-Brittes, M. Mata-Pesquera, J.V. Sancho, F. Hernández, M. Ibáñez, Direct and Fast Screening of New Psychoactive Substances Using Medical Swabs and Atmospheric Solids Analysis Probe Triple Quadrupole with Data-Dependent Acquisition, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31 (2020) 1610–1614. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00112>.
- [126] R.J. Fussell, D. Chan, M. Sharman, An assessment of atmospheric-pressure solids-analysis probes for the detection of chemicals in food, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1326–1335. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.08.004>.
- [127] M.R.L. Paine, P.J. Barker, S.J. Blanksby, Ambient ionisation mass spectrometry for the characterisation of polymers and polymer additives: A review, *Anal. Chim. Acta* 808 (2014) 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.001>.
- [128] M. Smoluch, P. Mielczarek, J. Silberring, Plasma-based ambient ionization mass spectrometry in bioanalytical sciences, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 22–34. <https://doi.org/10.1002/mas.21460>.
- [129] M. Doué, G. Dervilly-Pinel, A. Gicquiau, K. Pouponneau, F. Monteau, B. Le Bizec, High Throughput Identification and Quantification of Anabolic Steroid Esters by Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry for Efficient Screening of Drug Preparations, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5649–5655. <https://doi.org/10.1021/ac501072g>.

- [130] M. Regert, C. Rolando, Identification of Archaeological Adhesives Using Direct Inlet Electron Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 965–975. <https://doi.org/10.1021/ac0155862>.
- [131] F. Modugno, E. Ribechini, M.P. Colombini, Chemical study of triterpenoid resinous materials in archaeological findings by means of direct exposure electron ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1787–1800. <https://doi.org/10.1002/rcm.2507>.
- [132] E. Ribechini, F. Modugno, C. Baraldi, P. Baraldi, M.P. Colombini, An integrated analytical approach for characterizing an organic residue from an archaeological glass bottle recovered in Pompeii (Naples, Italy), *Talanta* 74 (2008) 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.026>.
- [133] S. Krieger, O.J. Schmitz, Non-destructive plasticizer screening using a direct inlet probe-atmospheric pressure chemical ionization source and ion trap mass spectrometry: Plasticizer screening using DIP-APCI-MS, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 1862–1870. <https://doi.org/10.1002/rcm.6972>.
- [134] L. Kučera, L. Richtera, P. Bednář, V. Zemek, Z. Žingor, K. Jagošová, 3.2.1. Metody spektrální, in.: P. Bednář, L. Kučera (ed.), *Moderní chemické metody v archeologii*, Vydavatelství UP, Olomouc 2021.
- [135] C. Petucci, J. Diffendal, Atmospheric solids analysis probe: a rapid ionization technique for small molecule drugs, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1565–1568. <https://doi.org/10.1002/jms.1424>.
- [136] T. Fouquet, C. Barrère-Mangote, M. Farenc, C. Afonso, P. Giusti, Atmospheric solid analysis probe mass spectrometry vs electrospray tandem mass spectrometry of polydimethylsiloxanes in positive and negative ionization modes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 982–986. <https://doi.org/10.1002/rcm.7182>.
- [137] M.J.P. Smith, N.R. Cameron, J.A. Mosely, Evaluating Atmospheric pressure Solids Analysis Probe (ASAP) mass spectrometry for the analysis of low molecular weight synthetic polymers, *The Analyst* 137 (2012) 4524. <https://doi.org/10.1039/c2an35556f>.
- [138] C. Barrère, M. Hubert-Roux, C. Afonso, A. Racaud, Rapid analysis of lubricants by atmospheric solid analysis probe–ion mobility mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 709–715. <https://doi.org/10.1002/jms.3404>.
- [139] I. Dzidic, D.I. Carroll, R.N. Stillwell, E.C. Horning, Comparison of positive ions formed in nickel-63 and corona discharge ion sources using nitrogen, argon, isobutane, ammonia and nitric oxide as reagents in atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 48 (1976) 1763–1768. <https://doi.org/10.1021/ac50006a035>.
- [140] L. Song, A.D. Wellman, H. Yao, J.E. Bartmess, Negative ion-atmospheric pressure photoionization: Electron capture, dissociative electron capture, proton transfer, and anion attachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1789–1798. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.07.015>.
- [141] C.N. McEwen, B.S. Larsen, Ionization mechanisms related to negative Ion APPI, APCI, and DART, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1518–1521. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.010>.
- [142] P. Lee, M. Brian, M. Balogh, S. Eaton, Improving organic synthesis workflow efficiency: Using rapid ambient sampling mass spectrometry, *chimica oggi/Chemistry Today* 29 (2011) 24–26.

- [143] S. Chakrabarty, V.S. Pagnotti, E.D. Inutan, S. Trimpin, C.N. McEwen, A New Matrix Assisted Ionization Method for the Analysis of Volatile and Nonvolatile Compounds by Atmospheric Probe Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24 (2013) 1102–1107. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0634-9>.
- [144] A.L. Mendes Siqueira, M. Beaumesnil, M. Hubert-Roux, C. Loutelier-Bourhis, C. Afonso, Y. Bai, M. Courtiade, A. Racaud, Atmospheric Solid Analysis Probe Coupled to Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry, a Fast and Simple Method for Polyalphaolefin Characterization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 1678–1687. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-1991-1>.
- [145] M. Twohig, J.P. Shockcor, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, R.S. Plumb, Use of an Atmospheric Solids Analysis Probe (ASAP) for High Throughput Screening of Biological Fluids: Preliminary Applications on Urine and Bile, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 3590–3597. <https://doi.org/10.1021/pr100120g>.
- [146] A.D. Ray, J. Hammond, H. Major, Molecular Ions and Protonated Molecules Observed in the Atmospheric Solids Analysis Probe Analysis of Steroids, *Eur. J. Mass Spectrom.* 16 (2010) 169–174. <https://doi.org/10.1255/ejms.1069>.
- [147] Ismet. Dzidic, D.I. Carroll, R.N. Stillwell, E.C. Horning, Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Formation of phenoxide ions from chlorinated aromatic compounds, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1308–1312. <https://doi.org/10.1021/ac60358a077>.
- [148] A.B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, H.H. Hill, Ion mobility–mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 1–22. <https://doi.org/10.1002/jms.1383>.
- [149] J.W. Lee, Basics of Ion Mobility Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Lett.* 8 (2017) 79–89. <https://doi.org/10.5478/MSL.2017.8.4.79>.
- [150] M.E. Ridgeway, C. Bleiholder, M. Mann, M.A. Park, Trends in trapped ion mobility – Mass spectrometry instrumentation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 116 (2019) 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.030>.
- [151] F. Lanucara, S.W. Holman, C.J. Gray, C.E. Eyers, The power of ion mobility-mass spectrometry for structural characterization and the study of conformational dynamics, *Nat. Chem.* 6 (2014) 281–294. <https://doi.org/10.1038/nchem.1889>.
- [152] R. Cumeras, E. Figueras, C.E. Davis, J.I. Baumbach, I. Gràcia, Review on Ion Mobility Spectrometry. Part 1: current instrumentation, *The Analyst* 140 (2015) 1376–1390. <https://doi.org/10.1039/C4AN01100G>.
- [153] C. Laphorn, F. Pullen, B.Z. Chowdhry, Ion mobility spectrometry-mass spectrometry (IMS-MS) of small molecules: Separating and assigning structures to ions, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013) 43–71. <https://doi.org/10.1002/mas.21349>.
- [154] H. Pan, G. Lundin, Rapid Detection and Identification of Impurities in Ten 2-Naphthalenamines Using an Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe in Conjunction with Ion Mobility Mass Spectrometry, *Eur. J. Mass Spectrom.* 17 (2011) 217–225. <https://doi.org/10.1255/ejms.1125>.
- [155] E. Cossoul, M. Hubert-Roux, M. Sebban, F. Churlaud, H. Oulyadi, C. Afonso, Evaluation of atmospheric solid analysis probe ionization coupled to ion mobility mass spectrometry for characterization of poly(ether ether ketone) polymers, *Anal. Chim. Acta* 856 (2015) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.013>.

- [156] C. Barrère, W. Selmi, M. Hubert-Roux, T. Coupin, B. Assumani, C. Afonso, P. Giusti, Rapid analysis of polyester and polyethylene blends by ion mobility-mass spectrometry, *Polym Chem* 5 (2014) 3576–3582. <https://doi.org/10.1039/C4PY00164H>.
- [157] C. Barrère, F. Maire, C. Afonso, P. Giusti, Atmospheric Solid Analysis Probe–Ion Mobility Mass Spectrometry of Polypropylene, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9349–9354. <https://doi.org/10.1021/ac302109q>.
- [158] K. Giles, J. Ujma, J. Wildgoose, S. Pringle, K. Richardson, D. Langridge, M. Green, A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8564–8573. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01838>.
- [159] V. Pauk, J. Michalčáková, K. Jagošová, K. Lemr, Origin of indigo colorants revealed by ion mobility spectrometry coupled to mass spectrometry followed by supervised classification, *Dyes Pigments* 197 (2022) 109943. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109943>.
- [160] M. Doerner, *The materials of the artist and their use in painting, with notes on the techniques of the old masters*, chapter 3: Binding media of oil painting, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, 1984
- [161] W.M. Lauer, A.J. Aasen, G. Graff, R.T. Holman, Mass spectrometry of triglycerides: I. Structural effects, *Lipids* 5 (1970) 861–868. <https://doi.org/10.1007/BF02531117>.
- [162] J.S. Pizzo, V.H.M. Cruz, P.D.S. Santos, G.R. Silva, P.M. Souza, L.P. Manin, O.O. Santos, J.V. Visentainer, Instantaneous characterization of crude vegetable oils via triacylglycerols fingerprint by atmospheric solids analysis probe tandem mass spectrometry with multiple neutral loss scans, *Food Control* 134 (2022) 108710. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108710>.
- [163] Z.W. Wicks, F.N. Jones, S.P. Pappas, D.A. Wicks, *Drying oils in Z.W. Wicks, F.N. Jones, S.P. Pappas and D.A. Wicks (ed) Organic Coatings: Science and Technology*, third ed., Wiley, Hoboken, 2007. pp. 295-305.
- [164] M.D. Soucek, T. Khattab, J. Wu, Review of autoxidation and driers, *Prog. Org. Coat.* 73 (2012) 435–454. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2011.08.021>.
- [165] S. Sotiropoulou, G. Sciutto, A.L. Tenorio, J. Mazurek, I. Bonaduce, S. Prati, R. Mazzeo, M. Schilling, M.P. Colombini, Advanced analytical investigation on degradation markers in wall paintings, *Microchem. J.* 139 (2018) 278–294. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.007>.
- [166] G. Chiavari, N. Gandini, P. Russo, D. Fabbri, Characterisation of standard tempera painting layers containing proteinaceous binders by pyrolysis (/methylation)-gas chromatography-mass spectrometry, *Chromatographia* 47 (1998) 420–426. <https://doi.org/10.1007/BF02466473>.
- [167] G. Lercker, M. T. Rodriguez-Estrada, Cholesterol oxidation mechanism in F. Guardiola, (ed.), *Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 2002. pp. 1–25
- [168] B. Rossmann, K. Thurner, W. Luf, MS–MS Fragmentation Patterns of Cholesterol Oxidation Products, *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* 138 (2007) 437–444. <https://doi.org/10.1007/s00706-007-0589-2>.
- [169] M. Serefidou, S. Bracci, D. Tapete, A. Andreotti, L. Biondi, M.P. Colombini, C. Giannini, D. Parenti, Microchemical and microscopic characterization of the pictorial quality of egg-tempera polyptych, late 14th century, Florence, Italy, *Microchem. J.* 127 (2016) 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.03.001>.

- [170] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Ribechini, GC/MS in the Characterization of Lipids, in: M.P. Colombini, F. Modugno (ed.), *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, first ed., Wiley, Chichester 2009. pp. 189–213.
- [171] K. Jagošová, K. Lemr, P. Bednář, Application of atmospheric solids analysis probe mass spectrometry in analysis of binders used in art, Czech mass spectrometry conference 2019, Olomouc, ČR, 27–29.3.2019. (Book of Abstracts, p. 57). (poster).
- [172] K. Jagošová, P. Bednář, T. Závodná, R. Pechancová, J. Nádvoříková, M. Moník, P. Fojtík, L. Kučera, Utilization of Atmospheric Solids Analysis Probe mass spectrometry in analysis of cultural heritage, *Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2022*, Olomouc, ČR, 13. 6. – 16. 6. 2022. (Book of Abstracts, p. 116–117). (poster).
- [173] P. Fojtík, Toufarský mistr Jan Skřivánek z Prostějova aneb archeologie jednomu novověkému řemeslníkovi “na stopě,” *Střední Morava* (2017) 82–86.
- [174] K. Geislerová, D. Parma, *Výzkumy 2011-2016 = Ausgrabungen 2011-2016*, Ústav archeologické památkové péče Brno, Brno, 2018.
- [175] T. Závodná, *Analýza nábrusů vzorků z objektů hmotného kulturního dědictví*, diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2022.
- [176] B. Bajnóczi, G. Nagy, M. Tóth, I. Ringer, A. Ridovics, Archaeometric characterization of 17th-century tin-glazed Anabaptist (Hutterite) faience artefacts from North-East-Hungary, *J. Archaeol. Sci.* 45 (2014) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.01.030>.
- [177] H. Ma, J. Henderson, J. Evans, The Exploration of Sr Isotopic Analysis Applied to Chinese Glazes: Part Two: The exploration of Sr isotopic analysis applied to Chinese glazes: part two, *Archaeometry* 58 (2016) 68–80. <https://doi.org/10.1111/arc.12224>.
- [178] M.S. Tite, A.J. Shortland, N. Schibille, P. Degryse, New Data on the Soda Flux Used in the Production of Iznik Glazes and Byzantine Glasses: Soda flux used in Iznik glazes and Byzantine glasses, *Archaeometry* 58 (2016) 57–67. <https://doi.org/10.1111/arc.12156>.
- [179] A. Bouquillon, J. Castaing, F. Barbe, S.R. Paine, B. Christman, T. Crépin-Leblond, A.H. Heuer, Lead-Glazed *Rustiques Figulines* (Rustic Ceramics) of Bernard Palissy (1510-90) and his Followers: Lead-glazed rustiques figulines of Bernard Palissy and followers, *Archaeometry* 59 (2017) 69–83. <https://doi.org/10.1111/arc.12247>.
- [180] A. Bouquillon, J. Castaing, F. Barbe, T. Crepin-Leblond, L. Tilliard, S.R. Paine, B. Christman, A.H. Heuer, French Decorative Ceramics Mass-Produced During and After the 17th Century: Chemical Analyses of the Glazes: Mass-produced French decorative ceramics, *Archaeometry* 60 (2018) 946–965. <https://doi.org/10.1111/arc.12349>.
- [181] J.Y. Shen, J. Henderson, J. Evans, S. Chenery, F.Y. Zhao, A study of the glazing techniques and provenances of Tang *sancai* glazes using elemental and lead isotope analyses, *Archaeometry* 61 (2019) 358–373. <https://doi.org/10.1111/arc.12436>.
- [182] J.Y. Shen, H. Ma, J. Henderson, J. Evans, S. Chenery, F. Wang, R. Wen, Chemical and strontium isotope analysis of Yaozhou celadon glaze, *Archaeometry* 61 (2019) 1039–1052. <https://doi.org/10.1111/arc.12482>.
- [183] H. Ma, N. Wood, C. Doherty, J. Zheng, G. Zhou, H. Duan, New Insights into the Calcium Flux Used in Ancient Longquan and Yue Kilns Based on Strontium Isotopic Compositions, *Archaeometry* 61 (2019) 342–357. <https://doi.org/10.1111/arc.12420>.

- [184] X.Q. Zhou, J.F. Cui, X.Y. Ren, Q.Q. Wang, W. Du, Z.W. Du, X.Y. Liu, The Earliest High-Fired Glazed Ceramic in China: Evidence from a Glazed Ceramic Sample from the Lajia Site, Qinghai Province, *Archaeometry* 61 (2019) 588–599. <https://doi.org/10.1111/arcm.12447>.
- [185] C. Ting, A. Lichtenberger, R. Raja, The technology and production of glazed ceramics from Middle Islamic Jerash, Jordan, *Archaeometry* 61 (2019) 1296–1312. <https://doi.org/10.1111/arcm.12489>.
- [186] L. Medeghini, M. Fayek, S. Mignardi, F. Coletti, A. Contino, C. De Vito, A provenance study of Roman lead-glazed ceramics using lead isotopes and secondary ion mass spectrometry (SIMS), *Microchem. J.* 154 (2020) 104519. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104519>.
- [187] M. Kuzmanovic, A. Stancalie, D. Milovanovic, A. Staicu, Lj. Damjanovic-Vasilic, D. Rankovic, J. Savovic, Analysis of lead-based archaeological pottery glazes by laser induced breakdown spectroscopy, *Opt. Laser Technol.* 134 (2021) 106599. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2020.106599>.
- [188] M.B. Toffolo, E. Klein, R. Elbaum, A.J. Aja, D.M. Master, E. Boaretto, An early Iron Age assemblage of faience beads from Ashkelon, Israel: chemical composition and manufacturing process, *J. Archaeol. Sci.* 40 (2013) 3626–3635. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.05.010>.
- [189] M.C. Marco De Lucas, F. Moncada, J. Rosen, Micro-Raman study of red decorations in French faiences of the 18th and 19th centuries, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 1154–1159. <https://doi.org/10.1002/jrs.1596>.
- [190] M. Zaremba, J. Trzciński, M. Rogulska, G. Kaproń, F. Welc, A. Południkiewicz, A Multiproxy Approach to the Reconstruction of an Ancient Manufacturing Technology: A Case Study of a Faience Ptolemaic Bowl from Tell Atrib (Nile Delta), *Minerals* 10 (2020) 785. <https://doi.org/10.3390/min10090785>.
- [191] V. Pauk, V. Havlíček, B. Papoušková, P. Sulovský, K. Lemr, Simultaneous identification of historical pigments Prussian blue and indigo in paintings by electrospray mass spectrometry: Simultaneous identification of Prussian blue and indigo by ESI-MS, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 927–930. <https://doi.org/10.1002/jms.3228>.
- [192] L. Cartechini, C. Miliani, L. Nodari, F. Rosi, P. Tomasin, The chemistry of making color in art, *J. Cult. Herit.* 50 (2021) 188–210. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.05.002>.
- [193] E. Gliozzo, Pigments — Mercury-based red (cinnabar-vermilion) and white (calomel) and their degradation products, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 13 (2021) 210. <https://doi.org/10.1007/s12520-021-01402-4>.
- [194] P. Colomban, Rocks as blue, green and black pigments/dyes of glazed pottery and enamelled glass artefacts – A review, *Eur. J. Mineral.* 25 (2014) 863–879. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2013/0025-2305>.
- [195] I. C. Freestone, Composition and microstructure of early opaque red glass, early vitreous materials, *Br. Mus. Occas. Pap.* 56 (1987) 173–191.
- [196] V. Gedzevičiūtė, N. Welter, U. Schüssler, C. Weiss, Chemical composition and colouring agents of Roman mosaic and millefiori glass, studied by electron microprobe analysis and Raman microspectroscopy, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 1 (2009) 15–29. <https://doi.org/10.1007/s12520-009-0005-4>.
- [197] M. Gregorová, M. Hložek, Z. Kuljovská, Mikropetrografické a petrochemické rozbory novověké glazované keramiky z lokality Strachotín, *Geol. výzk. Mor. Slez. v. r. 2006*, 14 (2007) 95–100.

- [198] N. Eastaugh, V. Walsh, T. Chaplin, R. Siddal, *The Pigment Compendium: A Dictionary and Optical Microscopy of Historical Pigments*, Routledge, London, 2008. p. 499.
- [199] K.L. Rasmussen, G.R. Milner, T. Delbey, L.K.I. Jensen, F. Witte, T. Rehren, U. Kjaer, P. Grønder-Hansen, Release of lead from Renaissance lead-glazed ceramics from southern Denmark and northern Germany: implications from acetic acid etching experiments, *Herit. Sci.* 10 (2022) 63. <https://doi.org/10.1186/s40494-022-00703-8>.
- [200] K. Jagošová, M. Moník, J. Kapusta, R. Pechancová, J. Nádvorníková, P. Fojtík, O. Kurka, T. Závodná, P. Bednář, L. Richtera, L. Kučera, Secret Recipe Revealed: Chemical Evaluation of Raw Colouring Mixtures from Early 19th Century Moravia, *Molecules* 27 (2022) 5205. <https://doi.org/10.3390/molecules27165205>.
- [201] J. Bai, X. Sun, C. Zhang, Y. Zhao, C. Gong, The atmospheric degradation reaction of dehydroabiatic acid (DHAA) initiated by OH radicals and O₃, *Chemosphere* 92 (2013) 933–940. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.004>.
- [202] G. Moretti, C. Gervais, Raman spectroscopy of the photosensitive pigment Prussian blue, *J. Raman Spectrosc.* 49 (2018) 1198–1204. <https://doi.org/10.1002/jrs.5366>.
- [203] C. Orton, M. Hughes, *Pottery in archaeology*, chapter 13 Pottery fabric, second ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1993. pp. 150–189.
- [204] K. Černohorský, *Moravská lidová keramika*, J. Otto, Praha, 1941.
- [205] K. Těsnohlídková, *Technologie vrcholně a pozdně středověké keramiky*, disertační práce, Masarykova univerzita, Brno, 2021.
- [206] R. Thér, *Technologie výpalu keramiky a její vztah k organizaci a specializaci ve výrobě keramiky v kontextu kultur popelnicových polí*, disertační práce, Masarykova univerzita, Brno 2009.
- [207] A.E. Dodd, *Dictionary of ceramics*, third ed., The University Press, Cambridge, 1994; p. 371.
- [208] A.I. Ebunu, Y.A. Olanrewaju, O. Ogolo, A.R. Adetunji, A.P. Onwualu, Barite as an industrial mineral in Nigeria: occurrence, utilization, challenges and future prospects, *Heliyon* 7 (2021) e07365. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07365>.
- [209] H.-U. Voss, J. Lutz, P. Hammer, Römische und germanische Bunt- und Edelmetallfunde im Vergleich. Archäometallurgische Untersuchungen ausgehend von elbgermanischen Körpergräbern, *Bericht. RGK* 79 (1999) 123–157.
- [210] P. Könemann, Die kaiserzeitlichen Bunt- und Edelmetallfunde von Kamen-Westick. Verarbeitung römischer Metallimporte in einer Germanischen Siedlung, *Der Anschnitt Beiheft* 37. Veröffentlichungen aus dem Deutschen Bergbau-Museum Bochum 222; VML Verlag Marie Leidorf GmbH, Germany, 2018.
- [211] M. Čižmář, Nález bronzových odlévacích forem z doby laténské a římské na Moravě, *Archeol. rozhl.* 57 (2010) 126–136.
- [212] J. Baron, B. Miazga, T. Ntaflos, J. Puziewicz, A. Szumny, Beeswax remnants, phase and major element chemical composition of the bronze age mould from Gaj Oławski (SW Poland), *Archaeol. Anthropol. Sci.* 8 (2016) 187–196. <https://doi.org/10.1007/s12520-014-0225-0>.
- [213] Q. Wang, Y. Wang, N. Liu, M. Wu, R. Su, Y. Liu, Identification of surface coatings on ceramic bronze-casting moulds from the Houma foundry, Shanxi, China, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 48 (2023) 103858. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2023.103858>.

- [214] M.L. Chastain, The ceramic technology of bronze-casting molds in ancient China: production practices at three western Zhou foundry sites in the Zhouyuan area, PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, 2019.
- [215] C.-S. Won, J.P. Jung, K.-S. Won, A. Sharma, Technological Insights into the Evolution of Bronze Bell Metal Casting on the Korean Peninsula, *Metals* 12 (2022) 1776. <https://doi.org/10.3390/met12111776>.
- [216] K. Jagošová, J. Jílek, P. Fojtík, I. Čížmář, M. Popelka, O. Kurka, L. Kučera, First Evidence of “Earth Wax” Inside the Casting Molds from the Roman Era, *Molecules* 26 (2021) 4259. <https://doi.org/10.3390/molecules26144259>.
- [217] E. Pernicka, Provenance Determination of Archaeological Metal Objects, in: B.W. Roberts, C.P. Thornton (ed.), *Archaeometallurgy Global Perspective*, Springer New York, 2014. pp. 239–268.
- [218] D. Vích, J. Jílek, J. Kmošek, M.J. Biborski, M.R. Biborski, J. Martínek, Soubor kovových předmětů z doby římské z Boršova na Moravskotřebovsku An Assemblage of Metal Roman Iron Age Artefacts from Boršov in the Moravská Třebová Region, *Památky Archeol.* 111 (2020) 159–192. <https://doi.org/10.35686/PA2020.4>.
- [219] D. Vích, J. Kmošek, A Bronze Brooch Casting Mould in Eastern Bohemia from the period of the Marcomannic Wars, *Archäologisches Korrespondenzblatt* 50 (n.d.) 93–106.
- [220] A. Jouttijärvi, Roman alloying practice, *Mater. Manuf. Process.* 32 (2017) 813–826. <https://doi.org/10.1080/10426914.2017.1279325>.
- [221] M.A. Roxburgh, S. Heeren, D.J. Huisman, B.J.H. Van Os, Non-Destructive Survey of Early Roman Copper-Alloy Brooches using Portable X-ray Fluorescence Spectrometry, *Archaeometry* 61 (2019) 55–69. <https://doi.org/10.1111/arc.12414>.
- [222] S. Durali-Müller, Roman lead and copper mining in Germany: their origin and development through time, deduced from lead and copper isotope provenance studies, PhD thesis, Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2005.
- [223] P. Horník, J. Jílek, J. Militký, J. Kmošek, Sídliště z doby římské v Černčicích (okr. Náchod), doklad výroby kolínkovitých spon a nákončí opasku na přelomu starší a mladší doby římské? *Archeologie východních Čech* 18 (2019) 50–74.
- [224] A. Sadezky, H. Muckenhuber, H. Grothe, R. Niessner, U. Pöschl, Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information, *Carbon* 43 (2005) 1731–1742. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.02.018>.
- [225] M. Regert, J. Langlois, S. Colinart, Characterisation of wax works of art by gas chromatographic procedures, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.039>.
- [226] J. Jehlička, H.G.M. Edwards, S.E.J. Villar, Raman spectroscopy of natural accumulated paraffins from rocks: Evenkite, ozokerite and hatchetine, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 68 (2007) 1143–1148. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.01.017>.
- [227] J. Peris-Vicente, J.V. Gimeno Adelantado, M.T.D. Carbó, R.M. Castro, F.B. Reig, Characterization of waxes used in pictorial artworks according to their relative amount of fatty acids and hydrocarbons by gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.083>.

7 Seznam zkratek

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
ASAP-IMS-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací přímou sondou za atmosférického tlaku se separací pomocí iontové mobility
ASAP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací přímou sondou za atmosférického tlaku
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid
CI	Chemická ionizace
cIM s TW	Cyklická iontová mobilní spektrometrie s technologií putující vlny
DART-MS	Hmotnostní spektrometrie pro přímou analýzu v reálném čase
DESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací desorpčním elektrosprejem
DHA	Kyselina dehydroabietová
DIP	Přímá sonda pracující za vakua
DIP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací přímou sondou za vakua
DTIMS	Iontová mobilní spektrometrie v driftové trubici
dtm	Odchylka od teoretické monoizotopické hmotnosti
DTMS	Teplotně rozlišená přímá hmotnostní spektrometrie
EGA	Analýza uvolněných plynů s hmotnostně spektrometrickou detekcí
EI	Elektronová ionizace
FAIMS	Iontová mobilní spektrometrie s vysokonapětovou asymetrickou vlnou
FIA/ESI-MS	Průtokovou injekční analýza s hmotnostně spektrometrickou detekcí využívající k ionizaci elektrosprej
GALDI-MS	Hmotnostní spektrometrie s grafitem asistovanou laserovou desorpcí/ionizací
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IMS	Iontová mobilní spektrometrie
LDI-MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací
LOD	Limit detekce
LTP	Nízkoteplotní plazma
MALDI-MS	Hmotnostní spektrometrie s maticí asistovanou laserovou desorpcí/ionizací
MS	Hmotnostní spektrometrie
MTBSTFA	N-(t-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid
OPLS-DA	Diskriminační analýza ortogonálních projekcí do latentních struktur
PCA	Analýza hlavních komponent
PE	Polyethylen
PS	Papírová sprejová ionizace
Py-GC/MS	Pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
QqTOF	Hybridní kombinace kvadrupólu a detektoru doby letu
SAWN-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací pomocí akustické vlny
SEM-EDX	Skenovací elektronová mikroskopie s energiově disperzním analyzátozem
SW	Software
TIC	Celkový iontový proud
TIMS	Iontová mobilní spektrometrie se záchytem iontů
TWIMS	Iontová mobilní spektrometrie s putující vlnou
UV	Ultrafialové záření
VMK	Vyšší mastné kyseliny
XRF	Rentgen fluorescenční analýza

8 Životopis

Osobní údaje

Jméno: Klára Slavíková (rozená Jagošová)
Adres: Kmochova 210/11, Olomouc, 779 00
e-mail: klara.jagosova01@upol.cz

Vzdělání

2018–současnost **Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci**
Doktorské studium v oboru Analytická chemie

2016–2018 **Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně**
Magisterské studium v oboru Chemie a technologie ochrany životního prostředí. Téma diplomové práce: Hormony v čistírenských kalech

2013–2016 **Fakulta chemická Vysokého učení technického v Brně**
Bakalářské. studium v oboru Chemie a technologie ochrany životního prostředí. Téma bakalářské práce: Alkylderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků v životním prostředí

Odborné praxe a stáže

2022–současnost **Alven laboratories s.r.o.**
Samostatný analytik v laboratoři kontroly kvality aktivních léčivých látek

2021 **Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Institute for Biological Systems (ISB)**
Tříměsíční stáž zaměřená na vývoj metody nano kapalinové chromatografie pro analýzu polyfenolických látek v rostlinných materiálech a historických textilních vláknech

2018–2021 **Archeologické centrum Olomouc**
Pracovní náplň: Analýza archeologických artefaktů metodou XRF

2017 **Technik pro analýzu kalů (VUT v Brně)**
Pracovní náplň: Optimalizace a validace metody pro stanovení steroidních hormonů v čistírenských kalech

Pedagogická činnost

- Cvičení z analytické chemie životního prostředí
- Základní cvičení z analytické chemie

Publikace

- **K. Jagošová**, M. Moník, J. Kapusta, R. Pechancová, J. Nádvorníková, P. Fojtik, O. Kurka, T. Závodná, P. Bednář, L. Richtera, L. Kučera, Secret recipe revealed: Chemical evaluation of raw colouring mixtures from early 19th century Moravia, *Molecules* 27 (2022) 5205.
- **K. Jagošová**, J. Jilek, P. Fojtik, I. Čizmář, M. Popelka, O. Kurka, L. Kučera, First evidence of „earth wax“ inside the casting molds from the Roman era, *Molecules* 26 (2021) 4259.
- V. Pauk, J. Michalčáková, **K. Jagošová**, K. Lemr, Origin of indigo colorants revealed by ion mobility mass spectrometry coupled to mass spectrometry followed by supervised classification, *Dyes and pigments*, 197 (2022) 109943
- F. Ondrkál, J. Peška, **K. Jagošová**, D. Sokolovská, L. Kučera, The Cult-Wagon of Liptovský Hrádok: First evidence of using the Urnfield cult-wagons as fat-powered lamps, *J. Archaeol Sci Rep* 34 (2020) 102579

Kapitoly v knize – spoluautorství

- L. Kučera, L. Richtera, P. Bednář, V. Zemek, Z. Žingor, **K. Jagošová**, 3.2.1. Metody spektrální, in.: P. Bednář, L. Kučera (ed.), *Moderní chemické metody v archeologii*, Vydavatelství UP, Olomouc 2021.
- F. Ondrkál, J. Peška, **K. Jagošová**, D. Sokolovská, L. Kučera, 6.7. Kultovní vozík nebo závěsná nádoba s labutí protomou z doby popelnicových polí ze Slovenska, In.: P. Bednář, L. Kučera (ed.), *Moderní chemické metody v archeologii*, Vydavatelství UP, Olomouc 2021.

Prezentace na odborných konferencích

- Škola hmotnostní spektrometrie Špindlerův mlýn – přednáška
ASAP-MS: Teorie a praktické aplikace
- Chiranal 2022 – poster
Utilization of Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry in analysis of cultural heritage
- Konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii 2019 – poster
Application of Atmospheric solids analysis probe mass spectrometry in analysis of binders used in art
- Přednáška na workshopu ARTECA NAT-ART 2019

Projekty

- Člen týmu ARTECA Pokročilé fyzikálně-chemické metody ve výzkumu a ochraně kulturního a uměleckého dědictví (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378).

Další aktivity

- Oponování diplomových prací Terezy Závodné a Vojtěcha Zemka
- Účast na popularizačních aktivitách (Noc vědců, Přírodovědný jarmark, Dětská univerzita)

- Zakázkový výzkum na katedře analytické chemie (fosfátové analýzy)
- Studium možnosti využití rentgenové fluorescenční spektrometrie ve stanovení provenience bronzových předmětů v rámci spolupráce s Archeologickým centrem Olomouc
- Terénní využití rentgen fluorescenční spektrometrie pro stanovení fosfátů v půdách
- Účast na terénním měření pigmentů v nástěnných malbách pomocí rentgen fluorescenční spektrometrie na zámku v Oslavanech a na státním hradu v Bečově nad Teplou

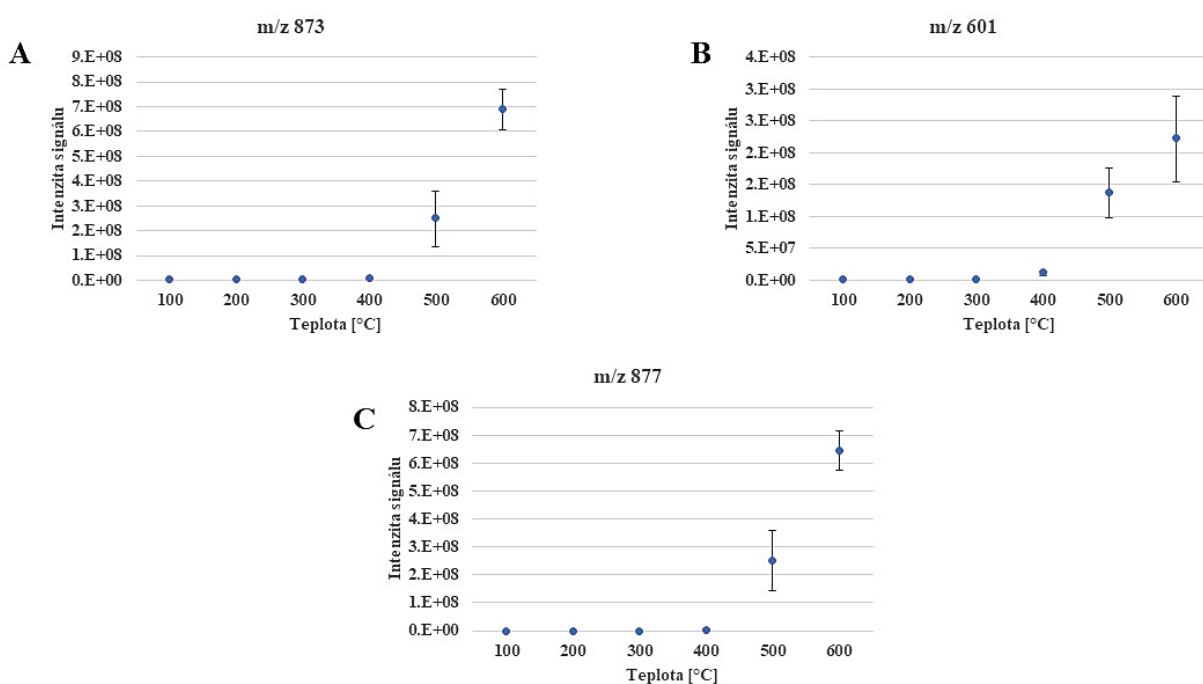
9 Přílohy

Příloha č. 1 Obrázky 1P–23P

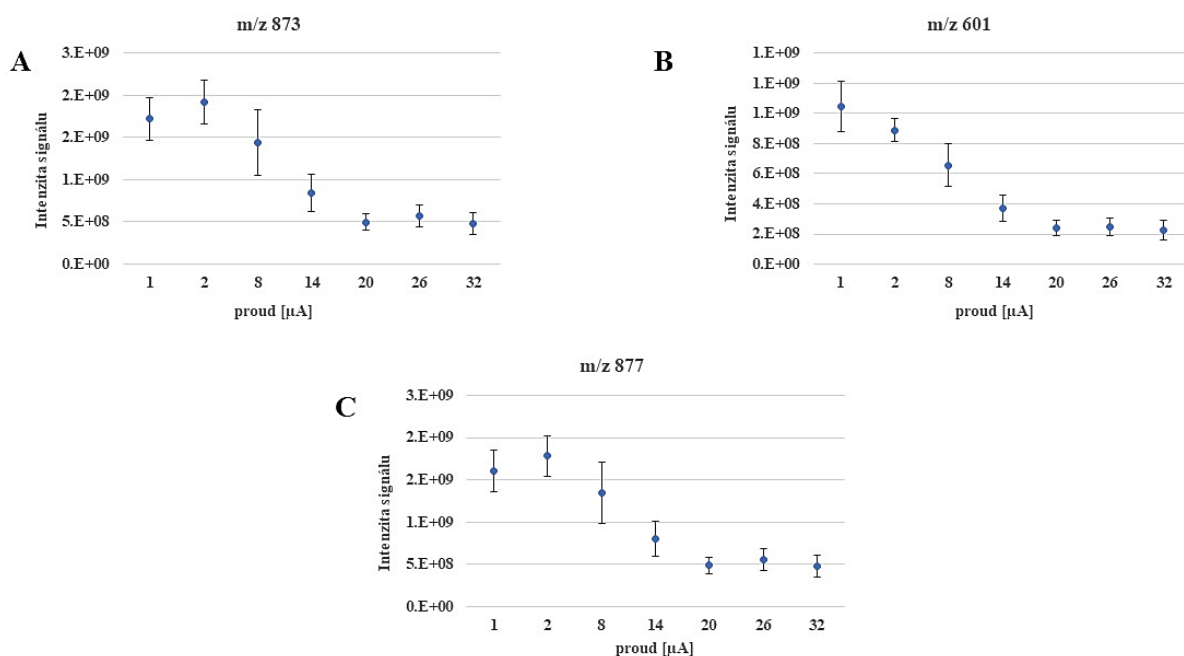
Příloha č. 2 K. Jagošová, M. Moník, J. Kapusta, R. Pechancová, J. Nádvorníková, P. Fojtik, O. Kurka, T. Závodná, P. Bednář, L. Richtera, L. Kučera, Secret recipe revealed: Chemical evaluation of raw colouring mixtures from early 19th century Moravia, *Molecules* 27 (2022) 5205.

Příloha č. 3 K. Jagošová, J. Jilek, P. Fojtik, I. Čizmář, M. Popelka, O. Kurka, L. Kučera, First evidence of „earth wax“ inside the casting molds from the Roman era, *Molecules* 26 (2021) 4259.

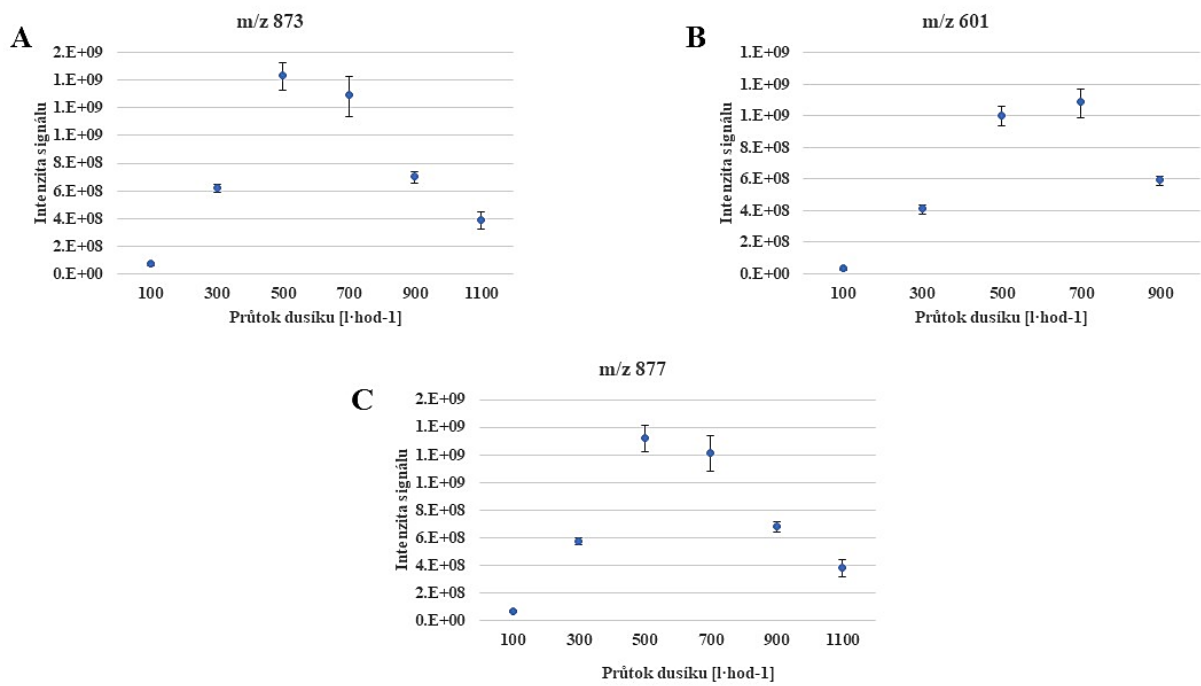
Příloha č. 1



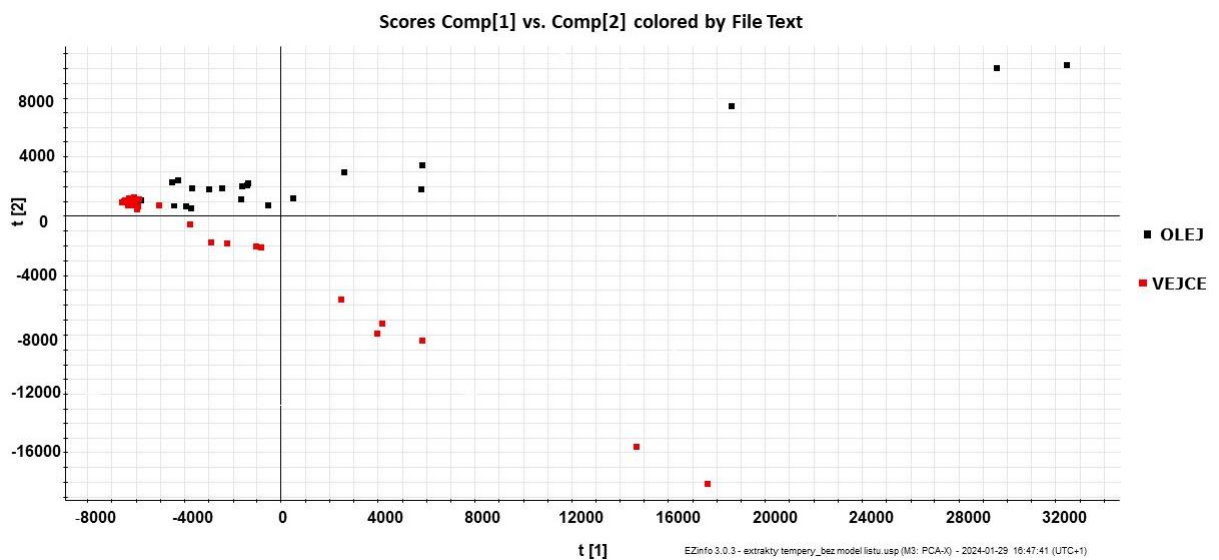
Obrázek 1P: Intenzita signálů vybraných acylglycerolů v závislosti na teplotě dusíku; m/z 873 (A), m/z 601 (B), m/z 877 (C)



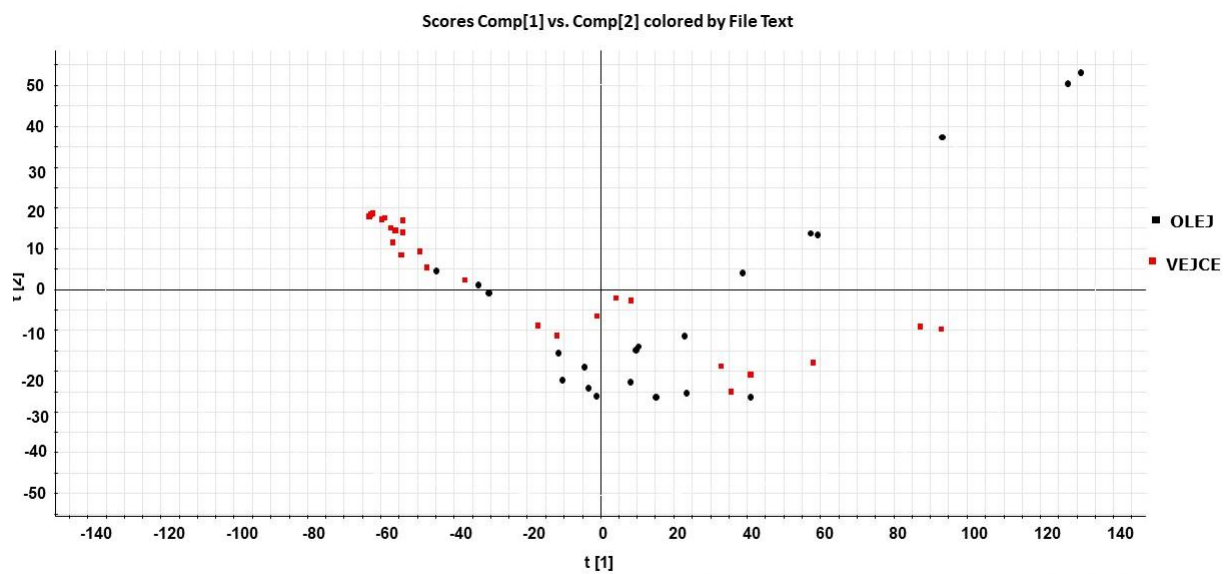
Obrázek 2P: Intenzita signálů vybraných acylglycerolů v závislosti na výbojovém proudu; m/z 873 (A), m/z 601 (B), m/z 877 (C)



Obrázek 3P: Intenzita signálů vybraných acylglycerolů v závislosti na rychlosti proudění dusíku; m/z 873 (A), m/z 601 (B), m/z 877 (C)

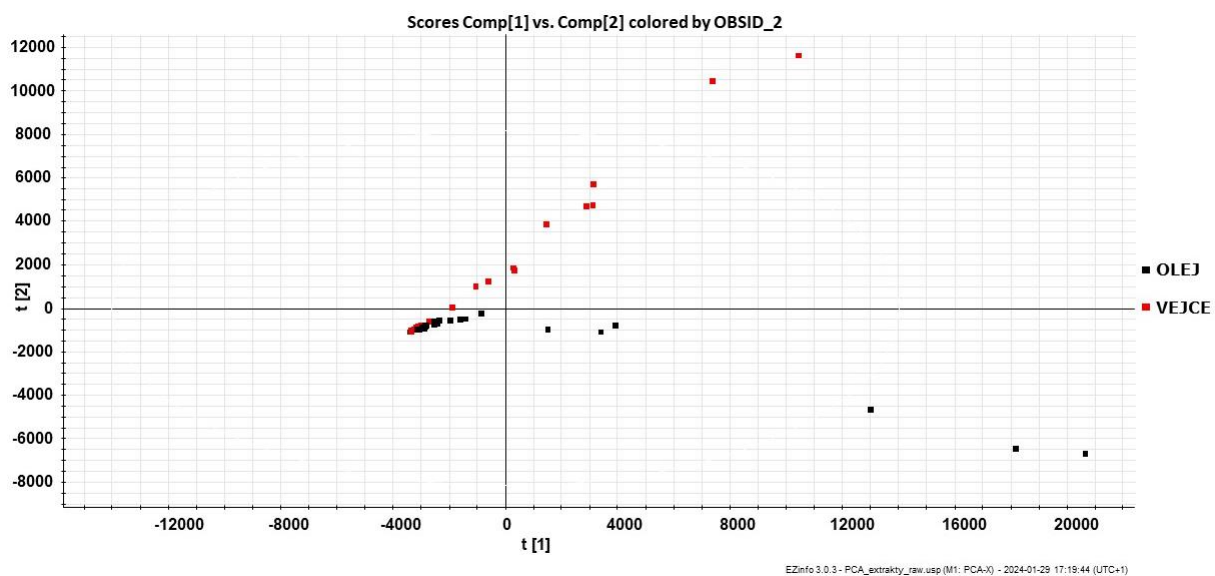


Obrázek 4P: Score plot PCA dat z extrahovaných vzorků – nefiltrovaná data, zobrazení bez logaritmické transformace



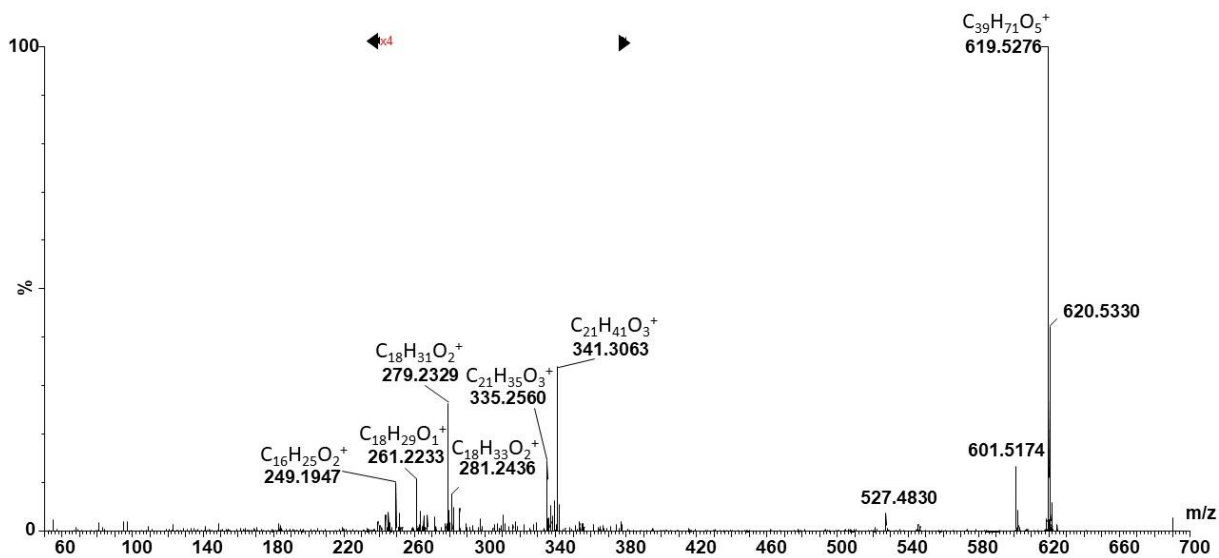
MarkerLynx X/S 3.0.3 - untitled29.usp (M2: PCA-X) - 2024-01-25 17:57:28 (UTC+1)

Obrázek 5P: Score plot PCA dat z extrahovaných vzorků – nefiltrovaná data, zobrazení s logaritmickou transformací

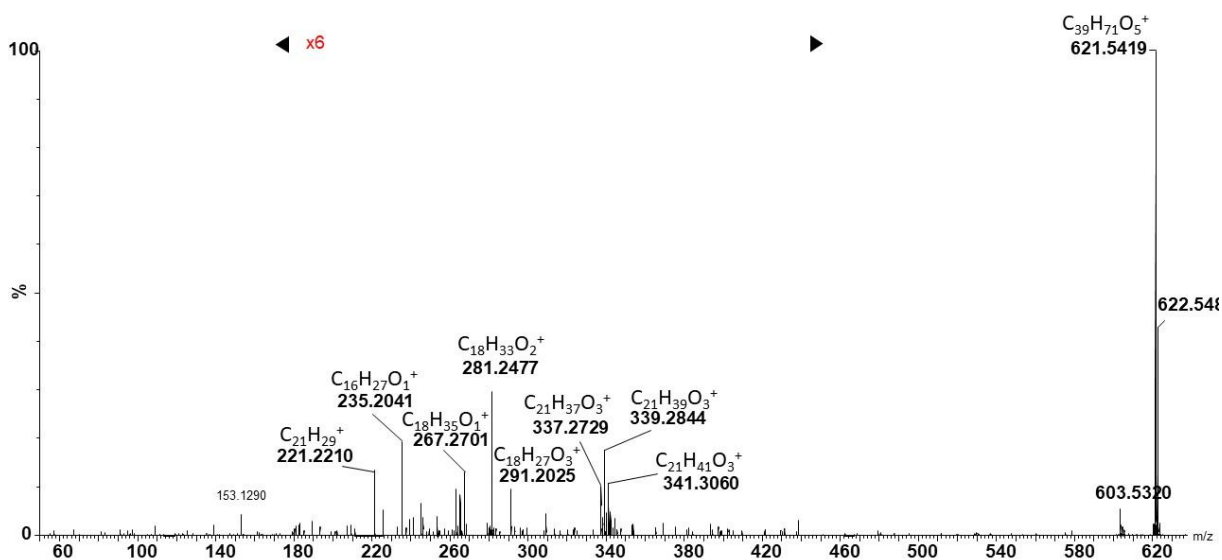


EZinfo 3.0.3 - PCA_extrakt_y_raw.usp (M1: PCA-X) - 2024-01-29 17:18:44 (UTC+1)

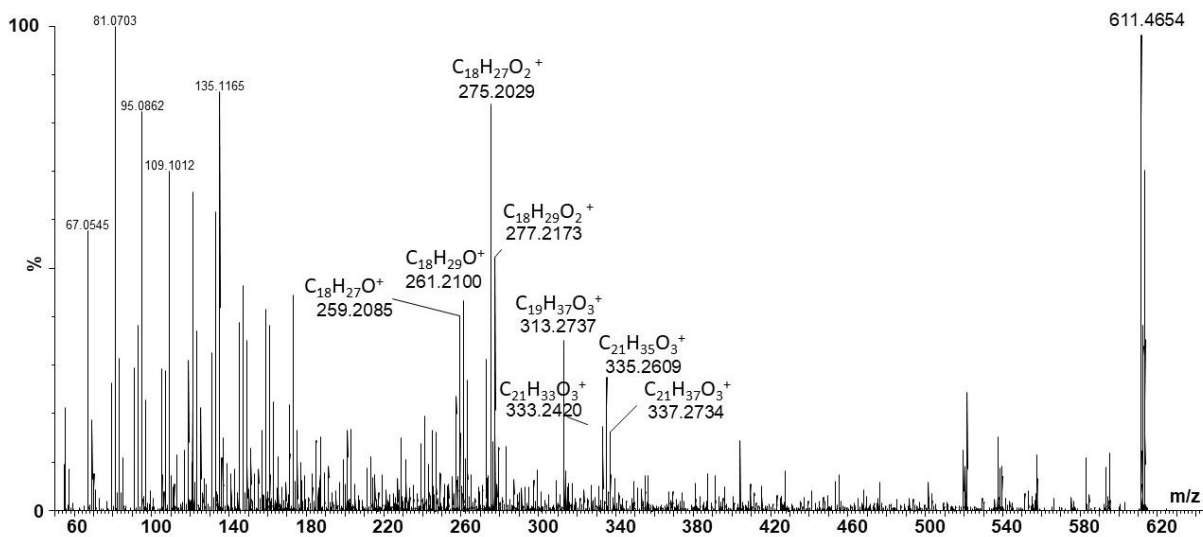
Obrázek 6P: Score plot PCA dat z extrahovaných vzorků – filtrovaná data, zobrazení bez logaritmické transformace



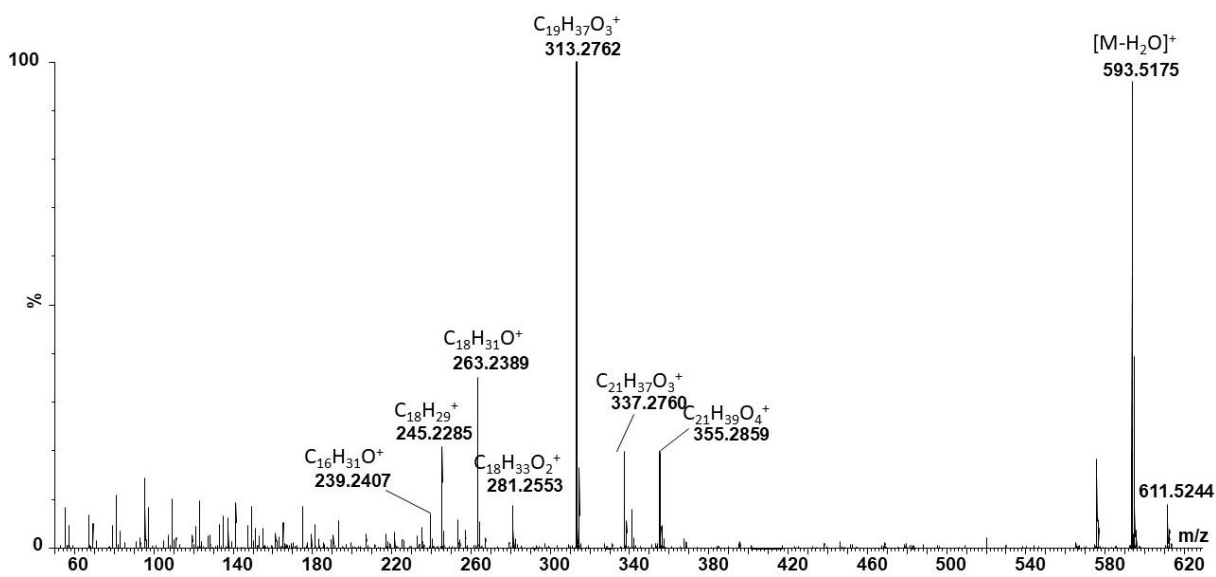
Obrázek 7P: ASAP-MS/MS spektrum signálu m/z 619.5276, energie na transferu 30 V



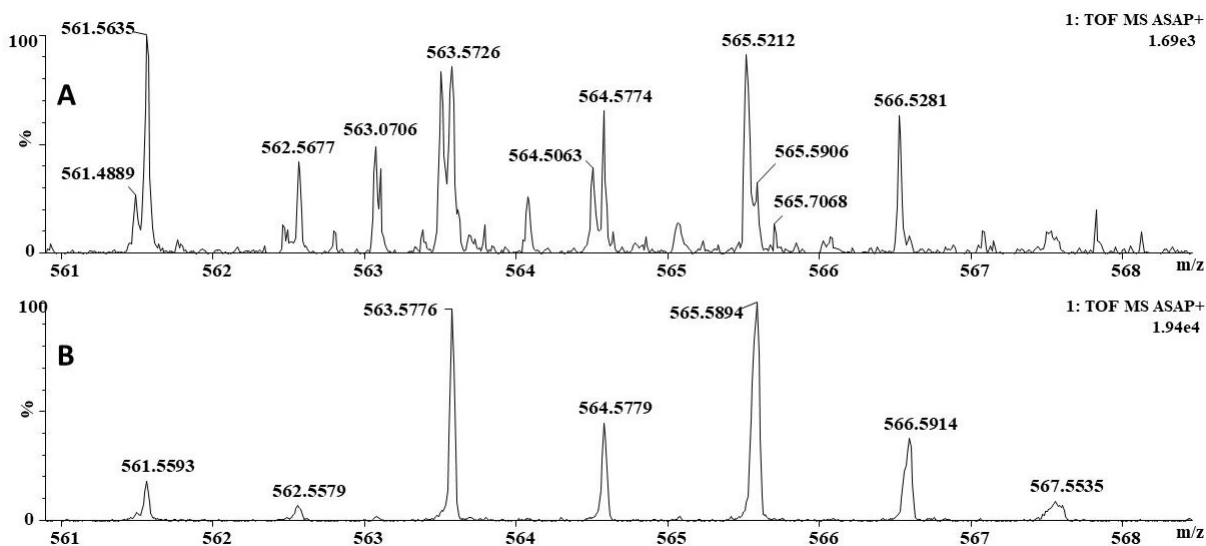
Obrázek 8P: ASAP-MS/MS spektrum signálu m/z 621.5419, kolizní energie na transferu 30 V



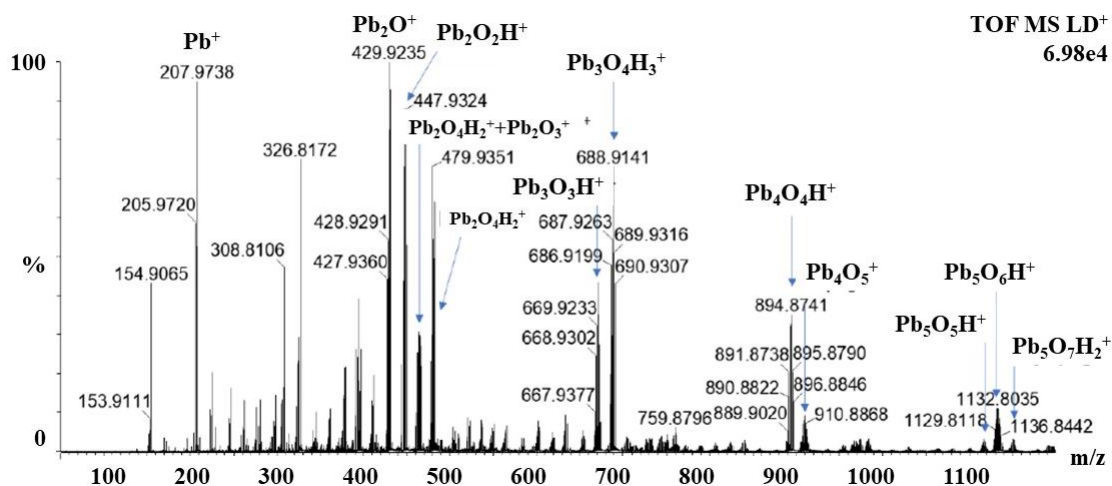
Obrázek 9P: ASAP-MS/MS spektrum signálu m/z 611.4654, kolizní energie na transferu 35 V



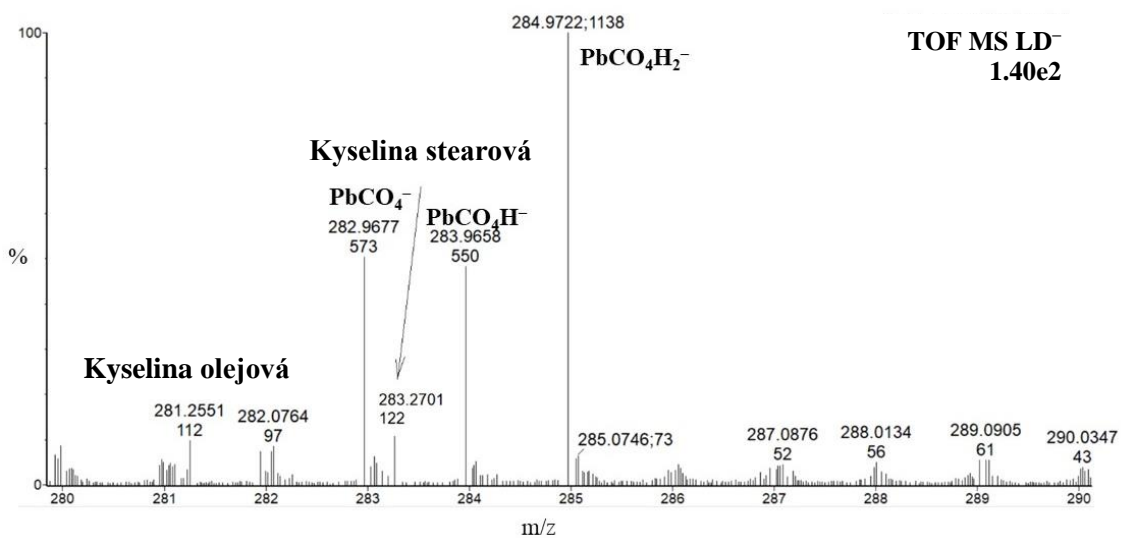
Obrázek 10P: ASAP-MS/MS spektrum signálu m/z 611.5244, kolizní energie na transferu 35 V



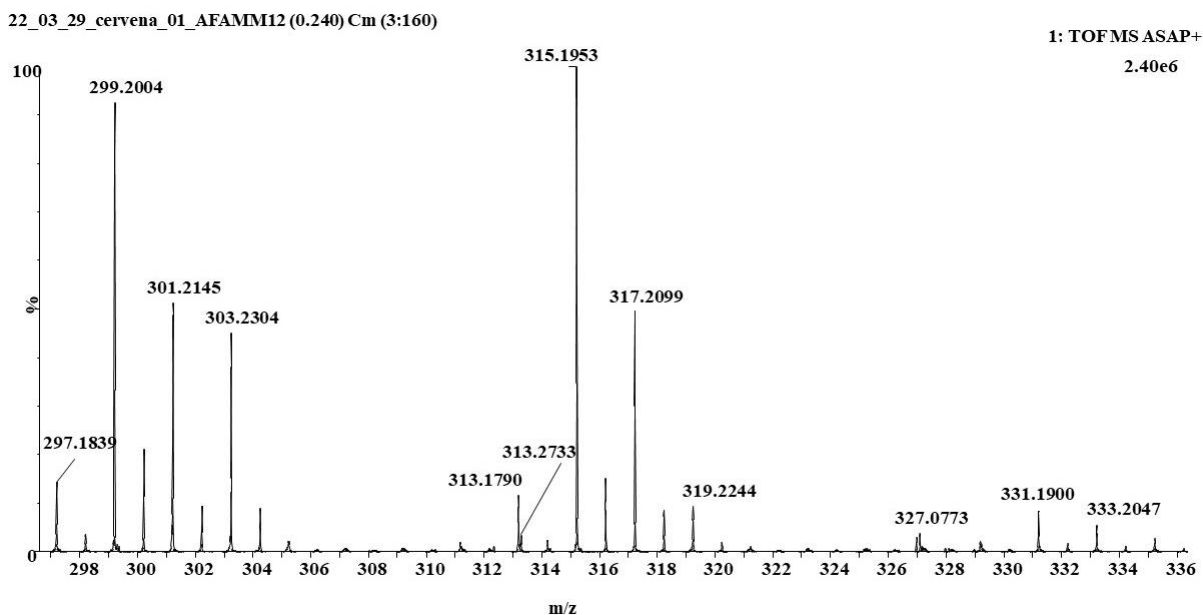
Obrázek 11P: Zoom ASAP-MS spektra reálného vzorku DJ17 obsahujícího pravděpodobně rezidua včelího vosku (A), zoom MS spektra včelího vosku (B)



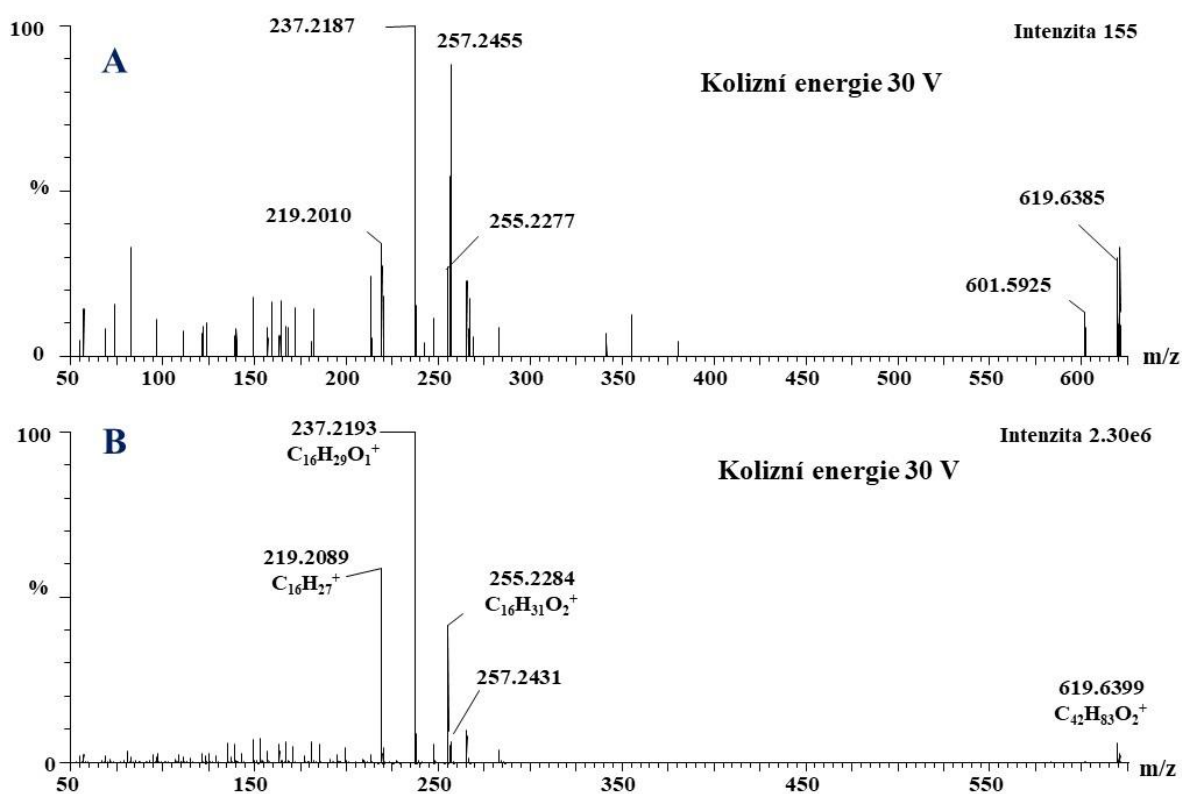
Obrázek 12P: LDI-MS spektrum modré směsi v pozitivním módu



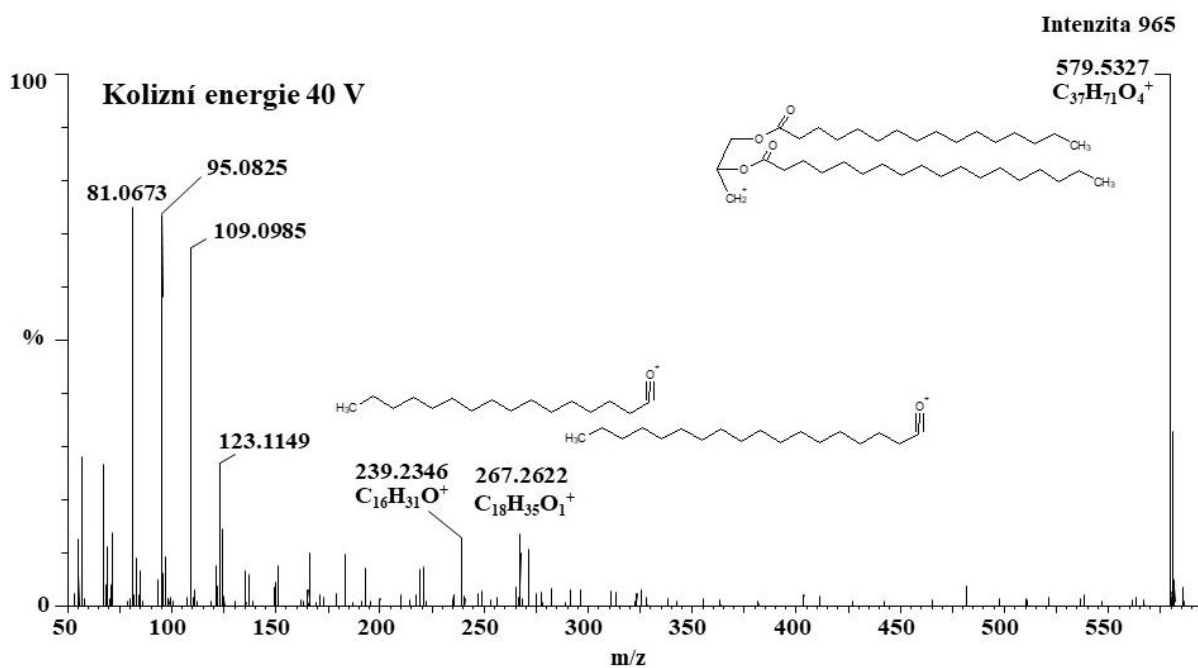
Obrázek 13P: LDI-MS spektrum vzorku modré směsi v negativním módu, zoom oblasti m/z 280–290; korekce přesných hmot na PbO_2H^- klastr



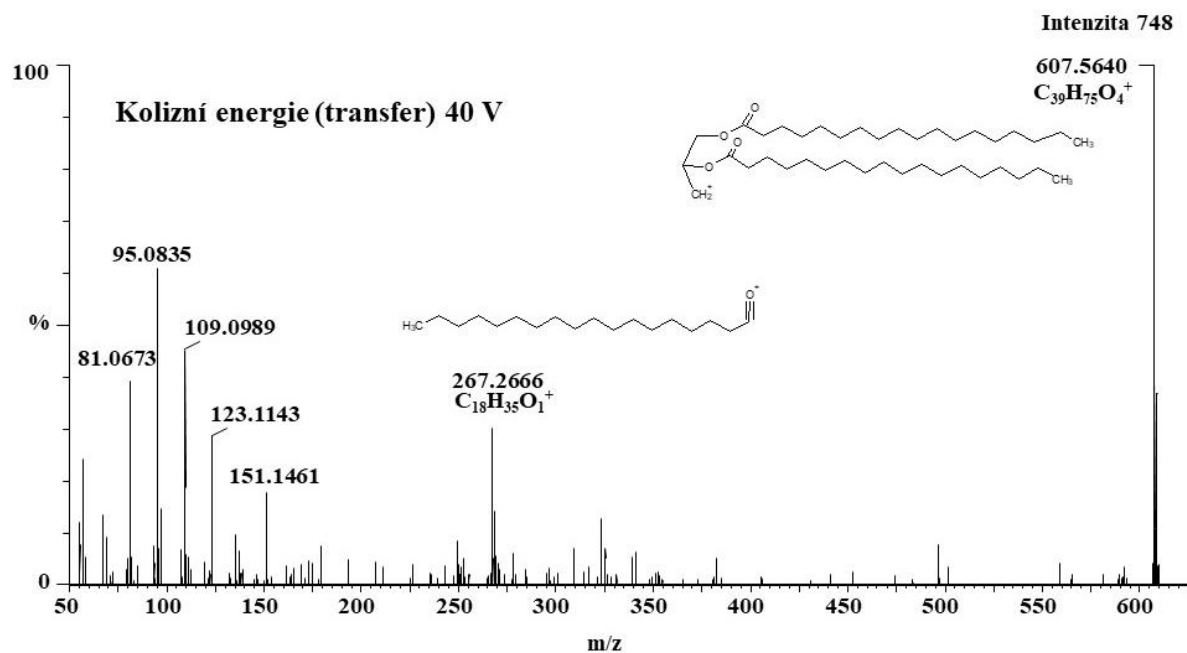
Obrázek 14P: ASAP-MS spektrum, přiblížení oblasti signálů diterpenových kyselin a jejich degradačních produktů v růžové směsi



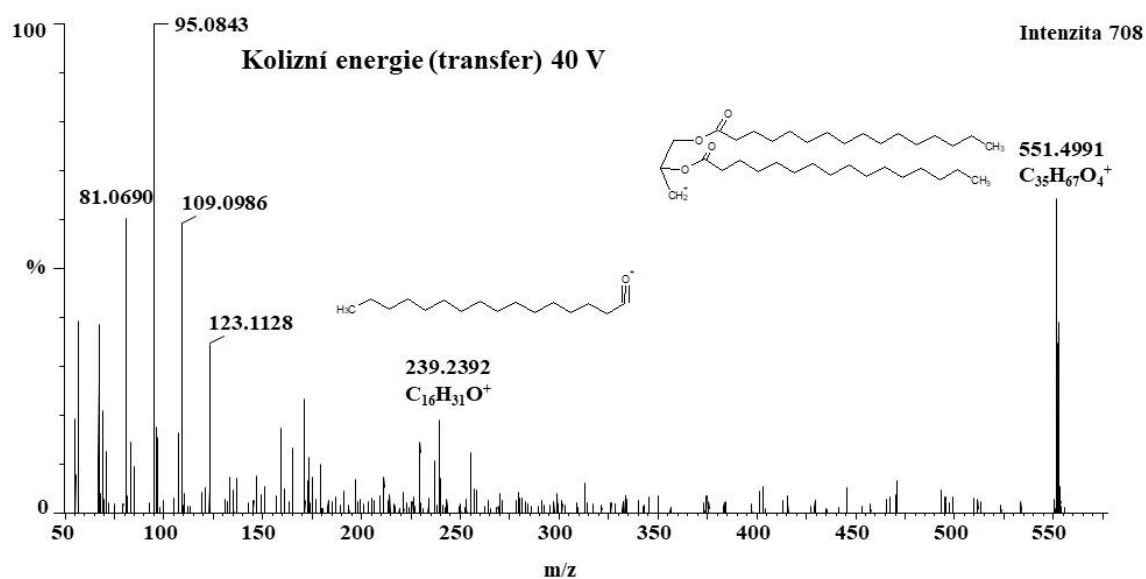
Obrázek 15P: ASAP-MS/MS spektrum signálu m/z 619.6385 ve vzorku růžové směsi (A), ve vzorku včelího vosku (B)



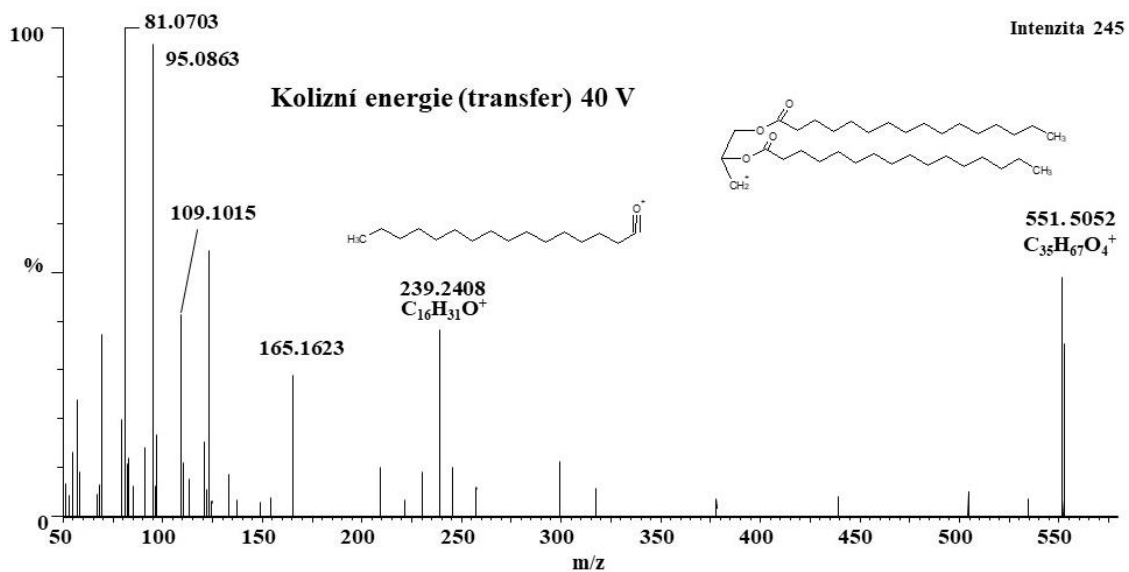
Obrázek 16P: ASAP-MS/MS spektrum m/z 579.5327 ve vzorku růžové směsi



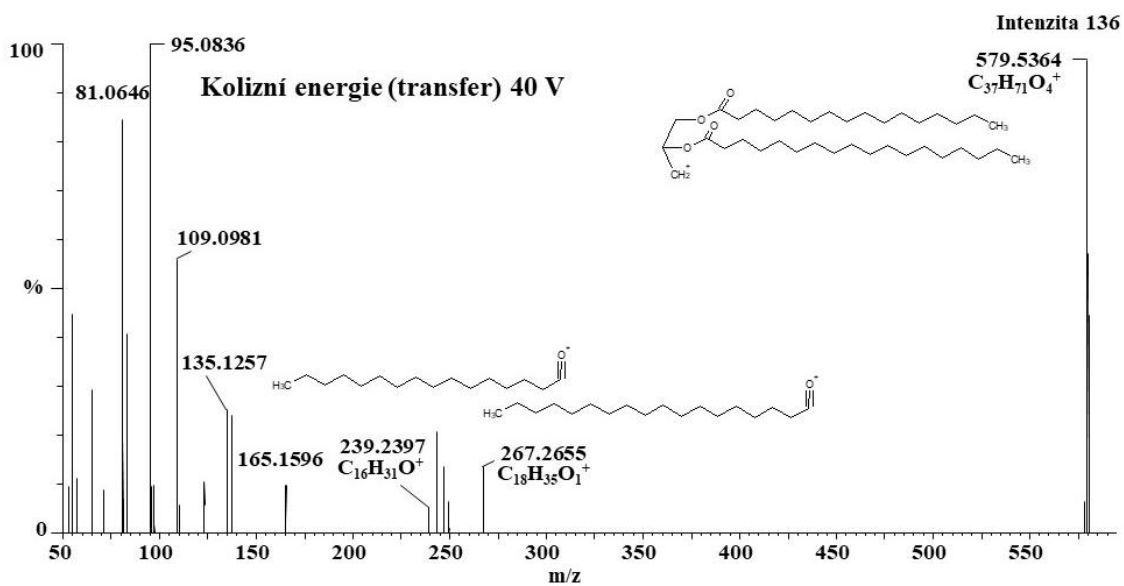
Obrázek 17P: ASAP-MS/MS spektrum m/z 607.5640 ve vzorku růžové směsi



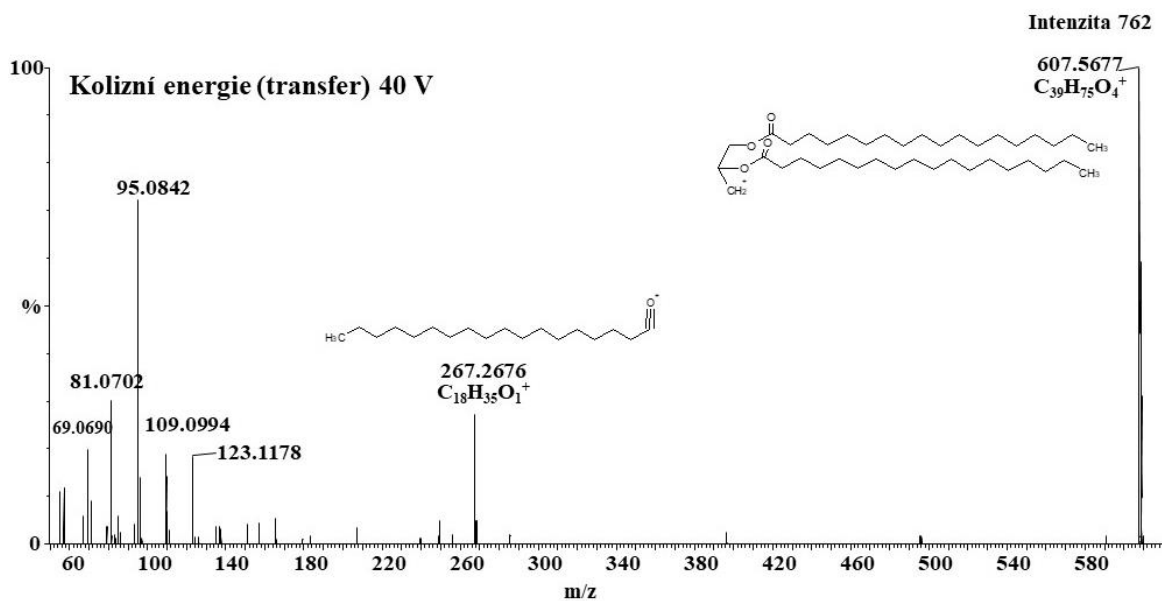
Obrázek 18P: ASAP-MS/MS spektrum m/z 551.4991 ve vzorku růžové směsi



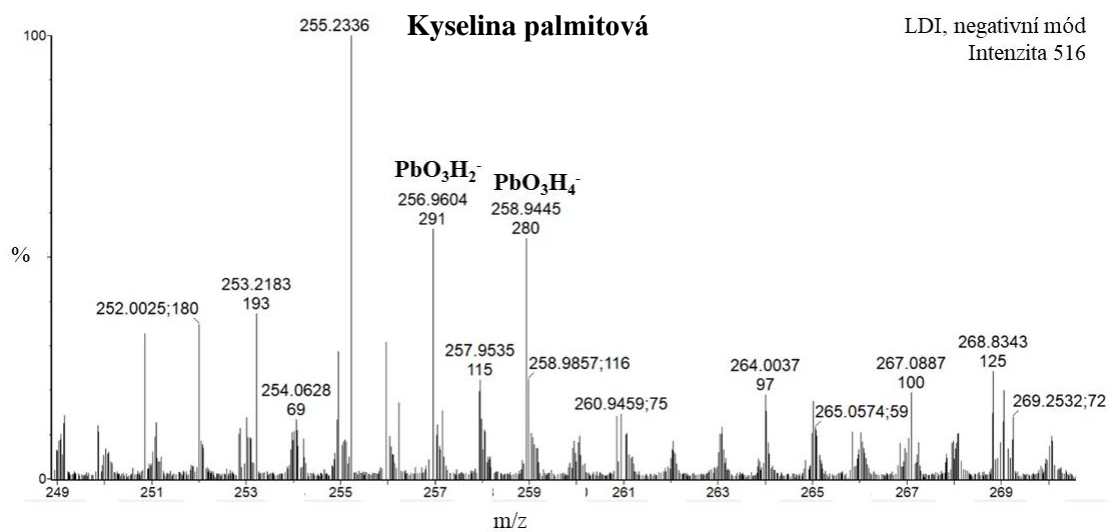
Obrázek 19: ASAP-MS/MS spektrum m/z 551.5052 ve vzorku modré směsi



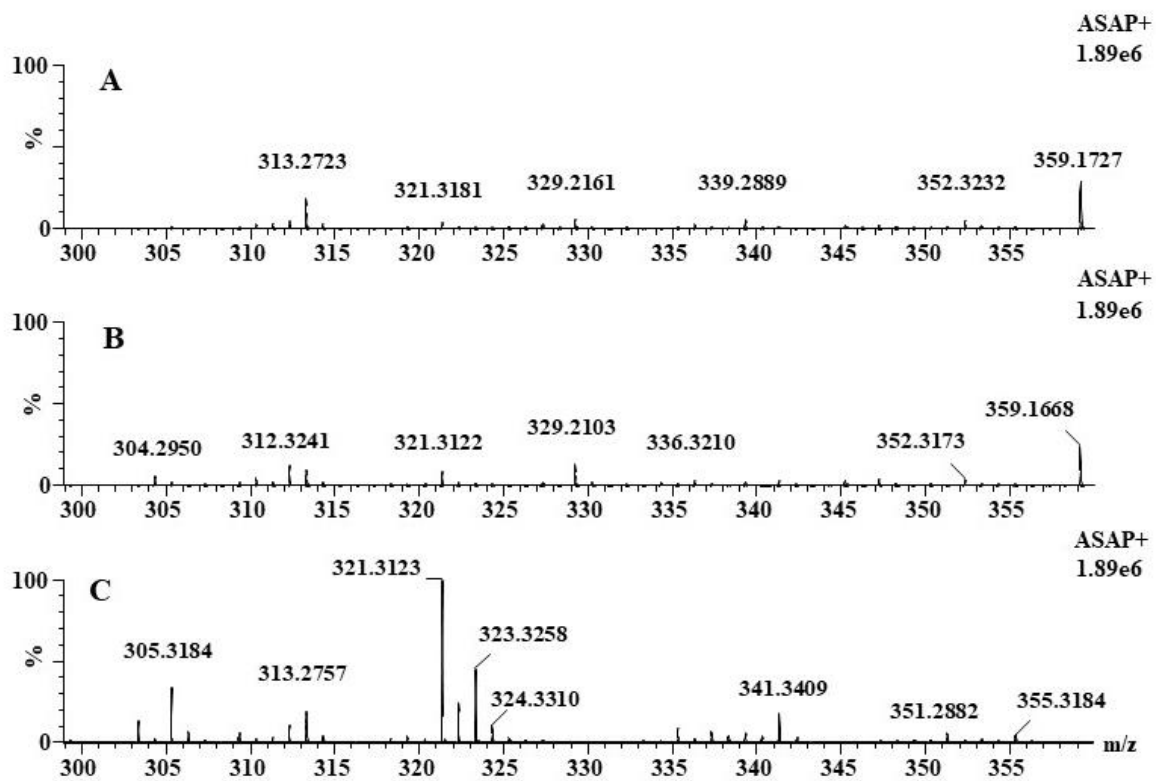
Obrázek 20P: ASAP-MS/MS spektrum m/z 579.5364 ve vzorku modré směsi



Obrázek 21P: ASAP-MS/MS spektrum m/z 607.5677 ve vzorku modré směsi



Obrázek 22P: LDI-MS spektrum vzorku modré směsi v negativním módu, zoom oblasti m/z 250–270, korekce přesných hmot na PbO_2H^- klastr



Obrázek 23P: Přiblížení oblasti ASAP-MS spektra kadlubu 1 (A), kadlubu 2 (B), ceresinu (C)

Article

Secret Recipe Revealed: Chemical Evaluation of Raw Colouring Mixtures from Early 19th Century Moravia

Klára Jagošová¹, Martin Moník², Jaroslav Kapusta² , Radka Pechancová¹, Jana Nádvořníková¹, Pavel Fojtík³, Ondřej Kurka¹ , Tereza Závodná¹, Petr Bednář¹ , Lukáš Richtera⁴  and Lukáš Kučera^{1,*} 

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 77900 Olomouc, Czech Republic

² Department of Geology, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 77900 Olomouc, Czech Republic

³ Institute of Archaeological Heritage Brno, v.v.i.-workplace Prostějov, Tetín 8, 79601 Prostějov, Czech Republic

⁴ Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 61300 Brno, Czech Republic

* Correspondence: lukas.kucera@upol.cz

Abstract: An archaeological excavation in Prostějov (Czech Republic) revealed a workshop of a local potter with colourless, pink, and blue powders presumably used to produce faience/surface decoration. A comprehensive analytical study, which combined elemental and molecular analysis techniques, was performed to shed light on the chemical composition of these unique findings. Scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM EDX), inductively coupled-plasma mass spectrometry (ICP MS), flow injection analysis (FIA) with electrospray ionisation mass spectrometry (ESI MS), laser desorption ionisation mass spectrometry (LDI MS), and Raman spectroscopy were applied to reveal the elemental composition of the powders and identify the colouring agents in the pink and blue powders. The colouring agents in the pink powder were probably iron and the agent in the blue powder is Prussian blue. On top of that, it was also possible to determine the organic additives in these powders through pyrolysis gas chromatography with mass spectrometric detection (Py GC/MS), atmospheric solids analysis probe ion mobility mass spectrometry (ASAP IM MS), and LDI MS. The organic constituents were identified as plant resin, beeswax, and fats. These results point to the preparation of faience/pigment mixtures as oil paint.

Keywords: Faience; direct mass spectrometry; elemental analysis; inorganic pigments; mass spectrometry; organic additives



Citation: Jagošová, K.; Moník, M.; Kapusta, J.; Pechancová, R.; Nádvořníková, J.; Fojtík, P.; Kurka, O.; Závodná, T.; Bednář, P.; Richtera, L.; et al. Secret Recipe Revealed: Chemical Evaluation of Raw Colouring Mixtures from Early 19th Century Moravia. *Molecules* **2022**, *27*, 5205. <https://doi.org/10.3390/molecules27165205>

Academic Editors: Erika Ribechini, Maria Perla Colombini and Jeannette Jacqueline Łucejko

Received: 11 July 2022

Accepted: 14 August 2022

Published: 15 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The chemical analysis of glazed pottery findings remains a big challenge because of usually minute amounts of unique samples available for analysis, the complexity of the matrix, and the transformation of the individual components during manufacturing processes. Many comprehensive studies on archaeological glazed pottery have been carried out combining microinvasive and non-invasive analytical techniques [1–10]. The main goal of these studies was to reveal the composition of the ceramic matrix, determine the colouring agents and additives in the glazed layers (faience), reconstruct the manufacturing technology, and estimate the provenance of the pottery. Electron microscopy combined with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) and X-ray fluorescence spectrometry are often the methods of choice for the determination of elemental composition. The disadvantage of SEM-EDX and XRF is their lower sensitivity. Due to this limitation, ICP-MS is preferred when the pattern of trace elements needs to be determined. For the analysis of cross-sections, it is advantageous to use laser ablation coupled with ICP-MS since it has a suitable resolution (i.e., tens of micrometres) [3,6,11–13]. Among

other techniques of elemental analysis, thermal ionisation mass spectrometry [7,8], secondary ion mass spectrometry [14], particle induced X-ray or gamma ray spectroscopy [4,5], X-ray diffraction [1,9], laser induced breakdown spectrometry [15], neutron activation analysis [16] or X-ray photoelectron spectrometry [17] have been applied for glaze/faience analyses. Methods of molecular spectroscopy, such as Raman spectroscopy or infrared spectroscopy, are often utilised for the determination of the mineralogical structure of studied materials [18,19]. Until the present day, no study revealed the complete manufacturing technologies of faience production since only final products or fragments are available for physicochemical analysis using modern analytical techniques. The reason is the thermal degradation of organic additives during the firing of faience on ceramics. It should be noted that Zaremba et al. [20] observed the emission of CO₂ and ammonia during the thermal analysis of the glazed and underglazed layer of the faience Ptolemaic bowl. They assumed that the evolved gases were decomposition products of organic matter trapped in the pores of the object. However, even in this case, it was not possible to determine the original organic additives.

The technique of faience was applied to Moravian pottery (Czech Republic) from the 16th century onwards [21,22]. It consists of applying a glassy layer on fired sherd to make it harder, impenetrable, and easier to paint on. It was brought to the Czech lands by Anabaptists in the 16th century, probably from southern Germany, and remained in use after their expulsion from Bohemia and Moravia (1622 AD) after the Battle of White Mountain 1620 AD [21]. In 2017, a rescue archaeological excavation in Vodní ulice Street (*Wassergasse*) in Prostějov (Moravia, Czech Republic) discovered the house of pottery master Jan Skřivánek, born in 1773 and active in Prostějov after 1802 [23]. Three powder samples were found inside preparative ceramic vessels, i.e., colourless/white (sample 1), pink (sample 2), and blue (sample 3) powders (Figure 1).

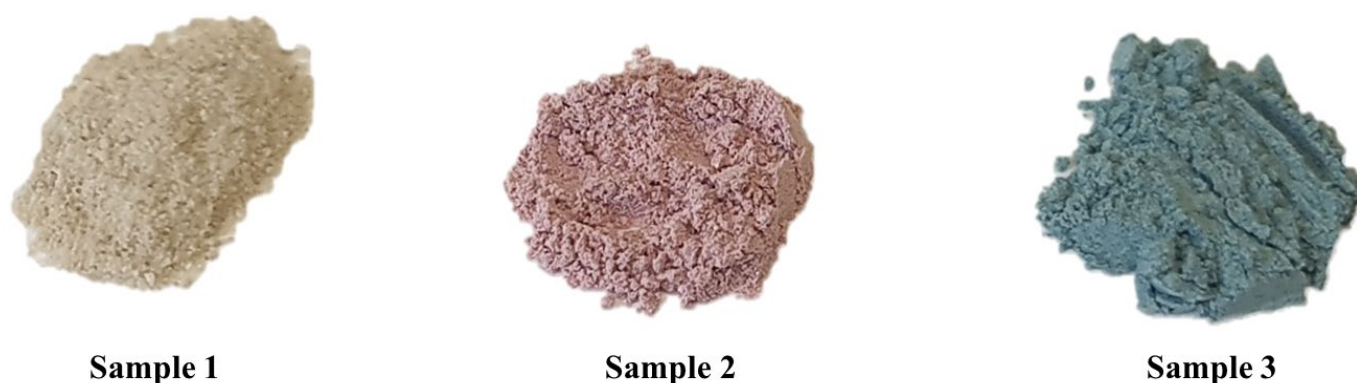


Figure 1. From the left: colourless, pink, and blue powders.

The aim of the presented study is to identify the inorganic and organic components of the powders since their recipes were kept secret and formed a part of the “arcane” knowledge of folk alchemists [21]. Although a number of recipes for such powders are known to historians, *ibid.*, these were also often written in “secret” language so that no other pottery master could make use of them. In this way, this study helps to decode this language and understand the beginning part of the manufacturing process of faience. Untargeted analyses of powders were performed by ASAP-MS with ion mobility (IM), FIA/ESI-MS, Py-GC/MS, LDI-MS, and Raman spectroscopy. For elemental composition, SEM-EDX and semiquantitative ICP-MS analyses were performed. To the best of our knowledge, this is the first-time the analysis of raw faience materials has been conducted by modern instrumental analytical techniques.

2. Results

The morphological characterisation of inorganic grains of particular minerals was performed using SEM/EDX (Table 1). Based on the morphology of fragments observed

with SEM and their chemical composition, the colourless powder is formed by crushed glass, one of the components of a so-called *frit* (Figure 2a) [24]. In practice, it is later mixed with water and colourants and applied to the pottery surface before the second firing. Some fragments are enriched in Pb (EDX analyses 1, 2, and 4 in Table 1 and Figure 2a,b), ranging from 6 wt% to 18 wt% of PbO while others (analysis 3) are almost pure silica. Sulphur is present in small quantities (<0.3 wt% of SO₃) in all analysed samples, probably linked with the Pb mineral (galena). A variability in chemical composition within single pieces of crushed glass/frit was observed (Figure 2b), indicating the mixing of several types of glass. Notably, a high amount of lead in various forms was confirmed by LDI-MS as well. The signals of clusters with different elemental compositions dominate the LDI-MS spectra in both ionisation modes (see Supplementary Material Figures S1–S3).

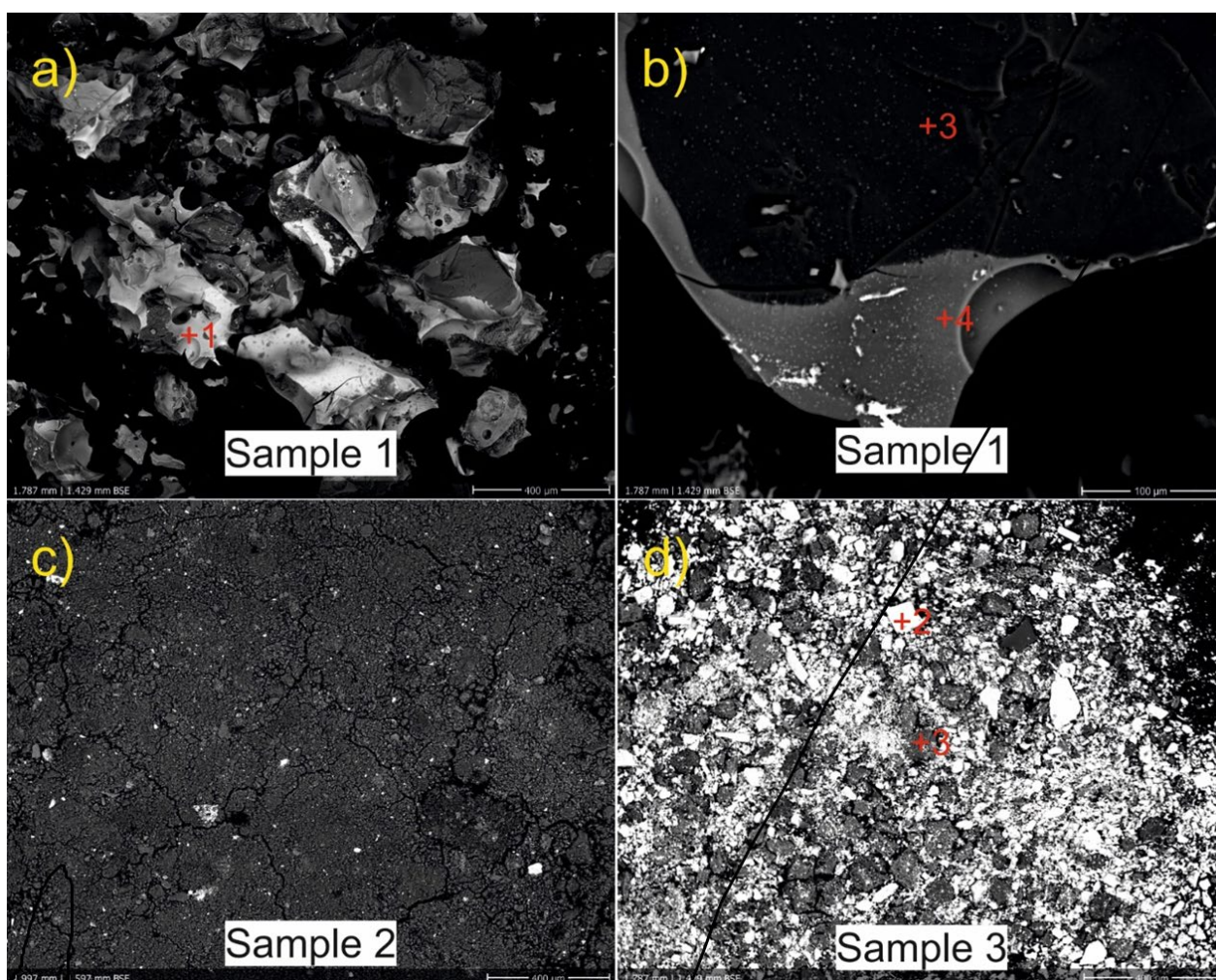


Figure 2. BSE images of the powders encountered in Vodní ulice Street. Crushed glass or frit (a,b) composed of glass of variable chemistry, pink powder (c), and blue powder (d). The numbers in red indicate the points of SEM-EDX analysis and correspond to the numbers of analyses in Table 1.

The pink-coloured powder turned out to be very fine-grained (Figure 2c) so only “bulk” SEM-EDX analysis was performed. Apart from the predominant SiO₂ and Al₂O₃ oxides, we encountered CaO, PbO, and K₂O in the mixture; (hydr)oxides of P₂O₅, FeO, TiO₂, MgO, and Na₂O, together with SO₃, were present in amounts < 1 wt%. The blue powder comprises abundant baryte crystals (EDX analyses), a common additive in faience manufacture which served as flux, increased the brilliancy of the glaze, and reduced the number of bubbles during melting [24,25]. The remaining matter also contains SiO₂, Al₂O₃, PbO, and FeO, and in lesser or trace amounts CaO, P₂O₅, MgO, SrO, or Na₂O as well. With

regard to the manufacturing technology, the addition of Pb both in the crushed glass and in the two coloured powders is obvious. The slightly elevated values of K_2O and Na_2O indicate that we have mixtures for lead glazes with low amounts of alkalis [3]. Though elevated, the amounts of Pb (wt% from SEM-EDS) in the powders from Prostějov are still much lower than in Modern Age glazes published by Tite et al. or Gregerová et al. [3,22]; therefore, it can be assumed that another Pb-rich mixture, not found during excavation, was added. Lead was probably available in the form of litharge (PbO), either a secondary mineral from outcrops of galena ores, or a by-product from smelting (lead-) silver ores [26]. Similar to baryte, litharge served as a flux in glazes, increasing their brilliance, smoothness, density, and resistance to cracking [3,14]. Its disadvantage was the release of lead in meals, resulting in higher Pb-intake by the early Modern Age population, with potentially poisonous effects [27,28]. Most of the analysed mixtures, especially the pink powder and crushed glass, contain small amounts of P_2O_5 , CaO, and MgO, but their amounts are lower than in the Anabaptist pottery from Strachotín (Moravia) where the use of bone ash from calcined bones or antlers was conjectured [22]. As it stands, the mixtures from Prostějov would probably result in translucent rather than opacified glazes. Only the joint presence of TiO_2 , SO_3 , and FeO in the pink powder may potentially indicate the use of titanium oxide opacifiers, manufactured by soaking ilmenite ($FeTiSiO_3$) in green vitriol, i.e., ferrous sulphate ($FeSO_4$).

Table 1. EDX results of the three samples in wt%.

No. of Analysis	Sample	Na	Mg	Al	Si	P	S	K	Ca	Ti	Fe	Sr	Ba	Pb	Sum	Other Minerals
1	#1	0.98	0.17	8.52	65.21	0.05	0.22	2.42	0.22	ND	0.94	ND	0.27	11.76	90.76	quartz
2	#1	0.85	0.27	6.40	66.54	0.05	0.15	1.87	0.27	ND	1.30	ND	ND	18.13	95.82	
3	#1	0.36	0.28	0.62	101.83	0.42	0.43	0.11	0.05	ND	0.05	ND	ND	0.13	104.26	
4	#1	1.37	0.69	9.21	75.92	0.54	0.65	2.16	0.33	1.45	1.70	ND	ND	6.59	100.62	
1 (bulk)	#2	0.26	0.60	20.95	38.58	1.39	1.31	1.69	4.21	0.69	0.60	ND	ND	1.97	72.24	baryte, Na-feldspar, chlorite, and aluminosilicate
1 (bulk)	#3	0	0	4.23	9.17	0	8.51	0.04	0.83	ND	1.33	0.19	20.34	9.22	53.84	Quartz and aluminosilicate
3 (bulk)	#3	0.03	0.32	21.92	33.99	2.67	1.11	1.08	4.22		7.85	0.67	0.27	8.21	82.34	
2 (baryte)	#3						17.81				0	0	52.60	0	70.40	
4 (baryte)	#3						27.83	0	0		0	0	56.26	0	84.09	

In addition to SEM-EDX, ICP-MS analyses were performed to obtain an exact concentration of elements in the studied powders and reveal the colour origin (Table 2). One of the most common red pigments used in glazes/faience was hematite $\alpha-Fe_2O_3$ (or maghemite $\gamma-Fe_2O_3$) which causes red to brown shades depending on the conditions during firing. The red hue was achieved under oxidising conditions at a temperature higher than 700 °C [29]. Red glazes were also achieved by the use of other minerals, for example, cuprite Cu_2O , crocoite ($PbCrO_4$), or red lead (Pb_3O_4) [29–31]. Based on the results of the ICP-MS analysis, though, we hypothesise that the colouring agent in the pink powder was Fe found in concentrations of $0.50\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, probably in the form of hematite. Copper, e.g., in the form of cuprite or copper nanoparticles, was also used as a red colourant in historical glassmaking [32,33], but the amount of Cu used in such cases was about 100x greater than in the red powder from Prostějov ($0.26\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, Table 2).

Table 2. ICP-MS results in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Sample	P	S	Ca	Na	Mg	Al	Si	K	Ti	V	Mn	Fe	Cu	Zn	Ga	Sr	Sn	Sb	Ba	Hg	Pb
1	0.3	0.6	<LOD	34.6	0.8	32	317	5.2	0.86	0.02	0.02	2.0	0.08	0.01	0.02	0.02	0.44	0.01	0.3	<LOD	6
2	3.2	3.3	4.4	1.1	1.3	51	223	4.0	0.07	0.03	0.01	0.5	0.26	0.02	0.22	0.15	0.02	0.05	4.3	0.01	35
3	0.6	14.0	14.0	1.2	0.6	11	101	0.9	0.04	0.03	0.03	4.0	0.13	0.10	4.84	3.52	0.17	0.10	86.0	0.43	232

Py-GC/MS analysis revealed the presence of organic additives in the pink faience powder, i.e., diterpene resin acids of the abietane and pimarane types (Figure 3a). Abietic acid, dehydroabietic acid, pimaric acid, and levopimaric acid are significant components of resins produced by conifers (gymnosperms), e.g., pine (*Pinus*), larch (*Larix*), spruce (*Pices*),

and fir (*Abies*). [34,35]. ASAP-IM-MS did not allow the separation of individual resin acid isomers but confirmed the presence of the resin as a sum of all isomers. A compound with m/z 301.2145 ($C_{20}H_{29}O_2^+$) corresponds to the structure of protonated dehydroabietic acid with the deviation from theoretical mass (dtm) of -2.3 mDa. The fragmentation spectra of dehydroabietic acid in the pink powder and in the standard are presented in Figure 3b,c, respectively. In addition to the signals belonging to the resin, the signals at m/z 463.4858, 491.5186, and 519.5491 correspond to the ions of molecular formula $C_{32}H_{63}O_1^+$, $C_{34}H_{67}O_1^+$, $C_{36}H_{71}O_1^+$ with dtm -2.1 , -0.6 and -1.4 mDa, respectively (for fragmentation spectra see Supplementary Material Figures S4–S6). Those signals were assigned as thermal/ion fragments of beeswax components based on a comparison with the mass spectrum of a standard of beeswax. As further evidence of beeswax presence, we also identified molecule $C_{42}H_{83}O_2^+$ (619.6393 Da) with dtm -0.8 mDa as an ester of palmitic acid, which is a typical component of beeswax [36] (for fragmentation spectra see Supplementary Material Figure S7). In addition, diglycerols also were found with m/z 607.5640 ($C_{39}H_{75}O_4^+$; dtm -2.5 mDa; distearoyl glycerol, SS), 579.5327 ($C_{37}H_{71}O_4^+$; dtm -2.5 mDa; palmitoyl-stearoyl glycerol; PS), and 551.4991 ($C_{35}H_{67}O_4^+$; dmt -4.8 dipalmitoyl glycerol, PP). (for fragmentation spectra see Supplementary Material Figures S8–S10). Those compounds are present in high concentrations in fatty materials (originating from both plants and animals) [36]. The pink powder was probably prepared in a similar way as pigments for traditional oil paintings. According to Slánský, the preparation of traditional oil paints includes pigment(s) and oil as main components with the frequent presence of resin, wax, or balms [37].

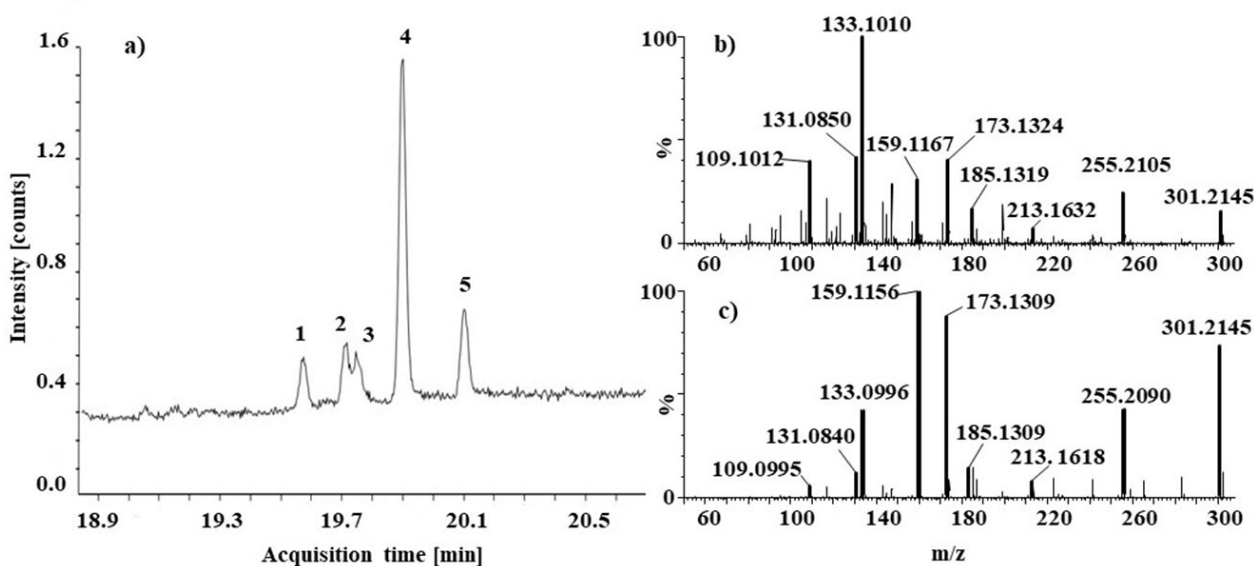


Figure 3. Pyrogram of the pink powder (1: pimanic acid TMS, 2: isopimanic acid TMS, 3: unknown compound, 4: dehydroabietic acid TMS, and 5: abietic acid TMS) (a); ASAP IM MS fragmentation spectra of compound m/z 301.2152 in pink powder (collision energy 20 V) (b) and in the standard of dehydroabietic acid (collision energy 20 V) (c).

The blue colour in glaze making is normally achieved by the addition of Cr, Co, or Cu [11,26,38], but none are present in the powder from Prostějov–Vodní ulice Street. According to the ICP-MS results, the bulk of the blue powder contained an increased amount of iron (approximately $4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) which could be the source of the blue colour as hexacyanoferrate pigment $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, commonly known as Prussian blue. The presence of PB was consequently identified and proved by the means of FIA/ESI-MS and Raman spectroscopy. The FIA/ESI-MS spectrum of PB standard contained the most intense signals of $[\text{Fe}(\text{CN})_3]^-$ at m/z 133.9443 Da (Figure 4a). In the spectrum of the blue powder, this signal was found as well (m/z 133.9434), with dtm -0.8 mDa (Figure 4b). These results were consequently supported by Raman spectra of the reference material and

sample (see Figure 4c). Four significant signals were found in Raman spectra, i.e., 2154, 2090, 527, and 275 cm^{-1} . The vibration at 2154 cm^{-1} corresponds to $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ stretching vibration and [Fe(II), Fe(III)] vibrational state. This peak is followed by a shoulder of a characteristic CN^- vibration, and signal at 2090 cm^{-1} that corresponds to the $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ stretching vibration of the [Fe(II), Fe(III)] state. The remaining two signals at 527 and 275 cm^{-1} refer to Fe–C stretching vibrations of the lattice and Fe–CN–Fe bond deformation vibrations, respectively [39]. Note that the high concentration of sulphur, which was found in the sample of blue powder by SEM-EDX and ICP-MS (Tables 1 and 2), points to the traditional preparation of PB, i.e., the usage of green vitriol ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) and dried cattle blood as the source of cyano or/and ferrocyanide groups [29]. The problem with PB, though, is that it would probably not have survived the sintering process in glaze melts. In oxidising conditions, the ferrocyanide bonds would have broken and disassembled (and likely oxidised) into Fe^{3+} . We assume that in reduction conditions, PB possibly formed Fe^{2+} which can cause the aqua blue colour of the glaze. [29]. It would seem that the potter from Prostějov manufactured a mixture based on Prussian blue which he ultimately did not achieve but was left with a perfectly viable alternative. Throughout the 18th century, PB was not used for pottery glazes from other parts of the world either, as it was mostly used for paintings [26]. According to Černohorský, the blue powder could be utilised for decorative purposes after the second firing. This decorative technique was well known in the Moravia region since approximately the 1760s and was known under the German term *Überglasumalerei* [21]. In the findings of Anabaptist faience from 17th century Hungary, another blue colourant based on $\text{CoO} + \text{As}_2\text{O}_3$, FeO , and NiO was used [1]. This was applied on tin-based glazes whereas Prostějov potter Jan Skřivánek either manufactured lead glazes (see Table 1) or his tin mixtures were not found during excavation.

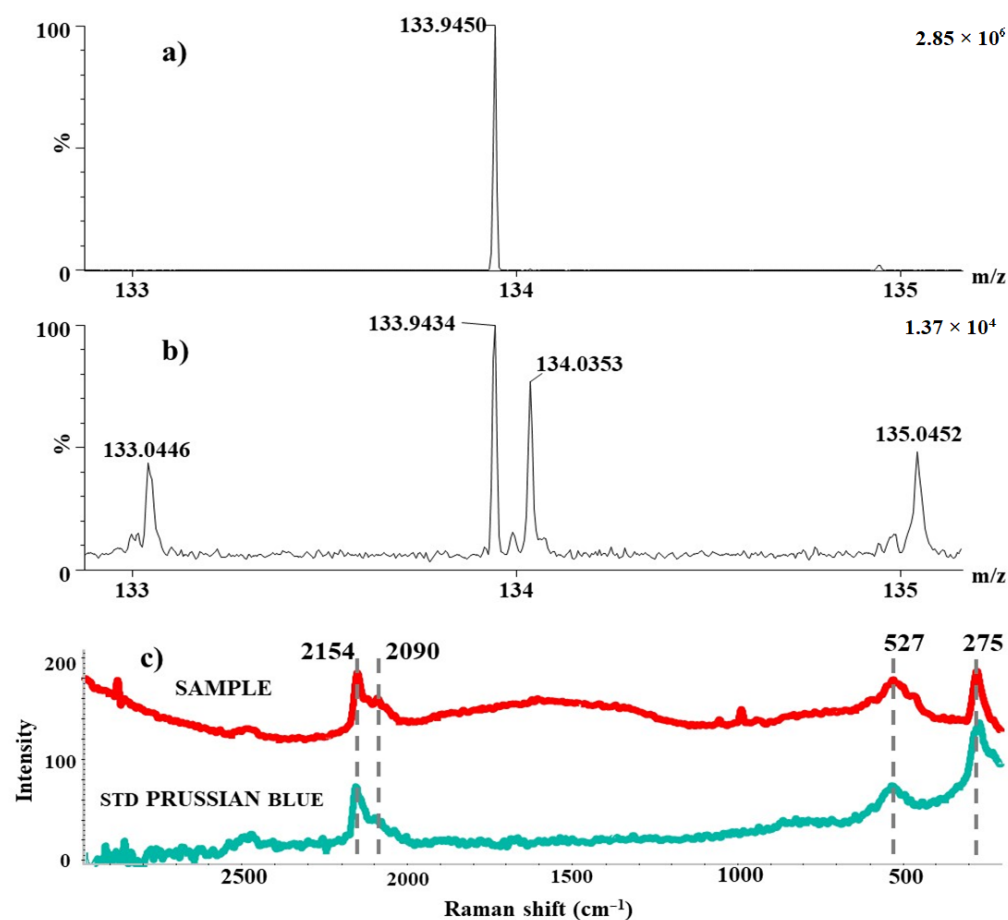


Figure 4. MS spectrum of the PB standard (a), MS spectrum of analysis of the blue powder (b), Raman spectrum of the blue powder, and the PB standard (c).

Analysis of the organic binders in blue powder was performed by ASAP-IM-MS and LDI-MS. The content of organic additives was substantially lower in this sample compared to the sample of the pink powder. In the blue powder, we identified only the same diglycerols as in the case of the pink powder, SS, SP, and PP with *dtm* 1.2, 1.2, and 1.3 mDa, respectively (for fragmentation spectra see Figures S11–S13). The LDI-MS in the negative ionisation mode detected three common fatty acids, i.e., palmitic, stearic, and oleic acid in the blue faience powder, further confirming the presence of fatty material in the faience materials (see Figures S14 and S15). We hypothesise that the blue mixture also was prepared similarly to oil paints. None of the aforementioned compounds were found in colourless powder.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Abietic acid (Lachema, Brno, Czech Republic), acetone (HPLC grade $\geq 99.8\%$, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), acetonitrile (Honeywell, Charlotte, NC, USA), dehydroabiatic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA), hydrochloric acid (Analaure, 34–37%, Analytika, Praha, Czech Republic), hydrofluoric acid (Analaure, 48%), leucine enkephalin (HPLC $\geq 95\%$, Sigma Aldrich), methanol (LC-MS $\geq 99.9\%$, Honeywell), Mili-Q water (Merc), nitric acid (Analaure, 67–69%), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) ($\geq 99.0\%$, Sigma Aldrich), Prussian blue (laboratory prepared), red phosphorus (Sigma Aldrich) for the mass calibration of LDI-MS), sodium formate for the TOF calibration (prepared by mixing 100 μL 0.1 M sodium hydroxide (Fluka, Buchs, Switzerland) with 200 μL 10% formic acid (99–100%, Analar Normapur) and diluted with a mixture of acetonitrile/water (80:20, *v/v*), and sodium hydroxide (Penta, p.a., Brno, Czech Republic) were used.

3.2. Scanning Electron Microscopy–Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDX)

Raw faience materials were mounted on carbon foil, carbon coating (25 nm), analysed with SEM-EDX (JEOL JXA-8600), and the chemical composition of single minerals or fragments of glass were established. In other instances, and in the case of the very fine-grained pink powder, “bulk” analyses were performed by targeting a larger area to determine the composition of the whole mixture. The conditions of analysis were set as follows: accelerating voltage 15 kV, beam current 10 nA, beam diameter 1–5 μm , and counting time 60 s per spectrum. Acquired spectra were quantified by IdFix software (remX GmbH) and the following set of standards: albite (Na), diopside (Mg, Ca), microcline (Si, Al, K), apatite (P), barite (Ba, S), ilmenite (Ti, Fe), strontianite (Sr), and lead metal (Pb).

3.3. Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS)

A microwave digestion unit MLS 1200 Mega (Milestone, Italy) was employed for sample mineralisation. Prior to the mineralisation step, the powder samples were manually milled and homogenised. Subsequently, approximately 20 mg of homogenised samples were digested with a mixture of concentrated HNO_3 (1 mL), HCl (3 mL), and HF (0.125 mL) according to a seven-step digestion program consisting of 2 min at 250 W, 2 min at 0 W, 5 min at 400 W, 2 min at 0 W, 2 min at 500 W, 2 min at 0 W, and 6 min at 600 W. After digestion and cooling, the samples were diluted with deionised water to 10 mL, transferred into polypropylene tubes and stored at 4 °C until ICP-MS analysis. Blank samples were prepared by digestion of the mixture of acids but without the presence of the sample.

All measurements were carried out using an inductively coupled plasma mass spectrometer 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), fitted with an ASX-520 autosampler, a MicroMist concentric nebuliser, a cooled Scott-type double pass spray chamber, and an octopole reaction cell operating in Helium mode to overcome spectral interferences. The instrumental conditions for the semi-quantitative analysis of selected isotopes (up to 70 elements) by ICP-MS were set as follows: RF power of 1600 W, plasma gas Ar flow rate of 15.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, an auxiliary gas Ar flow rate of 0.61 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebuliser

gas Ar flow rate of $0.36 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, collision gas He flow rate of $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (He mode) or $0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (No Gas mode). All ICP-MS analyses were performed in six replicates. Obtained data were evaluated in MassHunter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

3.4. Pyrolysis–Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Py-GC/MS)

Gas chromatographic analysis was carried out on an Agilent 8890 coupled to a mass detector Agilent 5977B (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Pyrolysis of samples was performed with a multi-shot pyrolyzer EGA/PY-3030D (Frontier Lab, New Ulm, MN, USA) at $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 0.5 min. A capillary column Ultra Alloy UA5(MS/HT), $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$ (Frontier Laboratories Ltd., Fukushima, Japan) was operated with helium as a carrier gas at a constant flow rate of $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The oven program was as follows: $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 min followed by a $20 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ramp to a final temperature of $320 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and held for 15 min. The total run time was 32.50 min. The injection was performed in a split mode with a 60:1 split ratio. MassHunter Qualitative Analysis software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used for data evaluation. A microsample of the potter's pink powder was put into a pyrolyzer cup. Derivatisation was carried out with $2 \text{ }\mu\text{L}$ of BSTFA prior to Py-GC/MS analysis.

3.5. Direct Mass-Spectrometric Analysis

ASAP-IM-MS and FIA/ESI-MS analyses were performed on Synapt G2-S (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an atmospheric solid analysis probe (ASAP) and electrospray ionisation (ESI) source, a hybrid QqTOF mass analyser, and an ion mobility cell (TriWave). Exact masses of analytes were obtained by correction to the mass of leucine enkephalin (556.2771 Da) at a concentration of $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ in water/ACN 80/20 (*v/v*) with 0.1% formic acid, which was measured during each run. Data acquisition and processing were performed by MassLynx (Waters, Manchester, UK). LDI-MS analyses were done using a high-resolution tandem mass spectrometer Synapt G1 equipped with a Q-TOF analyser and vacuum MALDI ion source (Waters). Obtained spectra were treated using MassLynx 4.2. In all cases, the TOF analyser was set to resolution mode (V-mode).

3.5.1. Atmospheric Solids Analysis Probe Ion Mobility Mass Spectrometry (ASAP-IM-MS)

Analyses of the three powders were performed by means of ASAP-IM-MS. This ionisation technique utilises a stream of hot nitrogen to evaporate analytes deposited on a glass capillary tube and ionises them in corona discharge [40]. Since this approach does not require extensive sample preparation, samples were prepared in a form of acetone suspension ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) that was introduced into an open-ended glass capillary by capillary elevation. After evaporation of the solvent, roughly $10 \text{ }\mu\text{g}$ of the solid sample was subjected to analysis. The glass capillary was transferred to the mass spectrometer ion source and the analytes were evaporated by a stream of nitrogen and finally reached the temperature of $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Evaporated analytes were subsequently ionised in the plasma created by a corona discharge, and the ionised species were additionally separated according to their shape, size, and charge in the ion mobility cell. The experimental conditions were set as follows: Ionisation mode positive, analysis time 3 min, trap collision energy 4 eV, transfer collision energy 2 eV, source temperature $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sampling cone 80 V, corona current $2 \text{ }\mu\text{A}$, nitrogen flow rate $500 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, nitrogen temperature of $500\text{--}600 \text{ }^{\circ}\text{C}$, IM wave velocity of $550 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, IM wave height of 40 V, and helium drift gas. The parameters for the fragmentation experiments were as follows: LM resolution 15, and transfer collision energy (transfer CE) values are listed in Supplementary Material Figures S4–S13 for each compound.

3.5.2. Flow Injection Analysis Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (FIA/ESI-MS)

FIA/ESI-MS was utilised for the analysis of the decomposed blue pigment in an alkaline solution. Sample preparation and method parameters were adopted from [41]. The parameters were set as follows: Ionisation mode negative, capillary voltage 2.30 kV, sampling cone 30 V, analysis time 2 min, trap collision energy 4 V, transfer collision energy

2 V, source temperature: 120 °C, desolvation gas 250 °C at a rate of 360 L·h⁻¹, nebuliser 6 bar, mass range 50–600 Da, and scan time 1 s. A mixture of methanol and water (1:1, v/v) at a flow rate of 0.075 mL·min⁻¹ was used as a mobile phase, and 5 µL of the sample was injected.

The sample of standard Prussian Blue (PB, synthesised in our laboratory by mixing a solution of 1 M iron(III) chloride with a 1 M solution of a hexacyanoferrate(II) salt) was prepared at a concentration of 0.05 mg·mL⁻¹ in 0.04 M solution of NaOH. The decomposition was supported by sonification in an ultrasound bath at laboratory temperature in sweep mode for 30 min. The blue powder sample was decomposed in the same way, i.e., approximately 2.5 mg were weighed and dissolved in 10 mL of 0.04 M NaOH. A blank sample was prepared from a 0.04 M solution of NaOH. All samples were diluted ten times and filtered with syringe filters before injection into the system.

3.5.3. Laser Desorption-Ionisation Mass Spectrometry (LDI-MS)

Raw faience materials were fixed on a standard stainless steel MALDI plate using double-sided tape (Ulith, Prague, Czech Republic) and the MALDI plates were inserted into the MALDI chamber for analysis. Mass calibration for the LDI-MS experiments was done by the measurement of red phosphorus which was deposited as acetone suspension (10 mg·mL⁻¹) on a selected position on the MALDI plate. Samples were analysed in both positive and negative ionisation modes without the application of a matrix. Parameters of LDI-MS were set as follows: sample plate 10 V, hexapole bias 10, source gas flow 0 mL·min⁻¹, trap collision energy 6 eV, cooling gas flow 10 mL·min⁻¹, transfer collision energy 4 eV, laser energy 500 (arb), trap gas flow 1.5 mL·min⁻¹, and laser firing rate 200. Manual laser aiming was used.

3.6. Raman Spectroscopy

Raw faience materials were analysed using a DXR2 Raman microscope (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The parameters were as follows: laser wavelength 785 nm, laser power 1 mW, aperture 50 mm slit, collect exposure time 2 s, and 16 sample exposures. 16. Omnic 9 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used for data evaluation.

4. Conclusions

Modern analytical techniques were used to evaluate historical raw faience materials. The colouring agent in the pink powder was probably iron in the form of Fe₂O₃. The colourant in blue powder is Prussian blue. To the best of our knowledge, this is the first evidence of PB in faience materials. Additionally, Py-GC/MS and ASAP-IM-MS determined constituents of plant resin, beeswax, and fats in the pink powder. The blue powder contained only fat constituents (according to ASAP-IM-MS and LDI-MS). Both coloured powders were probably prepared in a manner also used for the preparation of oil paints [37]. The colourless powder consists of various glass materials, lead as the glaze-forming ingredient, and possibly opacifiers. An obvious difference is observable between the technology used by Hungarian Anabaptists from the 17th century [1] and the potter from early 19th century Prostějov, especially regarding the glazes and blue colour, but it is possible that some parts of the glaze mixture from Prostějov are missing. Some minerals present in the potter's powders, or crushed glass, must have been imported from other parts of Moravia, Silesia, Bohemia, or elsewhere. Baryte (BaSO₄), the source of Ba in the blue powder, is known from several polymetallic ore deposits in the Bohemian Massif such as Horní Benešov, Zlaté Hory (then Zuckmantel) in Silesia (83 km from Prostějov [42]) or the suburbs of Jihlava (110 km) in the Bohemian-Moravian Highlands. The latter two sources comprise galena mineralisation [42,43], a possible source of Pb in the pink and blue powders and the crushed glass. As major mining activities around Jihlava occurred in the Middle Ages, the deposits from Zlaté Hory (or elsewhere) are more likely to be the sources [42] to have supplied the pottery masters in Prostějov. This seems more likely, as Zlaté Hory was a traditional source of chalcopyrite and other Cu-ores [44], potential

colourants of the analysed pink powder. Apart from Zlaté Hory, a possible source of the lead (litharge) is the deposit at Příbram-Zlaté hory, a major source of Central European lead and silver in the 19th century [45], albeit somewhat distant from Prostějov (225 km). If green vitriol (FeSO_4) was indeed used in the glaze mixtures, it could have been acquired from any pit water of the mentioned deposits (i.e., Zlaté Hory or another). To the best of our knowledge, this is the first study describing the composition of raw faience materials by modern analytical techniques and the obtained results help to understand the early part of the manufacturing process in the Central European region.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27165205/s1>, Figure S1: LDI-MS spectra of the pink powder in positive ion mode, Figure S2: LDI-MS spectra of the blue powder in positive ion mode, Figure S3: LDI-MS spectra of the blue powder in negative ion mode (full range), Figure S4: MS/MS spectra of 463.4858 Da in pink powder, Figure S5: MS/MS spectra of 491.5186 Da in pink powder, Figure S6: MS/MS spectra of 519.5491 Da in pink powder, Figure S7: MS/MS spectra of 619.6385 Da in pink powder (a) and beeswax (b), Figure S8: MS/MS spectra of 551.4991 Da in pink powder, Figure S9: MS/MS spectra of 579.5327 Da in pink powder, Figure S10: MS/MS spectra of 607.5640 Da in pink powder, Figure S11: MS/MS spectra of 551.4991 Da in blue powder, Figure S12: MS/MS spectra of 579.5327 Da in blue powder, Figure S13: MS/MS spectra of 607.5677 Da in blue powder, Figure S14: LDI-MS spectra of the blue powder in negative ion mode (zoomed range 250–270 Da; lock-mass correction using PbO_2H^- clusters), Figure S15: LDI-MS spectra of the blue powder in negative ion mode (zoomed range 280–290 Da; lock-mass correction using PbO_2H^- clusters).

Author Contributions: Conceptualisation, L.K., K.J. and P.F.; methodology, L.K., K.J., R.P., J.N., P.B., J.K. and T.Z.; data curation, L.K., M.M., J.K. and P.B.; investigation, K.J., M.M., L.K. and P.F.; resources, P.F.; writing—original draft preparation, L.K., M.M. and K.J.; writing—review and editing, O.K. and L.R.; visualisation, K.J., R.P. and L.K.; supervision, L.K. and P.B.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ERDF/ESF (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378) and Palacký University (IGA_PrF_2022_023).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the privacy policy of the author's institution.

Acknowledgments: This publication was supported by the project ERDF/ESF “Arteca: Advanced physical-chemical methods of research and protection of cultural and artistic heritage” (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378) and by the Institutional Project of the Palacký University (IGA_PrF_2022_023).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bajnóczi, B.; Nagy, G.; Tóth, M.; Ringer, I.; Ridovics, A. Archaeometric characterization of 17th century tin-glazed Anabaptist (Hutterite) faience artefacts from North-East-Hungary. *J. Archaeol. Sci.* **2014**, *45*, 1–14. [CrossRef]
2. Ma, H.; Henderson, J.; Evans, J. The exploration of Sr isotopic analysis applied to Chinese glazes: Part two. *Archaeometry* **2016**, *58*, 68–80. [CrossRef]
3. Tite, M.S.; Shortland, A.J.; Schibille, N.; Degryse, P. New data on the soda flux used in the production of Iznik glazes and Byzantine glasses. *Archaeometry* **2016**, *58*, 57–67. [CrossRef]
4. Bouquillon, A.; Castaing, J.; Barbe, F.; Paine, S.R.; Christman, B.; Crépin-Leblond, T.; Heuer, A.H. Lead-glazed rustiques figulines (rustic ceramics) of Bernard Palissy (1510–90) and his followers. *Archaeometry* **2017**, *59*, 69–83. [CrossRef]
5. Bouquillon, A.; Castaing, J.; Barbe, F.; Crepin-Leblond, T.; Tilliard, T.; Paine, S.R.; Christman, B.; Heuer, A.H. French decorative ceramics mass-produced during and after the 17th century: Chemical analyses of the glazes. *Archaeometry* **2018**, *60*, 946–965. [CrossRef]

6. Shen, J.Y.; Henderson, J.; Evans, J.; Chenery, S.; Zhao, F.Y. A study of the glazing techniques and provenances of Tang Sancai glazes using elemental and lead isotope analyses. *Archaeometry* **2019**, *61*, 358–373. [[CrossRef](#)]
7. Shen, J.Y.; Ma, H.; Henderson, J.; Evans, J.; Chenery, S.; Wang, F.; Wen, R. Chemical and strontium isotope analysis of Yaozhou celadon glaze. *Archaeometry* **2019**, *61*, 1039–1052. [[CrossRef](#)]
8. Ma, H.; Wood, N.; Doherty, C.; Zheng, J.; Zhou, G.; Duan, H. New insights into the calcium flux used in ancient Longquan and Yue kilns based on strontium isotopic compositions. *Archaeometry* **2019**, *61*, 342–357. [[CrossRef](#)]
9. Zhou, X.Q.; Cui, J.F.; Ren, X.Y.; Wang, Q.Q.; Du, W.; Du, Z.W.; Liu, X.Y. The earliest high-fired glazed ceramic in China: Evidence from a glazed ceramic sample from the Lajia site, Qinghai province. *Archaeometry* **2019**, *61*, 588–599. [[CrossRef](#)]
10. Ting, C.; Lichtenberger, A.; Raja, R. The technology and production of glazed ceramics from Middle Islamic Jerash, Jordan. *Archaeometry* **2019**, *61*, 1296–1312. [[CrossRef](#)]
11. Mangone, A.; De Benedetto, G.; Fico, D.; Giannossa, L.; Laviano, R.; Sabbatini, L.; van der Werf, I.; Traini, A. A multianalytical study of archaeological faience from the Vesuvian area as a valid tool to investigate provenance and technological features. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 2860–2868. [[CrossRef](#)]
12. Neff, H. Analysis of Mesoamerican Plumbate Pottery Surfaces by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *J. Archaeol. Sci.* **2003**, *30*, 21–35. [[CrossRef](#)]
13. Tanasi, D.; Brunelli, D.; Cannavò, V.; Levi, S. Archaeometric characterization of prehistoric pottery from Baħrija, Malta. *J. Archaeol. Sci. Rep.* **2019**, *27*, 101938. [[CrossRef](#)]
14. Medeghini, L.; Fayek, M.; Mignardi, S.; Coletti, F.; Contino, A.; De Vito, C. A provenance study of Roman lead-glazed ceramics using lead isotopes and secondary ion mass spectrometry (SIMS). *Microchem. J.* **2020**, *154*, 104519. [[CrossRef](#)]
15. Kuzmanovic, M.; Stancalie, A.; Milovanovic, D.; Staicu, A.; Damjanovic-Vasilic, L.; Rankovic, D.; Savovic, J. Analysis of lead-based archaeological pottery glazes by laser induced breakdown spectroscopy. *Opt. Laser Technol.* **2021**, *134*, 106599. [[CrossRef](#)]
16. Spataro, M.; Mommsen, H.; Villing, A. Making pottery in the Nile Delta: Ceramic provenance and technology at Naukratis, 6th–3rd centuries BC. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2019**, *11*, 1059–1087. [[CrossRef](#)]
17. Wang, Y.; Yu, S.; Tong, M.; Wang, W.; Yang, X. Deciphering the formation mechanism of ancient Jun wares copper red and blue glazes. *J. Cult. Herit.* **2021**, *48*, 29–35. [[CrossRef](#)]
18. Toffolo, M.; Klein, E.; Elbaum, R.; Aja, A.; Master, D.; Boaretto, E. An early Iron Age assemblage of faience beads from Ashkelon, Israel: Chemical composition and manufacturing process. *J. Archaeol. Sci.* **2013**, *40*, 3626–3635. [[CrossRef](#)]
19. Marco de Lucas, M.C.; Moncada, F.; Rosen, J. Micro-Raman study of red decorations in French faiences of the 18th and 19th centuries. *J. Raman Spectrosc.* **2016**, *37*, 1154–1159. [[CrossRef](#)]
20. Zaremba, M.; Trzciński, J.; Rogulska, M.; Kaproń, G.; Welc, F.; Południkiewicz, A. A Multiproxy Approach to the Reconstruction of an Ancient Manufacturing Technology: A Case Study of a Faience Ptolemaic Bowl from Tell Atrib (Nile Delta). *Minerals* **2020**, *10*, 785. [[CrossRef](#)]
21. Černohorský, K. *Moravská Lidová Keramika*, 1st ed.; J. Otto: Prague, Czech Republic, 1941; p. 284.
22. Gregerová, M.; Hložek, M.; Kuljovská, Z. Mikropetrografické a petrochemické rozborů novověké glazované keramiky z lokality Strachotín. *Geol. Výzk. Mor. Slez.* **2006**, *2007*, 95–100.
23. Fojtík, P. Prostějov (okr. Prostějov), fig. 47–50. *Přehl. Výzk.* **2017**, *58*, 243–244.
24. Dodd, A. *Dictionary of Ceramics*, 3rd ed.; The University Press: Cambridge, UK, 1994; p. 371.
25. Ebinu, A.I.; Olanrewaju, Y.A.; Ogolo, O.; Adetunji, A.R.; Onwualu, A.P. Barite as an industrial mineral in Nigeria: Occurrence, utilization, challenges and future prospects. *Heliyon* **2021**, *7*, e07365. [[CrossRef](#)]
26. Eastaugh, N.; Walsh, V.; Chaplin, T.; Siddall, R. *The Pigment Compendium: A Dictionary and Optical Microscopy of Historical Pigments*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2004; p. 499.
27. Vodičková, N. Taxonomic and Individual Differentiation of Burned and Unburned Bones Using X-ray Fluorescence (XRF). Diploma Thesis, University of West Bohemia, Plzeň, Czech Republic, 2017; p. 83.
28. Rasmussen, K.L.; Milner, G.R.; Delbey, T.; Ivalu Jensen, L.K.; Witte, F.; Rehren, T.; Kjaer, U.; Grinder-Hansen, P. Release of lead from Renaissance lead-glazed ceramics from southern Denmark and northern Germany: Implications from acetic acid etching experiments. *Herit. Sci.* **2022**, *10*, 63. [[CrossRef](#)]
29. Cartechini, L.; Miliani, C.; Nodari, L.; Rosi, F.; Tomasin, P. The chemistry of making color in art. *J. Cult. Herit.* **2021**, *50*, 188–210. [[CrossRef](#)]
30. Gliozzo, E. Pigments—Mercury-based red (cinnabar-vermilion) and white (calomel) and their degradation products. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2021**, *13*, 210. [[CrossRef](#)]
31. Colomban, P. Rocks as blue, green and black pigments/dyes of glazed pottery and enamelled glass artefacts: A review. *Eur. J. Mineral.* **2013**, *25*, 863–879. [[CrossRef](#)]
32. Freestone, I.C. Composition and microstructure of early opaque red glasses, early vitreous materials. *Br. Mus. Occas. Pap.* **1987**, *56*, 173–191.
33. Gedzevičiūtė, V.; Welter, N.; Schüssler, U.; Weiss, C. Chemical composition and colouring agents of Roman mosaic and millefiori glass, studied by electron microprobe analysis and Raman microspectroscopy. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2009**, *1*, 15–29. [[CrossRef](#)]
34. Reitner, J.; Thiel, V. *Encyclopedia of Geobiology*, 1st ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; pp. 25–28.
35. Keeling, C.; Bohlmann, J. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2415–2423. [[CrossRef](#)]
36. Colombini, M.; Modugno, F. *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, 1st ed.; Wiley: Oxford, UK, 2009; pp. 97–100.

37. Slánský, B. *Technika malby I. Díl, Malířský a conservační materiál*, 1st ed.; Státní Nakladatelství Krásné Literatury, Hudby a Umění: Prague, Czech Republic, 1953; p. 141.
38. Gu, Z.; Kenoyer, J.; Yang, Y. Investigation of ancient Harappan faience through LA-ICP-AES and SR- μ CT. *J. Instrum.* **2016**, *11*, C04001. [[CrossRef](#)]
39. Moretti, G.; Gervais, C. Raman spectroscopy of the photosensitive pigment Prussian blue. *J. Raman Spectrosc.* **2018**, *49*, 1198–1204. [[CrossRef](#)]
40. McEwen, C.; McKay, R.; Larsen, B. Analysis of Solids, Liquids, and Biological Tissues Using Solids Probe Introduction at Atmospheric Pressure on Commercial LC/MS Instruments. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7826–7831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Pauk, V.; Havlíček, V.; Papoušková, B.; Sulovský, P.; Lemr, K. Simultaneous identification of historical pigments Prussian blue and indigo in paintings by electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spec.* **2013**, *48*, 927–930. [[CrossRef](#)]
42. Fojt, B.; Hladíková, J.; Kalenda, F. Zlaté Hory ve Slezsku: Největší rudní revír v Jeseníkách, Část 2.: C. Geologie D. Mineralogie E. Geochemie stabilních izotopů. *Acta Mus. Morav. Sci. Geol.* **2001**, *86*, 3–58.
43. Sejkora, J.; Kouřimský, J. *Atlas Minerálů České a Slovenské Republiky*, 1st ed.; Academia: Prague, Czech Republic, 2005; p. 376.
44. Starý, J.; Kavina, P.; Vaněček, M.; Sitenský, I. *Surovinové Zdroje České Republiky: Nerostné Suroviny*; Ministerstvo Životního Prostředí & Česká Geologická Služba–Geofond: Prague, Czech Republic, 2005; p. 213.
45. Kunický, Z.; Vurm, K. *700 Let Hutnictví Stříbra a Olova na Příbramsku (1311–2011), 225 Let Stříbrné Hutě—Kovohutí Příbram (1786–2011): 700 Years Anniversary of Příbram's Metallurgy (1311–2011), 225 Years Anniversary of Silver Smelting Works—Kovohutě Příbram (1786–2011)*; Kovohutě Příbram: Příbram, Czech Republic, 2011; p. 212.

Article

First Evidence of “Earth Wax” Inside the Casting Molds from the Roman Era

Klára Jagošová ¹ , Jan Jílek ², Pavel Fojtík ³, Ivan Čižmář ³, Miroslav Popelka ³, Ondřej Kurka ¹ and Lukáš Kučera ^{1,*} 

- ¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. Listopadu 12, 779 00 Olomouc, Czech Republic; klara.jagosova01@upol.cz (K.J.); ondrej.kurka@upol.cz (O.K.)
² Section Classical Archaeology, Department of Archaeology and Museology, Faculty of Arts, Masaryk University, Joštova 220/13, 662 43 Brno, Czech Republic; jilek@phil.muni.cz
³ Institute of Archaeological Heritage Brno, Kaloudova 1321/30, 614 00 Brno, Czech Republic; fojtik@uapp.cz (P.F.); cizmar@uapp.cz (I.Č.); popelka@uapp.cz (M.P.)
* Correspondence: lukas.kucera@upol.cz

Abstract: This research was focused on the analysis of material composition and organic residues present in three molds found in the Moravian region (Czech Republic) belonging to the Roman era. X-ray fluorescence spectroscopy pointed out the possible remelting of Roman objects in Barbarian territory. The analysis of organic residues retrieved from the internal part of mold #2 by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry proved the presence of ozokerite wax (“earth wax”). Consequent analysis of this organic residue by Atmospheric Solids Analysis Probe–ion mobility spectrometry–high-resolution mass spectrometry (ASAP-IMS-HRMS) confirmed the presence of ceresin, the main component of ozokerite. Ceresin was also detected in a sample of the organic residue from mold #1. Note that this is the first application of ASAP-IMS-HRMS in archaeological research. The remains of earth wax in molds suggest the production of wax models as an intermediate stage for the production of lost-wax ceramic casting molds.

Keywords: earth wax; ceresin; soot; X-ray fluorescence; gas chromatography; Roman era; mold; mass spectrometry; ion mobility



Citation: Jagošová, K.; Jílek, J.; Fojtík, P.; Čižmář, I.; Popelka, M.; Kurka, O.; Kučera, L. First Evidence of “Earth Wax” Inside the Casting Molds from the Roman Era. *Molecules* **2021**, *26*, 4259. <https://doi.org/10.3390/molecules26144259>

Academic Editor:
Ryszard Amarowicz

Received: 21 May 2021
Accepted: 8 July 2021
Published: 13 July 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The study of the production of non-ferrous metal objects in Central European Barbaricum is one of main tasks in the current research of the Roman era [1–6]. The recent chemical analysis of a metal mold belonging to Urnfield culture (1300–800/750 BC) proved the presence of carbon and beeswax in the inner part of the mold using infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Authors hypothesize that carbon coating in the inner part of the casting mold could have been used as a layer preventing the mold from welding with the liquid metal poured into it [7]. Note that molds made of copper alloys are typical for the Barbarian region in the Roman era, where we register more findings than in the area of the former Roman Empire [8]. Another study, describing the usage of wax in metallurgical processes, was focused on GC/MS analysis of lost-wax ceramic casting molds in southern Levant [9]. This study revealed that not only animal waxes (such as beeswax), but also mineral ones were used. These waxes are commonly considered mineraloids (i.e., non-crystalline substances). The main representative of the group of mineraloids is ozokerite, also called “earth wax” [10,11]. This mineraloid can be found in bituminous deposits of Miocene age, close to oil-bearing deposits (including huge natural deposits in southeastern Poland and the northwestern Ukraine) [12]. Note that the extraction of ozokerite (specifically ceresin) is performed by boiling bituminous earth in water, and floating wax is collected [10]. The usage of wax in prehistory is well known, but its chemical detection in ancient artefacts is not so

common, and the application of earth wax in prehistory was not detected at all. The main area in which wax materials were studied in more detail is art history. For that purpose, GC/MS [13–16], pyrolysis-GC/MS [13,17] and vibrational spectroscopy [12] were used.

The aim of this article is to perform detailed chemical analysis of three casting molds originating in the Roman era using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS), Atmospheric Solids Analysis Probe-ion mobility spectrometry-high-resolution mass spectrometry (ASAP-IMS-HRMS) and X-ray fluorescence spectrometry (XRF). To the best of our knowledge, there is no article dealing with the chemical analysis of organic compounds in casting molds from the Roman period. Moreover, this is the second evidence of application of Atmospheric Solids Analysis Probe-mass spectrometry in archaeological research, but it is being recorded for the first time in combination with ion mobility mass spectrometry.

2. Results and Discussion

Three molds from locations Klenovice na Hané (mold #1), Mikulov (mold #2) and Velké Hostěrádky (mold #3) were analyzed using XRF for the determination of their elemental composition (Figure 1). Table 1 shows that molds #1 and #2 contain high amount of Pb, i.e., 5.35% and 14.61%, respectively. Note that a similar chemical composition (high content of Pb) was also found in the case of objects related to metallurgy, i.e., a drainage channel of a damaged mold (10.25% of Pb) [18] and a mold of a knee-shape fibula (19.70% of Pb) [19]. In contrast, mold #3 contains only trace amounts of Pb (0.64%). This suggests that an alloy different from the Roman type was used in the melting process [18]. Lead was mainly used in the Roman Empire for the preparation of alloys for the production of statues, small statuettes, massive parts of toreutic products (e.g., attaches and protomes of bronze vessels) [1,6,20] and certain types of fibulae and their components [20,21]. The advantage of lead addition to alloys was the improved “flowability” of the metal, which provides homogeneous infilling of the mold [22,23]. However, in the Barbarian territory (Germania Magna), lead alloys were not very popular for the production of small metal objects (fibulae, belt fittings, etc.). High lead content in alloys was undesirable due to a higher risk of object damage during their consequent manual modification [6]. Considering the significant popularity of lead in the Roman Empire [6] and its addition to alloys (especially from the beginning of the second century to the fourth century AD [20]), we hypothesize that molds #1 and #2 were made by the remelting of objects of Roman origin [6,18]. The origin of alloy of mold #3 cannot be specified.

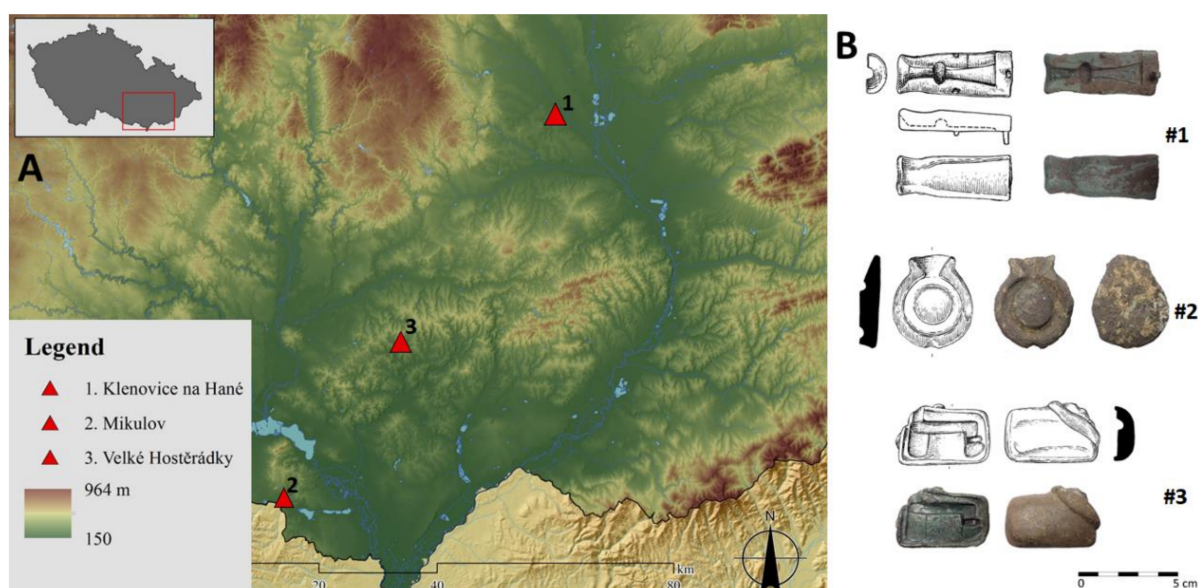


Figure 1. Map of the Moravian region with the locations of finds (A), photos and drawings of studied molds (B).

Table 1. XRF analysis of alloy samples from the examined mold samples (avg—average; SD—standard deviation).

Element	Mold #1		Mold #2		Mold #3	
	avg	SD	avg	SD	avg	SD
Cu	88.64	3.62	79.33	4.15	98.17	0.70
Pb	5.35	2.33	14.61	2.93	0.64	0.25
Zn	2.82	0.06	1.62	0.06	0.00	0.00
Sn	2.69	1.55	3.97	1.21	0.56	0.36
Fe	0.37	0.19	0.13	0.02	0.20	0.09
Ni	0.06	0.01	0.05	0.01	0.05	0.01
Ti	0.04	0.03	0.08	0.00	0.04	0.03
Co	0.01	0.02	<LOD	-	<LOD	-
Au	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
Zr	<LOD	-	0.01	0.00	<LOD	-
Cr	<LOD	-	0.01	0.00	0.01	0.01
Sr	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
Nb	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
Bi	<LOD	-	0.03	0.01	<LOD	-
Mn	<LOD	-	0.01	0.00	0.01	0.00
S	<LOD	-	<LOD	-	0.32	0.23
Ag	<LOD	-	0.15	0.11	0.00	0.00

Subsequent experiments were focused on the analysis of the solid material from molds #1 and #2 (there was no infill present in mold #3) by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS) for the determination of organic compounds. Bonaduce and Colombini found long-chain alkanes indicating beeswax in their sample of the wax sculpture “The Plague” (1691–1694) by Gaetano Zumbo during their studies of works of art by Py-GC/MS [13]. A pyrogram of mold #2 also shows the presence of a higher amount of a long-chain alkane. Long-chain alkanes were found only in C14–C19 range—this could be caused by the pyrolysis of alkanes with longer carbon chains. Additionally, the detection of naphthalene in the chromatogram confirms the presence of organic compounds in the sample (Figure 2). Subsequently, the obtained pyrogram was evaluated using the F-Search program, version 3.6.3. (Frontier Lab, New Ulm, MN, USA). This program allows one to compare the pyrogram (i.e., its combined spectrum from all peaks) with the internal database of polymers in the program. The results point to the presence of ozokerite wax C1–C40 in mold #2 (Figure S1). Note that no long-chain alkanes were detected in pyrogram of mold #1.

The identification of detected compounds (long-chain alkanes) solely using an MS spectra database can be insufficient for the analysis of archaeological samples. For that reason, the ASAP-IMS-HRMS technique, allowing the measurement of the exact m/z value and drift time, was used. ASAP-IMS-HRMS data, obtained by a different ionization technique (at atmospheric pressure conditions), support the obtained results (Figure S2). The ASAP-IMS-HRMS technique (in the MS scan mode) detected a compound with m/z value 321.3122 that was identified as ceresine (deviation from the theoretical mass, dtm 3.5 mDa, $C_{22}H_{41}O^+$). The presence of this compound strongly supports the identification of the source material as earth wax. The analysis of the ceresine standard provided the same peak profile in the mobilogram as the compound found in mold #2 (Figure 3A,B). Furthermore, fragmentation patterns of the ceresine standard and the compound correspond well with each other. The first fragment (m/z 303.2983, dtm 6.3 mDa, $C_{22}H_{39}^+$) arises by the loss of water from the parent ion. The consequent fragments arise by cascade losses of C_2H_4 molecules (see $\Delta 28$ Da in spectra) (Figure 3C,D). Note that compound m/z 321.3181 (dtm—2.4 mDa) was also found in the sample from the mold #1 (Figure S2B) and displayed the same fragmentation pattern as the ceresine standard. However, ceresine is present in a low concentration in this mold, which results in the lower intensity of its MS/MS spectrum (Figure 3D). We can, therefore, suppose that mold #1

contained ozokerite wax as well (Figure 3). To the best of our knowledge, this is the first application of the ASAP-IMS-HRMS technique for the analysis of archaeological samples.

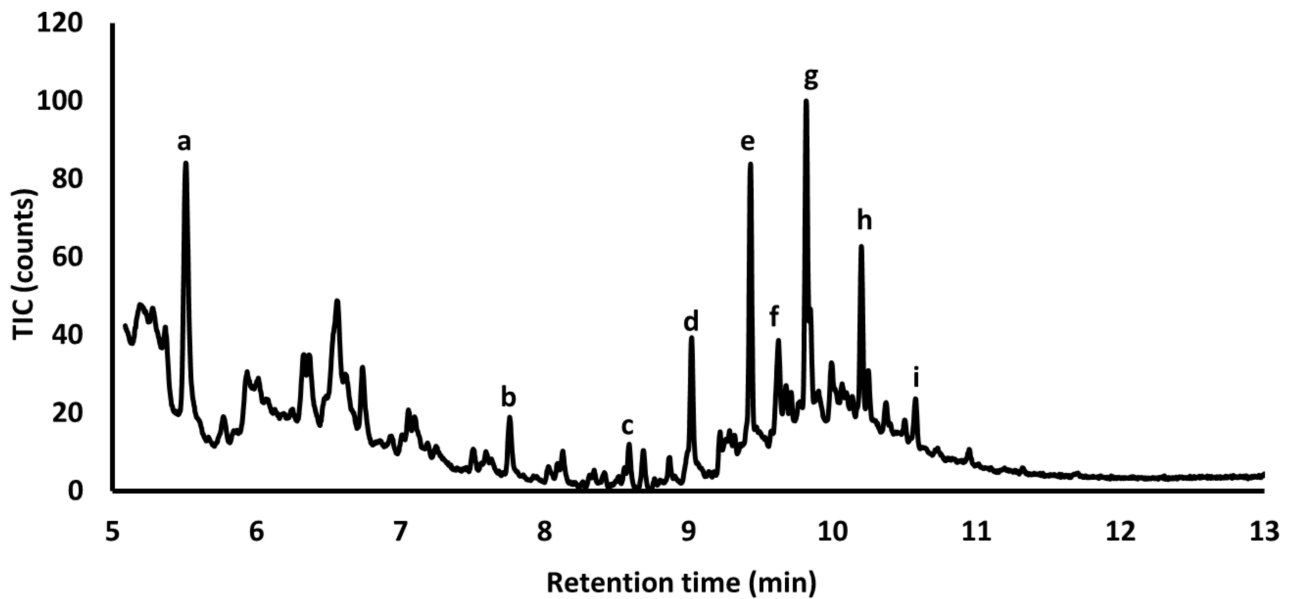


Figure 2. Pyrogram of the solid sample from mold #2 (a—furfural, b—naphtalene, c—tetradecane, d—pentadecane, e—hexadecane, f—2,6,10-trimethyl-pentadecane, g—heptadecane, h—octadecane, i—nonadecane).

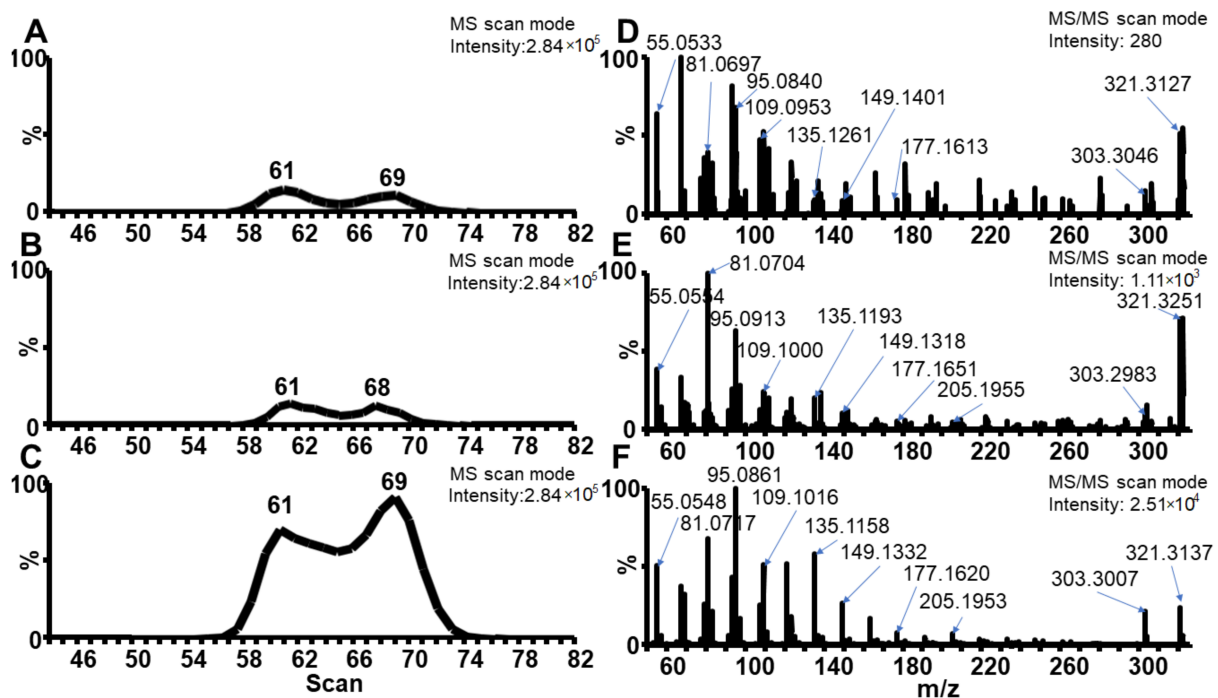


Figure 3. ASAP-IMS-HRMS extracted ion mobilograms (A–C) and ASAP-IM-MS/MS fragmentation spectra for m/z 321.316 (D–F), i.e., detected in mold #1 (A,D), mold #2 (B,E) and ceresin standard (C,F).

The internal part of all three molds contained black pigment that was analyzed by Raman microscopy. The spectra reveal two major signals at 1328 and 1589 cm^{-1} (Figure 4). Sadezky et al. ascribe these very strong and broad signals to soot [24]. Raman analysis of standards of activated carbon confirms these results (Figure 4d).

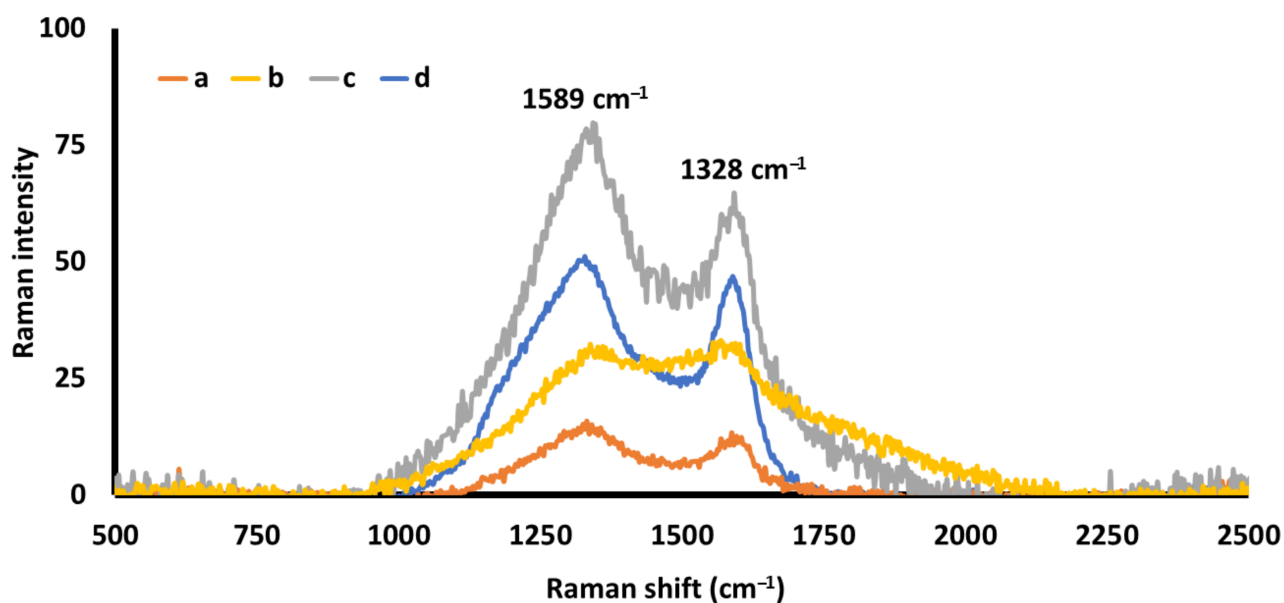


Figure 4. Raman spectra of the black solid material attached to the surface of molds #1 (a), #2 (b) and #3 (c), and activated carbon as the standard material (d).

Advanced chemical analysis of three molds from the Roman era provides important information on barbaric metallurgy. Baron et al. (2016) proposed that the presence of compounds related to wax in the mold points to the fact that the mold has never been used for casting [7]. However, we hypothesize that the remains of wax detected in molds #1 and #2 point to their use for the production of wax models. Such models could be used as an intermediate stage in the production of final objects, which were produced using lost-wax casting molds [25]. Note that carbon layers in the internal parts of molds allow the direct casting of metal objects [7].

3. Materials and Methods

3.1. Archaeological Samples

The research was focused on the analysis of three molds found in the Moravian region (Czech Republic) belonging to the Roman era. The first mold was found at the location Klenovice na Hané, Prostějov district (mold #1, length 57.0 mm, width 23.0 mm, thickness 9.6 mm, stored in the Museum and Gallery Prostějov, inv. no. 310926, Uniform Trigonometric Cadastral Network, UTCN X: 1141119, Y: 552620). The mold was used for the production of strap ends of Raddatz O/12–14 type [26] and Madyda-Legutko type 2/6 [27]. This category of artifacts includes a wide range of strap ends, horse harness belts and sword belt fittings [28,29]. All products belonging to the Raddatz O group fall within the range of years 150/160–240/250 AD [30]. The second mold from the location Mikulov-Mušlov, Břeclav district (mold #2, length 38.0 mm, width 45.0 mm, thickness 11.0 mm, stored in the Moravian museum in Brno, inv. no. 170560, UTCN X: 1205577, Y: 598456) represents a mold used to produce rings—a part of the Vimose-type bridle chain [28,31–33]. These harnesses were popular in the middle Danube region, especially in the second half of the 2nd century, and in the first decades of the 3rd century AD [33,34]. The third mold was found in the location Velké Hostěrádky-Dambořice at the area of Ždánický les, Břeclav and Hodonín district (mold #3; length 46.0 mm, width 30.0 mm, thickness 10.0 mm, stored in the Moravian Museum in Brno, inv. no. 170697, UTCN X: 179421, Y: 578652) This mold was used for the production of a barbaric knee-type fibula, type A 132. These products were popular in the territory of Germania Magna in the second half of the 2nd century AD [19,35–37].

3.2. X-ray Fluorescence Spectrometry (XRF)

A total of 100 mg of sample was taken from the intact core of each mold (three samples from each) using a 0.75 mm carbide drill and Proxxon Micromot 60/EF drill (Proxxon GmbH, Föhren, Germany). Elemental analysis of the samples was performed using an X-ray fluorescence spectrometer Vanta (Olympus, Southborough, MA, USA). The measurement parameters were as follows: analytical mode, excitation energy range: 8–40 kV, acquisition time: 310 s.

3.3. Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Py-GC/MS)

Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry was used for the determination of organic compounds in the solid infill of molds #1 and #2. Agilent 8890 GC system combined with Agilent 5977B MS system with Mass Hunter software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used for the analysis. Separation was performed on UA5-30M-0.25F 20072108S Ultra Alloy (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) with a constant flow of 1.2 mL·min⁻¹. Nitrogen (Messer Group GmbH, Bad Soden, Germany) was used as the collision gas with a flow rate of 1.5 mL·min⁻¹. The initial oven temperature was 70 °C for 1 min; then, the oven was warmed up at the rate of 30 °C·min⁻¹ to the value of 320 °C, which was held for 10 min; acquisition time: 19.3 min, inlet temperature: 300 °C, injection in split mode—ratio 50:1. The pyrolysis of 10 mg of the solid material was performed prior to analysis in an EGA/PY-3030D (Frontier Lab, New Ulm, MN, USA) pyrolysis unit at 550 °C for 0.5 min.

3.4. Atmospheric Solid Analysis Probe-Ion Mobility Spectrometry-High-Resolution Mass Spectrometry (ASAP-IMS-HRMS)

A Synapt G2-S (Waters, Torrance, CA, USA) mass spectrometer equipped with an Atmospheric Solids Analysis Probe, atmospheric pressure chemical ionization and ion mobility (ASAP-IMS-HRMS) was used for the untargeted analysis of individual samples taken from molds #1 and #2. A total of 5 mg of each sample was extracted by 300 µL of acetone (Penta, p.a., Czech Republic) in an ultrasound bath for 15 min. Consequently, the samples were centrifuged for 5 min at 5000 × g RPM and liquid part was evaporated with a fine stream of nitrogen gas. Samples were dissolved in 100 µL of acetone. The glass stick was dipped into the individual acetone extracts. The same clean ASAP glass stick was used as a blank. The glass stick was subsequently fixed to the ASAP probe and inserted to the ion source. A new glass stick was used for each analysis, reducing the risk of the carryover effect. The probe was then gradually heated and desorbed compounds were ionized in a discharge. In order to increase the signal of analytes, approximately 2 µL of extract was loaded into the open-ended glass stick and analyzed in the same manner. The method parameters were as follows: ASAP Mode: positive, time of analysis: 3 min (initial probe temperature, PT: 400 °C, final PT: 600 °C), trap collision energy: 4 eV, transfer collision energy: 2eV, IMS wave velocity: 550 m·s⁻¹, IMS wave height: 40 V, source temperature: 100 °C, sampling cone: 30 V, corona current: 2µA, corona voltage: 3 kV. Lock mass correction of the high-resolution mass spectrometer was performed using a leucine-enkephalin mixture (i.e., *m/z* 556.2771 in positive mode).

3.5. Raman Microscopy (RM)

The black particles found on the surface of molds were analyzed using a DXR2 Raman microscope (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The parameters of measurement were the following: laser wavelength: 785 nm, laser power: 1 mW, aperture: 50 mm slit, collect exposure time: 2 s, amount of sample exposures: 16. A commercially available activated carbon (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as the standard.

4. Conclusions

Three copper alloy molds from the Moravia region belonging to the Roman era were analyzed by XRF, Raman microscopy, Py-GC/MS and ASAP-IMS-HRMS. The elemental composition (i.e., higher content of Pb and Zn) of molds #1 and #2 points to the possibility

of the production of “barbarian” alloys from remelted Roman objects. Mold #3 was made from pure copper, and therefore, it is not possible to further specify its origin. The internal part of all three molds contained a thin black layer that was identified as soot by Raman microscopy. Moreover, molds #1 and #2 contained solid material that was identified as a residue of ozokerite (earth wax). We hypothesize that the remains of earth wax in these molds point to their use for the production of wax models and the consequent use of these models for lost-wax ceramic casting. This first application of ASAP-IMS-HRMS to the analysis of archaeological samples brings new evidence on Barbarian metallurgy and the usage of earth wax in the past.

Supplementary Materials: The following are available online: Figure S1: combined mass spectrum of all detected peaks in pyrogram of the solid sample from mold #2 (A) and the database reference mass spectrum of ozokerite wax C1–C40 (B); Figure S2: ASAP-IMS-HRMS spectrum in MS mode of blank (A), sample from mold #1 (B), mold #2 (C) and ceresin standard (D) in mass range 300–360 Da.

Author Contributions: Conceptualization, L.K., J.J., P.F.; methodology, L.K., K.J.; formal analysis, O.K.; investigation, J.J., K.J., L.K., P.F.; resources, I.Č., P.F., M.P.; data curation, L.K., K.J.; writing—original draft preparation, K.J., L.K., J.J.; writing—review and editing, K.J., J.J., P.F., I.Č., M.P., O.K., L.K.; visualization, P.F., L.K., K.J.; supervision, L.K.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: ERDF/ESF [No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378] and the Grant Agency of Czech Republic [17-17346S].

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the privacy policy of the author’s institution.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge to ERDF/ESF “Arteca: Advanced physical-chemical methods of research and protection of cultural and artistic heritage” [No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378] and the Grant Agency of Czech Republic [17-17346S] for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the corresponding authors.

References

1. Voss, H.U.; Hammer, P.; Lutz, J. Römische und germanische Bunt- und Edelmetallfunde in Vergleich. Archäometallurgische Untersuchungen ausgehend von elbegermanischen Körpergräbern. *Bericht RGK* **1999**, *79*, 123–157.
2. Čizmář, M. Nález bronzových odlévacích forem z doby laténské a římské na Moravě. *Archeol. Rozhl.* **2010**, *57*, 126–136.
3. Baumeister, M. *Metallrecycling in der Frühgeschichte, Untersuchungen zur Technischen, Wirtschaftlichen und Gesellschaftlichen Rolle Sekundärer Metallverwertung im 1. Jahrtausend n. Chr. Würzburger Arbeiten Prähist. Arch.* **3**; Universität Würzburg: Rahden/Westf., Germany, 2004.
4. Schmidt, C.G. Vorbild Feind? Der Mitteldeutsche Fundplatz Frienstedt. Germanische Elite Unter Römischer Einfluss. Ph.D Thesis, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: Kiel, Germany, 2014.
5. Klemet, J. Buntmetallverarbeitung von Einer Kaiserzeitlichen Ansiedlung in Neunheilingen, Unstrut-Hainich-Kreis. In *Archäologie zwischen Römern und Barbaren. Zur Datierung und Verbreitung römischer Metallarbeiten des 2. und 3. Jahrhunderts n. Chr. im Reich und im Barbaricum—Ausgewählte Beispiele (Gefäße, Fibeln, Bestandteile militärischer Ausrüstung, Kleingerät, Münzen)*; Teil II, 19–22 March 2009. Kolloquien zur Vor- und Frühgeschichte Bd. 22/2; Voss, H.U., Scheessel, N.M., Eds.; Hrsg. RGK Dr. Rudolf Habelt GmbH Bonn: Frankfurt a. M.–Bonn, Germany, 2016; pp. 817–838.
6. Könemann, P. *Die kaiserzeitlichen Bunt- und Edelmetallfunde von Kamen-Westick. Verarbeitung römischer Metallimporte in Einer Germanischen Siedlung. Der Anschnitt Beiheft 37. Veröffentlichungen aus dem Deutschen Bergbau-Museum Bochum 222*; VML Verlag Marie Leidorf/VML Vlg Marie Leidorf: Bochum, Germany, 2018.
7. Baron, J.; Miazga, B.; Ntaflos, T.; Puziewicz, J.; Szumny, A. Beeswax remnants, phase and major element chemical composition of the bronze age mould from Gaj Oławski (SW Poland). *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2016**, *8*, 187–196. [[CrossRef](#)]
8. Gudea, N. Eine Fibelgussform aus Bronze aus Porolissum. *Archäologisches Korresp.* **2009**, *39*, 409–414.
9. Namdar, D.; Neumann, R.; Goren, Y.; Weiner, S. The contents of unusual cone-shaped vessels (cornets) from the Chalcolithic of the southern Levant. *J. Archaeol. Sci.* **2009**, *36*, 629–636. [[CrossRef](#)]

10. Masschelein-Kleiner, L. *Ancient Binding Media, Varnishes and Adhesives*; ICCROM: Rome, Italy, 1995.
11. Jehlička, J.; Edwards, H.G.M.; Villar, S.E.J. Raman spectroscopy of natural accumulated paraffins from rocks: Evenkite, ozokerite and hatchetine. *Spectrochim. Acta Part A* **2007**, *68*, 1143–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Edwards, H.G.M.; Falk, M.J.P. Fourier-transform Raman spectroscopic study of unsaturated and saturated waxes. *Spectrochim. Acta Part A* **1997**, *53*, 2685–2694. [[CrossRef](#)]
13. Bonaduce, I.; Colombini, M.P. Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis—Gas chromatography—Mass spectrometry procedures. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 297–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lluveras, A.; Bonaduce, I.; Andreotti, A.; Colombini, M.P. GC/MS analytical procedure for the characterization of glycerolipids, natural waxes, terpenoid resins, proteinaceous and polysaccharide materials in the same paint microsample avoiding interferences from inorganic media. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 376–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cuní, J.; Cuní, P.; Eisen, B.; Savizky, R.; Bové, J. Characterization of the binding medium used in Roman encaustic paintings on wall and wood. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 659–669. [[CrossRef](#)]
16. Regert, M.; Langlois, J.; Colinart, S. Characterisation of wax works of art by gas chromatographic procedures. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1091*, 124–136. [[CrossRef](#)]
17. Bonaduce, I.; Andreotti, A. Py-GC/MS of Organic Paint Binders. In *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*; Colombini, M.P., Modugno, F., Eds.; Wiley: Chichester, UK, 2009; pp. 303–326.
18. Vich, D.; Jílek, J.; Kmošek, J.; Biborski, M.J.; Biborski, M.R.; Martinek, J. Soubor kovových předmětů z doby římské z Boršova na Moravskotřebovsku. *Památky Archeol.* **2020**, *CXI*, 159–192. [[CrossRef](#)]
19. Vich, D.; Kmošek, J.A. Bronze brooch casting mould in eastern bohemia from the period of the marcomannic wars. *Archäologisches Korresp.* **2020**, *50*, 93–106.
20. Jouttijärvi, A. Paper for special issue on “Aspects of Ancient Metallurgy” Roman alloying practice. *Mater. Manuf. Process.* **2017**, 1–14. [[CrossRef](#)]
21. Roxburgh, M.A.; Heeren, S.; Huisman, D.J.; Van Os, B.J.H. Non-destructive survey of early roman copperalloy brooches using portable X-ray fluorescence spectrometry. *Archaeometry* **2019**, *61*, 55–69. [[CrossRef](#)]
22. Durali-Müller, S. Roman Lead and Copper Mining in Germany Their Origin and Development through Time, Deduced from Lead and Copper Isotope Provenance Studies. Ph.D. Thesis, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Frankfurt, Germany, 2005.
23. Horník, P.; Jílek, J.; Militký, J.; Kmošek, J. Sídliště z doby římské v Černčicích (okr. Náchod), doklad výroby kolínkovitých spon a nákončí opasku na přelomu starší a mladší doby římské? *Archeol. Výhodních Čech* **2019**, *18*, 50–74.
24. Sadezky, A.; Muckenhuber, H.; Grothe, H.; Niessner, R.; Pöschl, U. Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information. *Carbon* **2005**, *43*, 1731–1742. [[CrossRef](#)]
25. Tejral, J. Die germanische Giessereiwerkstatt in Pasohlávky (Bez. Břeclav). Ein Beitrag zur Frage der Fernhandels- und Kulturbeziehungen nach den Markomannenkriegen. *Památky Archeol.* **2006**, *XCVII*, 133–170.
26. Raddatz, K. *Der Thorsberger Moorfund. Gürtelteile und Körperschmuck. Offa-Bücher 13*; Wachholtz Verlag: Neumünster, Germany, 1957.
27. Madyda-Lęgutko, R. *Studia Nad Zróżnicowaniem Metalowych Części Pasów w Kulturze Przeworskiej. Okucia Końca Pasa*; Un. Jag., Inst. Arch.: Kraków, Poland, 2011.
28. Lau, N. *Das Thorsberger Moor 1. Die Pferdegeschirre. Germanische Zaumzeuge und Sattelgeschirre als Zeugnisse kriegerischer Reiterei im mittel- und nordeuropäischen Barbaricum*; Stiftung Schleswig-Holsteinische Landesmuseen Schloss Gottorf: Schleswig, Germany, 2014.
29. Ilkjær, J. *Illerup Ådal 3–4. Die Gürtel Bestandteile und Zubehör. Textband, Tafeln*; Jutland Archaeological Society Publications XXV/3; Jysk Arkæologisk Selskab: Aarhus, Denmark, 1993.
30. Blankenfeldt, R. *Das Thorsberger Moor 2, Die persönlichen Ausrüstungen*; Stiftung Schleswig-Holsteinische Landesmuseen Schloss Gottorf: Schleswig, Germany, 2015.
31. Ørsnes, M. Zaumzeugfunde des 1–8. Jahrh. nach Chr. in Mittel- und Nordeuropa. *Acta Archaeol. København* **1993**, *64*, 183–292.
32. Wilbers-Rost, S. *Pferdegeschirr der Römischen Kaiserzeit in der Germania Libera. Zur Entstehung, Entwicklung und Ausbreitung des Zaumzeugs mit Zügelketten. Veröffentlichungen der Urgeschichtlichen Sammlungen des Landesmuseums zu Hannover 44*; Isensee Verlag: Oldenburg, Germany, 1994.
33. Tejral, J. Die Zeit danach. Bemerkungen zum archäologischen Erscheinungsbild des norddanubischen Raumes nach den Markomannenkriegen. In *Non Solum ... sed Etiam. Festschrift für Thomas Fischer zum 65. Geburtstag*, 1st ed.; Henrich, P., Miks, C., Obmann, J., Wieland, M., Eds.; Hrsg., VML Vlg. Marie Leidorf: Rahden/Westf., Germany, 2015; pp. 431–448.
34. Bazovský, I.; Szábóová, D.; Arendt, D. Zaumzeug mit Zügelketten aus Borinka, Kreis Malacky (SW Slowakei). *Zborník SNM 114. Archeológia* **2020**, *30*, 251–270.
35. Droberjar, E. Nová varianta spony typu Almgren 132 z Jevička. K přechodným formám Almgrenovy, V. skupiny ve stupni B2/C1. In *Archeológia na Prahu Historie. K Životnému Jubileu Karola Pietu*; Březinová, G., Varsik, V., Eds.; AÚ SAV Nitra: Nitra, Slovakia, 2012; pp. 235–245.
36. Tejral, J. Some remarks on the transitional phase between Early Roman and Late Roman Periods in the region north of the Middle Danube. *Přehled Výzkumů* **2015**, *56*, 43–101.
37. Zeman, T. *Střední Pomoraví v Době Římské. Svědectví Povrchové Prospekce*; Archaeologica Olomucensia Tom, II. Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc, Czech Republic, 2017.