



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Využití chemických metod v bioarcheologii

APLIKACE LA-ICP-MS A XRF

MKB 2

ANNA PANKOWSKA

ESF II projekt Západočeské univerzity v Plzni
reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/18_056/0013239

Důvod využití chemických metod v bioarcheologii

Rekonstrukce stravy, potravní strategie (doba odstavení od kojení, sociální a na pohlaví vázané rozdíly, velké socioekonomické přechody)

Pohřební ritus (odlišení sekundárního a primárního pohřbu)

Diagenetické změny

Paleopatologie (toxicita, léčba, onemocnění)

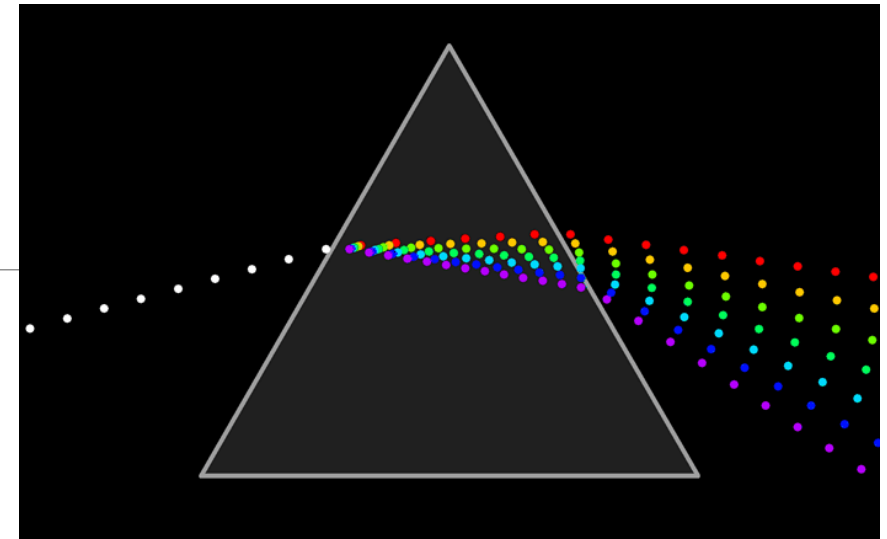
Diskriminace jedinců u smíšených kostí (alternativa ke kvantifikačním metodám MNI a MLNI)

Datovací techniky

DNA analýzy, imunologické testy apod.

Spektroskopie

1. Hmotnostní spektroskopie (m/z iontů)
2. Elektromagnetická spektroskopie
3. Spektroskopie využívající jaderné magnetické rezonance
4. Spektroskopie využívající elektronové paramagnetické rezonance

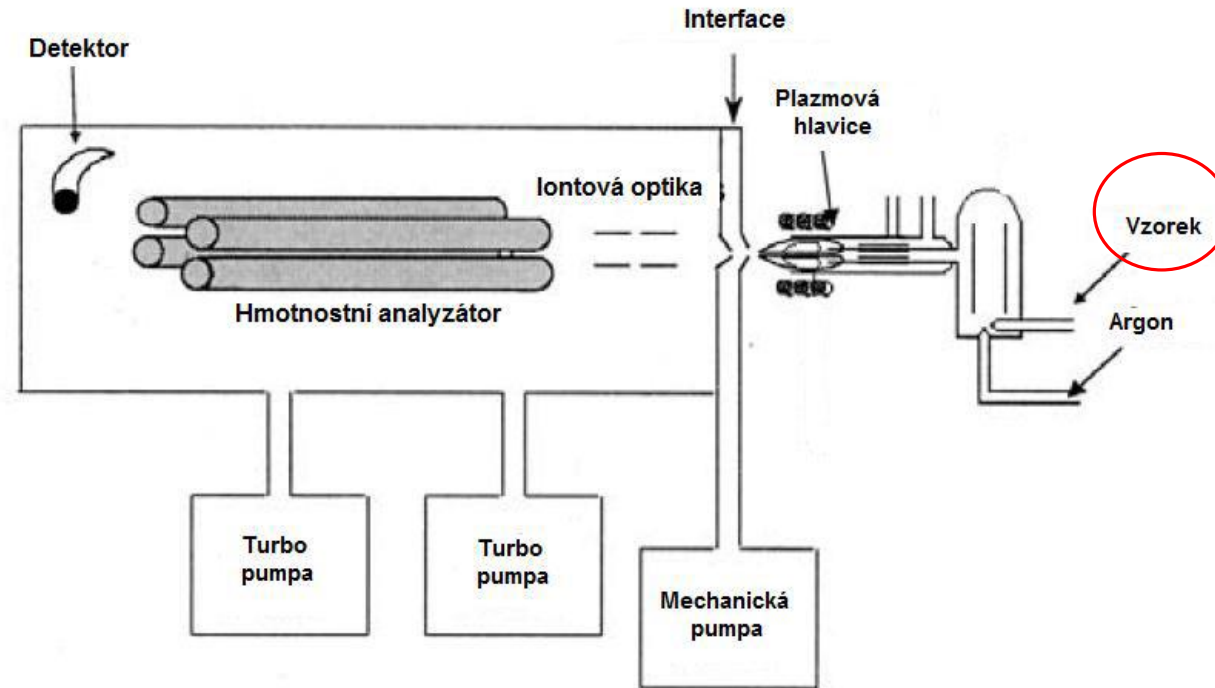


Metody využívané v bioarcheologii

1. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem **ICP-MS**
2. Spektrometrie laserem buzeného mikroplazmatu **LIBS**
3. Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů **SIMS**
4. Ramanova spektroskopie **RS**
5. Rentgeno Fluorescenční analýza **XRF**
6. Instrumentální neutronová aktivační analýza **INAA**
7. Rentgenová difrakční analýza **RDA**
8. Infračervená spektrometrie **FTIR**
9. Elektronová mikroanalýza **EPMA/SEM**
10. Protonová mikrosonda **PIXE**
11. Hmotový spektrometr s termální ionizací **TIMS**

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS

Spojení **analytické metody** využívající plazmatu jako iontového zdroje a **hmotnostního spektrometru** jako analyzátoru.



SYSTÉM ZAVÁDĚNÍ VZORKŮ DO PLAZMATU

A. Kapalný vzorek

Forma aerosolu

- + Absolutní obsah sledovaného prvku a izotopů
- Velká ztráta, destrukce vzorku
- Nelze sledovat prostorovou distribuci prvků

B. Pevný vzorek

Vypařování (také jako aerosol)

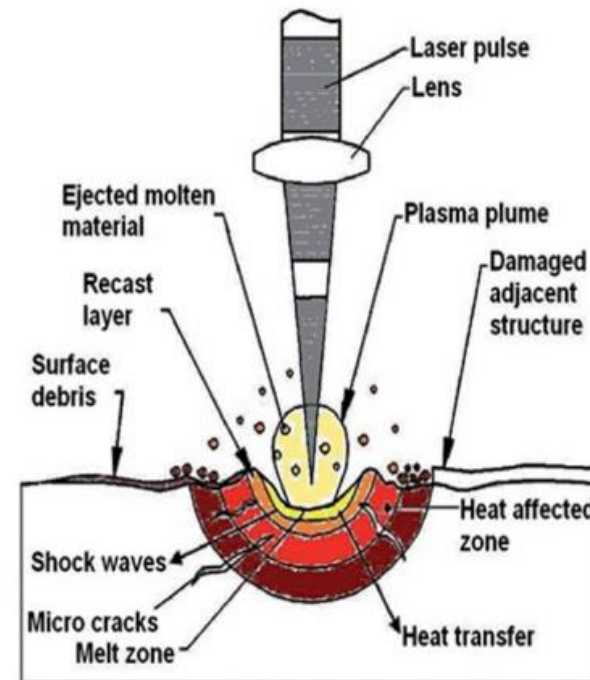
1. Elektrický výboj (ablace), nutná vodivost vzorku a (-) také nelze sledovat prostorovou distribuci prvků
2. **Laserová ablace (LA)**
 - + Lze studovat prostorovou distribuci prvků, hloubkové profily
 - Neznáme absolutní hodnotu prvků a izotopů, nutná kalibrace (referenční materiály)

Laserová ablace

- Laser spojený s indukčně vázaným plazmatem LA-ICP (LA ICP MS)
- Ablace materiálu, umístěného ve vzduchotěsné ablační cele vyplněné plynem (He nebo Ar)
- Laserem se vytváří plazmový oblak obsahujícího atomy, elektrony a ionty (dochází k tavení, vypařování, sublimaci, erozi, explozi a vymršťování makroskopických částic, fragmentů molekul, atomů, iontů a elektronů)
- Rychlé zahřátí vzorku vede k roztavení a odpaření jeho částíček a vytvoření malého kráteru na povrchu materiálu
- Měření se provádí na tabletách v inertní atmosféře

Laserová ablace

- explozivní interakce
zaostřeného laserového záření
s povrchem pevného
materiálu
- 2 mechanismy – termický
(odpařování) - $< 10^6 \text{ W/cm}^2$
 - netermický (ablace)
 $> 10^9 \text{ W/cm}^2$



<http://www.devicelink.com/mdt/archive/07/05/002.html>



Základní výhody

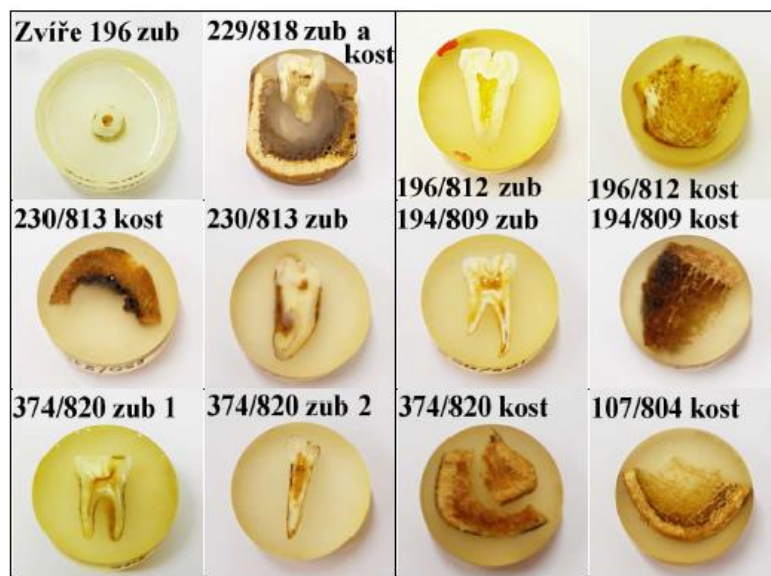
1. **Není nutnost převádět vzorek do roztoku, a proto nedochází k případné kontaminaci nebo ztrátě těkavých složek**
2. **Nejsou nutné přípravy vzorku (u zubů a kostí částečné)**
3. **Je dostačující menší množství vzorku (méně jak μg)**
4. **Laserový paprsek umožňuje prostorovou charakteristiku vzorku**

Úprava vzorků

Minimální (řez, zalití do pryskyřice)

Omezení velikostí cely (pevné, tavené s práškové vzorky)

Nastavení průměru laserového paprsku



Obr. 15. Fotky připravených vzorků zubů a kostí

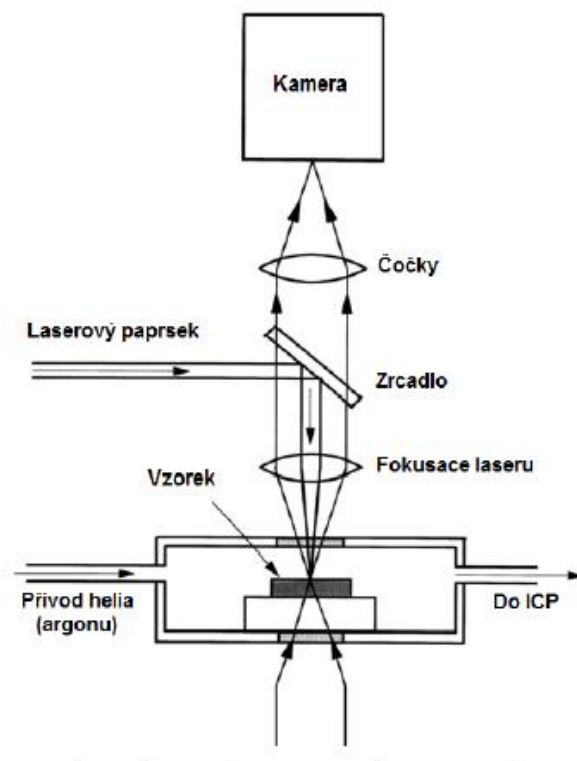


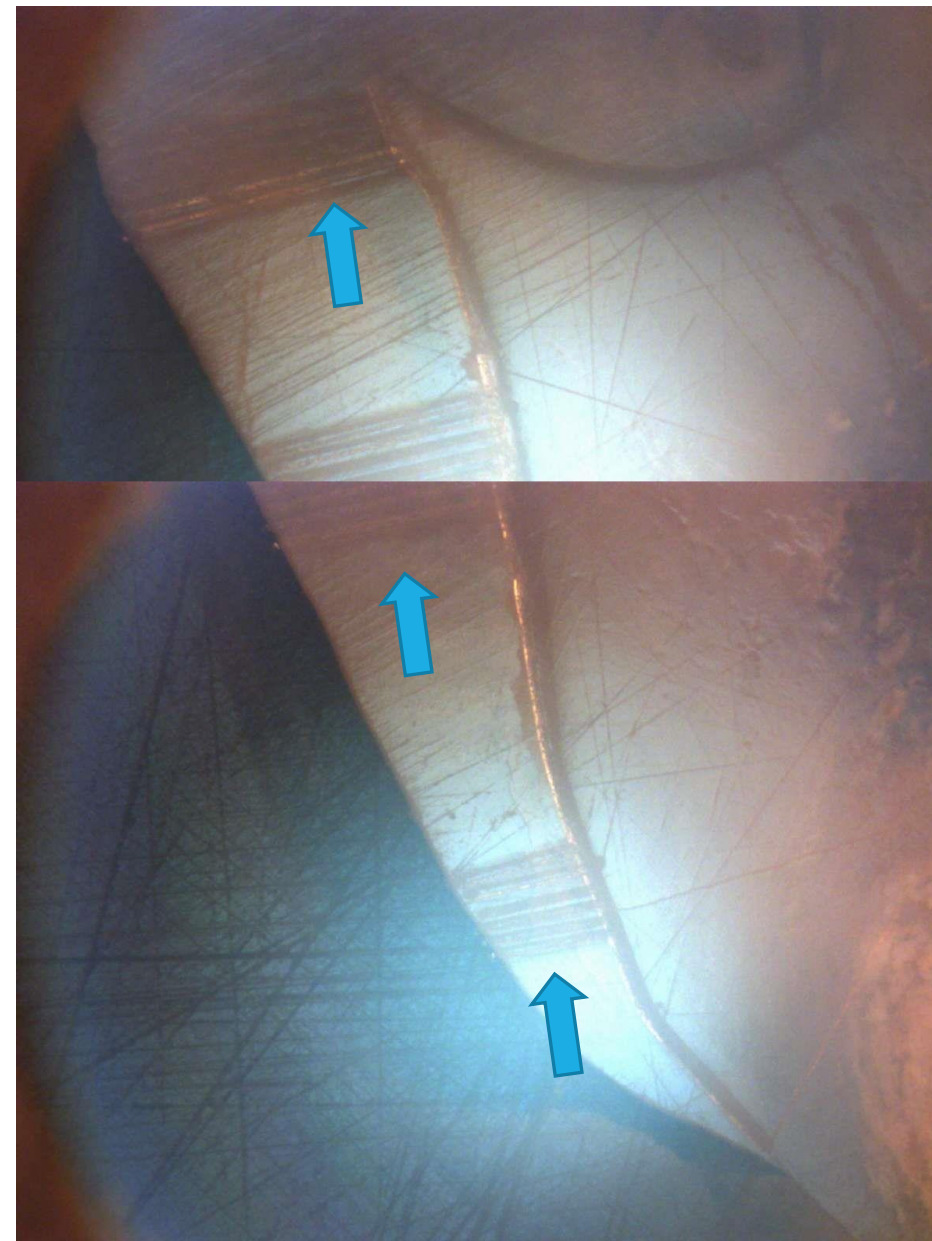
Mikrosonda

Sledování prvků v prostoru vzorku

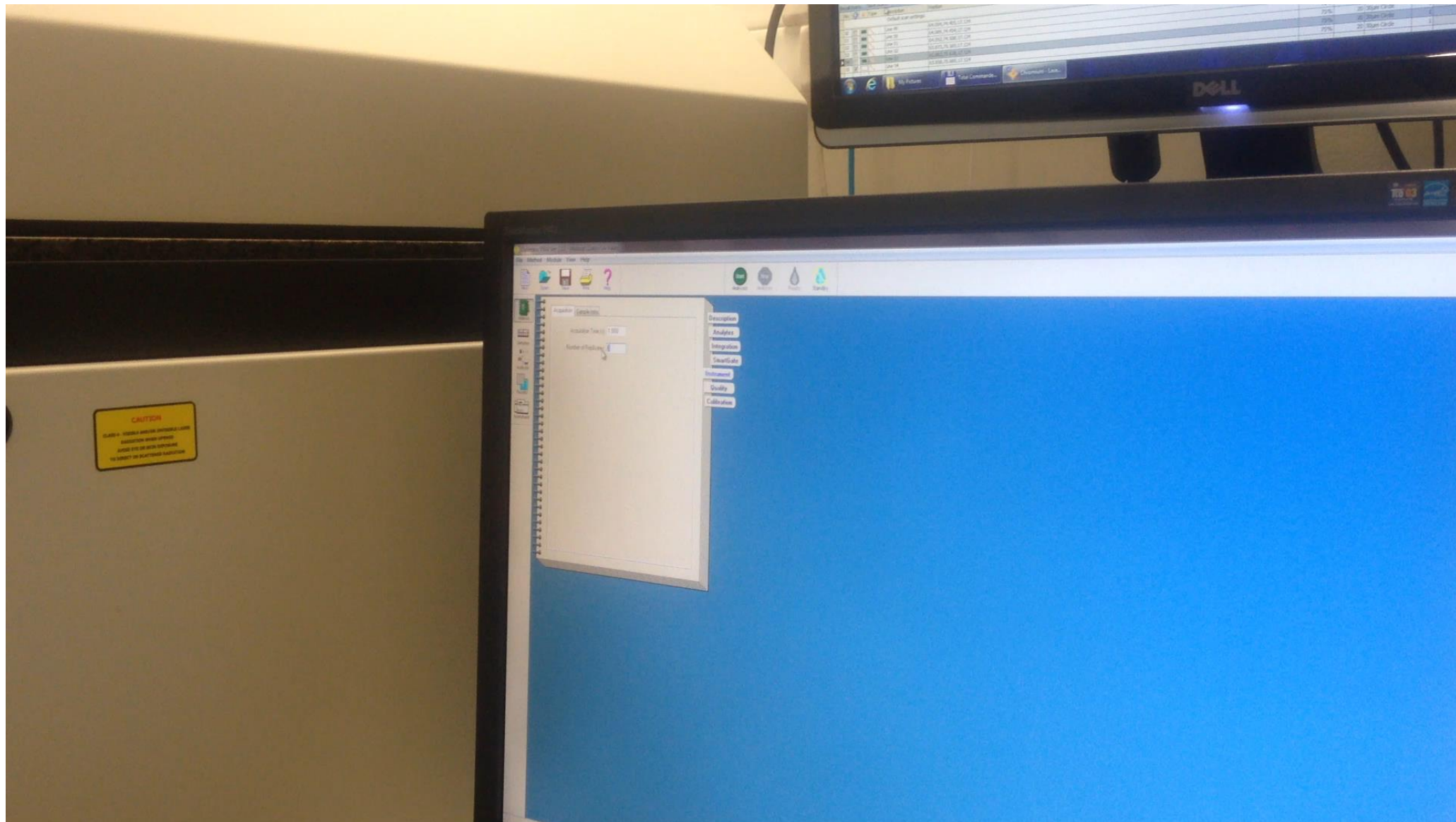
Záznam prostorové mapy

Sledování vytipovaných míst





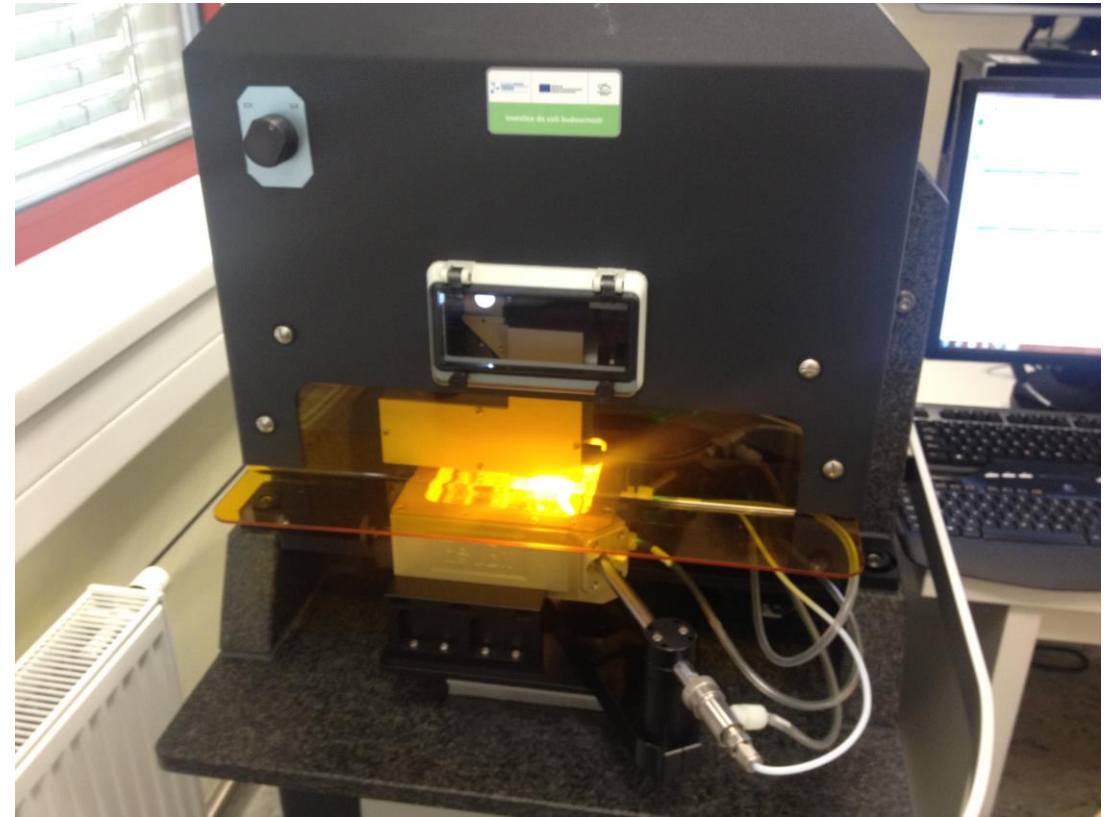
VIDEO



Transport materiálu z LA do plazmatu

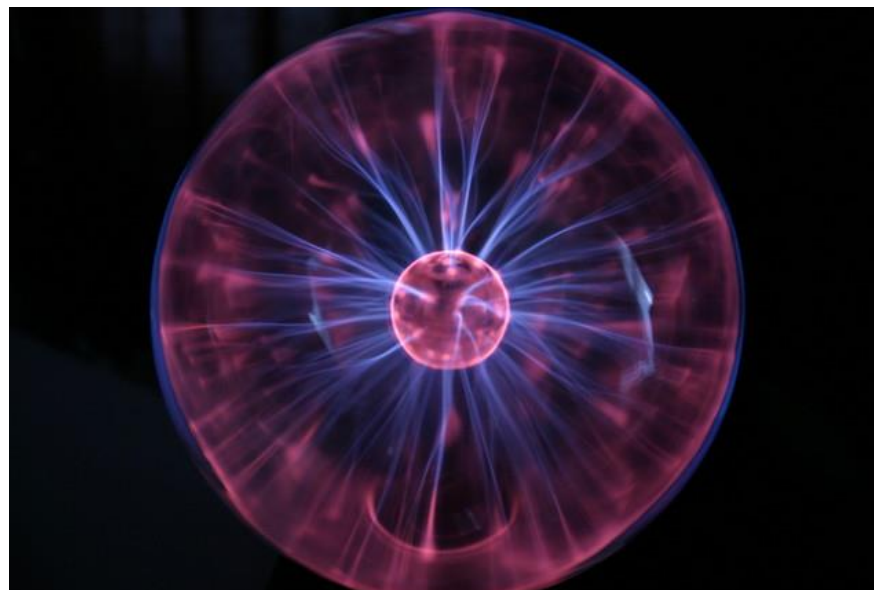
1. Nosný plyn
2. Rozměr a geometrie ablační cely
3. Velikost částic (frakcionace)
4. Vlastnosti prvku (lehký, těžký izotop)
5. Velikost laseru

Pečlivě nastavit experimentální podmínky a ty pak dodržovat pro veškerá měření.



Plazma = vytvoření iontů

- Plazma, využívané jako iontový zdroj v ICP, vzniká v části přístroje nazývané plazmová hlavice, je tvořeno neutrálními atomy inertního plynu (nejčastěji Ar), kladně nabitými ionty téhož plynu a elektrony
- Ionizace = vznik iontů



Hmotnostní analyzátor = separace iontů

Existuje více různých přístupů, jak ionty účinně separovat a tím pádem i množství rozličných analyzátorů

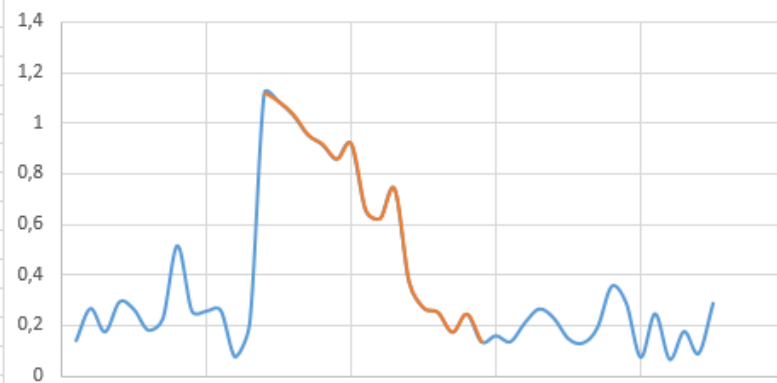
1. **Kvadrupólový analyzátor (Q)** je jedním ze starších typů hmotnostních analyzátorů. K dělení iontů využívá **nestabilitu trajektorií letu** iontů v oscilujícím elektrickém poli. Ionty vstupují do prostoru mezi tyčemi a na základě napětí ionty oscilují. Vhodně vkládaným napětím je umožněno vždy pouze iontům o určité hodnotě m/z projít celým analyzátozem až do detektoru.
2. **Průletový analyzátor (TOF)** je založen na **rychlosti** letu iontu. Letící ionty pronikají do zrcadla, dokud jejich kinetická energie neklesne na nulu a jsou poté „vystřeleny“ v opačném směru. Všechny ionty jsou změřeny v jednom nepatrném okamžiku = **všechny ionty dopadají na detektor.**

Sekce	Sr88	Sr87	Sr86	Ba137	Ba138	Ca43	Zn66	P6208	Fe57
A1	49246,95	11205,7	12340,21	2737,125	11790,61	23588,51	10522,99	515,7047	28071
A2	47754,57	10200,45	11665,6	2178,805	9217,369	21649,77	9301,227	619,6484	28659
prumer	48500,76	10703,08	12002,91	2457,965	10503,99	22619,14	9912,109	567,6766	28365
B1	98494,89	13256,62	17041,28	3594,22	19764,12	29825,52	13255,62	644,4433	31861
B2	96715,49	13914,06	16535,96	3430,781	18525,92	30193,83	13056,3	615,0681	35472
prumer	97605,19	13585,34	16788,62	3512,501	19145,02	30009,68	13155,96	629,7557	33666
C1	77483,87	11953,94	14166,63	1590,681	5602,384	27523,08	17533,49	529,5048	33248
C2	78404,38	10796,76	15266,14	2017,351	5886,053	28392,76	20658,35	489,8377	33176
prumer	77944,13	11375,35	14716,39	1804,016	5744,219	27957,92	19095,92	509,6713	33212

A5 Ba/Ca

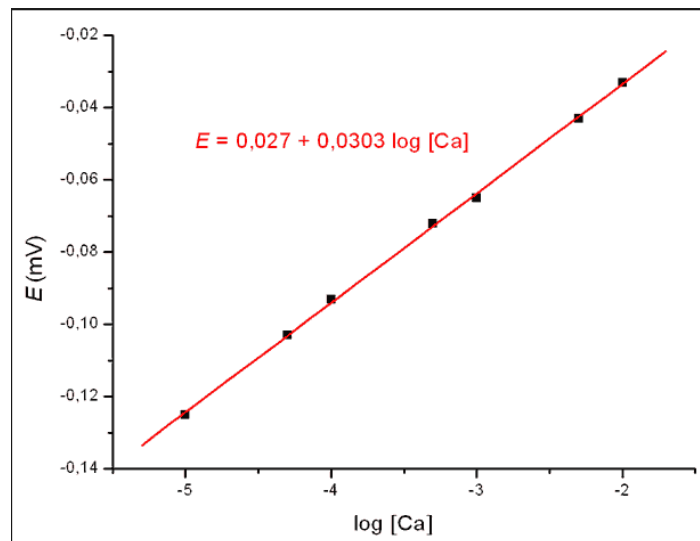
1 0,140376
2 0,267777
3 0,174757
4 0,293879
5 0,263755
6 0,181387
7 0,227974
8 0,516276
9 0,257979
10 0,257416
11 0,259858
12 7,60E-02
13 0,212409
14 1,121096
15 1,085007

A5



Kalibrace, způsob vzorkování zubu a kosti

1. Interní: Segregace určité části vzorku, která je následně rozložena a převedena do roztoku = získáme absolutní obsahy izotopů
2. Externí: Využití standardních referenčních materiálů NIST 1486 (bone meal), NIST SRM 610 a NIST SRM 612 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1486

Bone Meal

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating analytical methods used for the determination of selected major, minor, and trace elements in bone and in material of a similar matrix. It consists of osseous bone meal that was sieved and blended to a high degree of homogeneity.

The base material for this SRM was obtained from a commercial supplier. The entire material lot was sieved through a nominal 355 μm sieve (45 mesh), blended in the NIST cone blender, radiation certified and bottled into units of 50 g.

Certified and Non-certified Concentrations of Constituent Elements: The certified concentrations of the constituent elements are shown in Table 1. These concentrations are based on the results of a definitive analytical method or the agreement of results by at least two independent methods. Non-certified concentrations, for information only, are provided in Table 2.

NOTICE AND WARNINGS TO USERS:

Expiration of Certification: This certification is valid for five years from the date of shipment. Should any of the certified values significantly change before then, purchasers will be notified by NIST. Please return the attached registration form to facilitate notification.

Storage: The material should be kept tightly closed in its original bottle away from sunlight or ultraviolet radiation.

Use: The bottle should be mixed well by rotating the bottle before each use. Samples of this SRM should be dried under vacuum for 24 h or for 2 h at 105 $^{\circ}\text{C}$ in a conventional drying oven. A minimum sample of 150 mg of the dried material should be used to relate analytical determinations to the certified values in this certificate.

Dissolution Procedure: Samples may be dissolved by heating with hydrofluoric and nitric acids, followed by heating to dryness with perchloric acid, cooling, and adding dilute nitric acid.

Coordination of the analyses was performed by W.F. Koch of the NIST Inorganic Analytical Research Division.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.B. Schiller and L.M. Oakley of the NIST Statistical Engineering Division.

The technical and support aspects involved in the certification and issuance of this SRM were coordinated through the Standard Reference Materials Program by R. Alvarez and T.E. Gills.

Gaithersburg, MD 20899

William P. Reed, Chief

Material Source: The material for this SRM was obtained from the Espoma Company, Millville, NJ.

Homogeneity Assessment: Samples from randomly selected bottles of SRM 1486 were tested for homogeneity using x-ray fluorescence spectrometry. No evidence of material heterogeneity was observed in any of the elements measured which included strontium, zinc, copper, iron, phosphorus, calcium, and potassium.

Certified Concentrations and Uncertainties: The certified value is the weighted mean of method results from a definitive analytical method or the weighted mean of results from at least two independent analytical methods or laboratories. The uncertainty is the half-width of a 95% confidence interval for the mean, with an allowance for systematic differences between methods.

Table 1. Certified Concentrations of Constituent Elements

Element	Concentration, wt. percent	Element	Concentration — $\mu\text{g/g}$ —
Calcium	26.58 $\pm$ 0.24	Iron	99 $\pm$ 8
Magnesium	0.466 $\pm$ 0.017	Lead	1,335 $\pm$ 0.014
Phosphorus	12.30 $\pm$ 0.19	Potassium	412 $\pm$ 4
		Strontium	264 $\pm$ 7
		Zinc	147 $\pm$ 16

Non-certified Concentrations: Elements other than those certified are present in this material. Those that were determined but **not certified** are provided as additional information on the composition.

Table 2. Non-certified Concentrations of Constituent Elements

Element	Concentration, wt. percent	Element	Concentration — $\mu\text{g/g}$ —
Silicon	(<0.02)	Aluminum	(<1)
Sodium	(0.5)	Arsenic	(0.006)
Carbon (Total)	(18.6)	Cadmium	(0.003)
Moisture	(0.8)	Copper	(800)
2 h @ 105 $^{\circ}\text{C}$	(2.4)	Fluorine	(1)
Loss in Ignition @ 1000 $^{\circ}\text{C}$	(31.5)	Manganese	(0.13)
		Selenium	

Experiment

PANKOVSKÁ A.
VALAS O.
MILDE D.

Ba/Ca a Sr/Ca: odstavení od kojení

Stabilní izotopy k rekonstrukci kojení

1. **$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$** , živočich preferovaně vylučuje lehčí izotop, kumuluje se těžší (N narůstá). Úroveň ^{15}N ve vytvářejících se bílkovinách organismu odráží jeho úroveň v bílkovinách přijímaných v potravě, jelikož dusík je převážně asimilován z aminokyselin. **Matka je jako producent (vytváří mléko, které má srovnatelný obsah ^{15}N** , jako tkáň jejího těla, a tento je vyšší, než odpovídá stravě, kterou matka konzumuje) a dítě jako konzument (Valas, 2015).
2. **$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$** není vhodným ukazatelem. Vypovídá o rostlinné stravě, tedy spíše o možných příkrmech a době odstavení.
3. **$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$** , teoreticky dochází k navýšení poměru u potomka. Navýšení je ale menší než přirozené variace způsobené pitným režimem.

POMOCÍ LA-ICP-MS NELZE HODNOTIT LEHKÉ IZOTOPY
NEODLIŠUJEME APATIT ČI KOLAGEN

Ba a Sr

+ nemají žádnou metabolickou funkci a jejich úrovně v tkáních nejsou nijak regulovány, odrážejí tedy své obsahy v konzumované stravě

+ těžší izotopy

- obsah v tkáních je nižší než v přijímané potravě = „biopurifikace“, Sr, Ba (i Pb) se v organismu chovají jako vápník a v potravě jsou spolu s vápníkem přijímány, vápník v potravě je „kontaminovaný“ těmito prvky a tělo organismu preferovaně asimiluje vápník a „kontaminanty“ naopak vylučuje = dochází tedy k diskriminaci, kterou lze vysvětlit rozdílné hladiny těchto stopových prvků v potravě a v tělních tkáních

Poměry Ba/Ca, Sr/Ca jsou v mateřském mléce nižší než v těle kojící matky a nejnižší v těle novorozence

Barium, stroncium, vápník v mateřském mléce

Všechny prvky mají v mléce **vysokou** hodnotu, Ca způsobuje vyšší asimilaci Sr i Ba navíc

Jsou podporovány fosfopeptidy uvolněnými při trávení kaseinu = zvyšují stabilitu a rozpustnost dvojmocných kationtů v mléce a jsou tedy snáze asimilovatelné

Barium/vápník je spolehlivějším ukazatelem = koreluje významně se změnou stravy, je odolnější vůči diagenezi a teoreticky očekáváme jeho zvýšení (Austin et al. 2013)

Stroncium/vápník je méně spolehlivým ukazatelem = nekoreluje významně se změnou stravy, podléhá více diagenetickým změnám a teoreticky lze očekávat opačný trend (Austin et al. 2013)

V návaznosti na studii Austin et al. (2013)

Výzkum několika vzorků stálých i dočasných zubů z různých období, včetně recentního zubu

Otázka, zda lze sledovat:

- a) Klesající trend na řezu stálého zubu v průběhu času (od narození do konce mineralizace daného zubu = konec kojení)
- b) Stoupající trend na řezu dočasného zubu v průběhu času (od prenatálního období k začátku kojení)

1. Vybrat tkáň, která zanechá stopu dětství
2. Vybrat prvek, který má potenciál se nejvíce odlišovat v závislosti na změně stravy a předpokládat teoreticky jeho biodostupnost

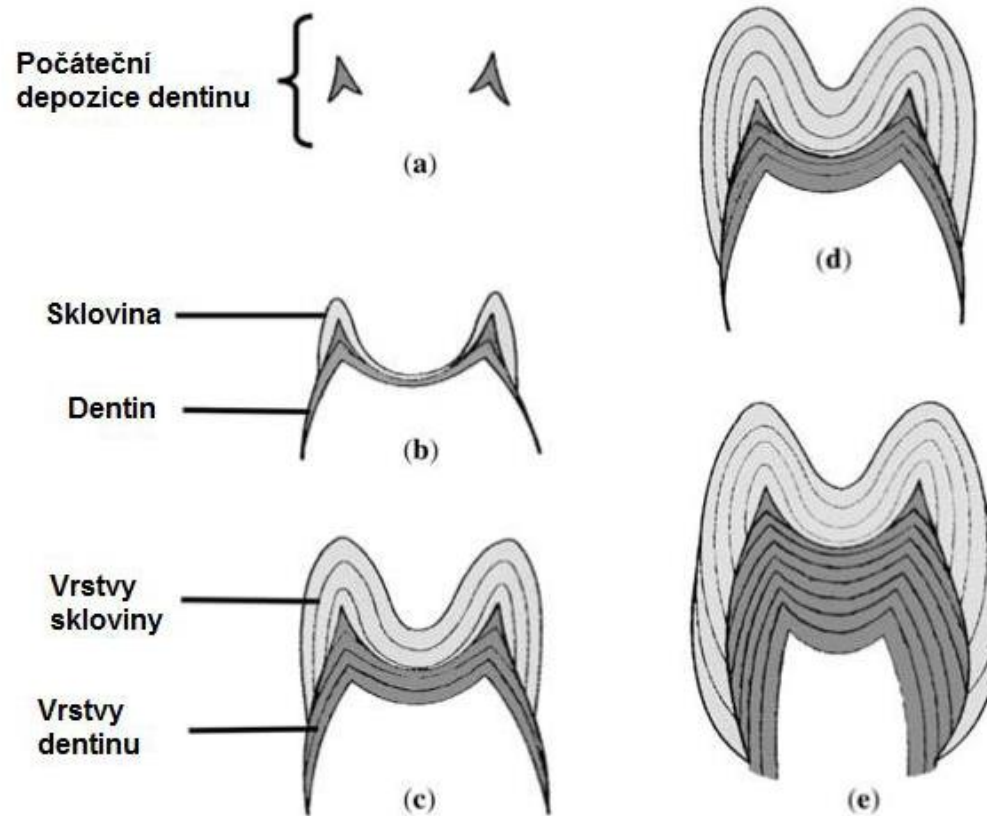
Jak ablatovat vzorek pro studium změn v čase?

Zub	Počátek vývoje skloviny (měsíce)	Konec vývoje skloviny (roky)
I ¹	3–4	4–5
I ²	10–12	4–5
I ₂	3–4	4–5
C	4–5	6–7
p ¹	18–24	5–6
p ²	24–30	6–7
M ¹	0	3,5
M ₁	0	3
M ²	30–36	7–8
M ³	7–9 let	
M ₃	8–10 let	

Tabulka 1 Doba počátku a konce vývoje skloviny stálých zubů (horní čelist). Pokud není uvedeno jinak, zuby dolní čelisti se vyvíjejí ve stejném období. Vytvořeno na základě literatury²⁶.

Zub	Počátek vývoje skloviny (měsíce před porodem)	Konec vývoje skloviny (měsíce po porodu)
i ¹	5	4
i ²	5	5
c	6	9
m ¹	5	6
m ²	6	10–12 (11)

Tabulka 2 Doba počátku a konce vývoje skloviny dočasných zubů (horní čelist). Zuby dolní čelisti se vyvíjejí ve stejném období, jako zuby čelisti horní, odchylky jsou minimální. Vytvořeno na základě literatury²⁷.



4 období:

- a) Prenatální
- b) Kojení
- c) Odstavování
- d) Odstavení

Popis experimentu:

Přístroje

1) Agilent 7700x (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), který pro separaci iontů využívá kvadrupólový **Q** hmotností analyzátor

2) OptiMass 9500 ICP-**TOF**-MS (GBC Scientific Equipment Pty Ltd, Melbourne, Austrálie) založený na průletovém hmotnostním analyzátoru (TOF)

Pro samotné vzorkování byl použit excimerový laserový ablační systém Analyte G2 (Teledyne CETAC, Omaha, NE, USA) využívající laser s vlnovou délkou 193 nm

Testování dvou přístupů 1) a 2)

Vzorky



Vzorek č. 1	
Lokalita	Slavonín 1
Kontext	H73
Typ zubu	M ¹ dx
Datování	eneolit (2800–2200 př. n. L.)
Datum terénního výzkumu	červen 2000
Vedoucí výzkumu	A. Tajer, M. Kalábek



Vzorek č. 2	
Lokalita	Slavonín 1
Kontext	H73
Typ zubu	m ¹ sin
Datování	eneolit (2800–2200 př. n. L.)
Datum terénního výzkumu	červen 2000
Vedoucí výzkumu	A. Tajer, M. Kalábek



Vzorek č. 3	
Lokalita	Nemilany 3
Kontext	H32
Typ zubu	M ¹ dx
Datování	eneolit (2800–2200 př. n. L.)
Datum terénního výzkumu	červen 2000
Vedoucí výzkumu	M. Kalábek



Vzorek č. 4	
Lokalita	Chrástáň
Kontext	63/803
Typ zubu	M ¹ sin
Datování	starší doba bronzová (2200–1500 př. n. L.)
Datum terénního výzkumu	2008–2009
Vedoucí výzkumu	M. Paulus



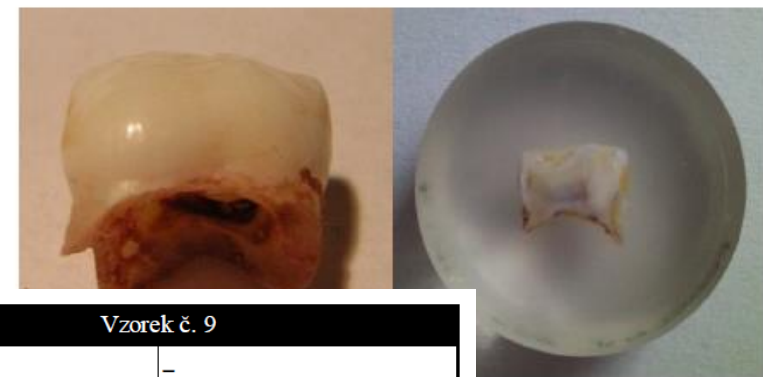
Vzorek č. 5	
Lokalita	Přemýšlení
Kontext	izolovaný zub
Typ zubu	m ₂ sin
Datování	starší doba bronzová (2200–1500 př. n. L.)
Datum terénního výzkumu	2006
Vedoucí výzkumu	I. Krutina



Vzorek č. 6	
Lokalita	U Zvonu
Kontext	izolovaný zub
Typ zubu	m ¹ sin
Datování	středověk
Datum terénního výzkumu	2010–2011
Vedoucí výzkumu	J. Orna



Vzorek č. 8	
Lokalita	Karlín
Kontext	izolovaný zub
Typ zubu	M ¹ dx
Datování	novověk
Datum terénního výzkumu	červenec–říjen 2013
Vedoucí výzkumu	P. Kalc



Vzorek č. 9	
Lokalita	–
Kontext	současný zub
Typ zubu	m ₁ dx
Datování	současnost
Datum terénního výzkumu	–
Vedoucí výzkumu	–

4 stálé první stoličky
4 dočasné první (druhá) stoličky

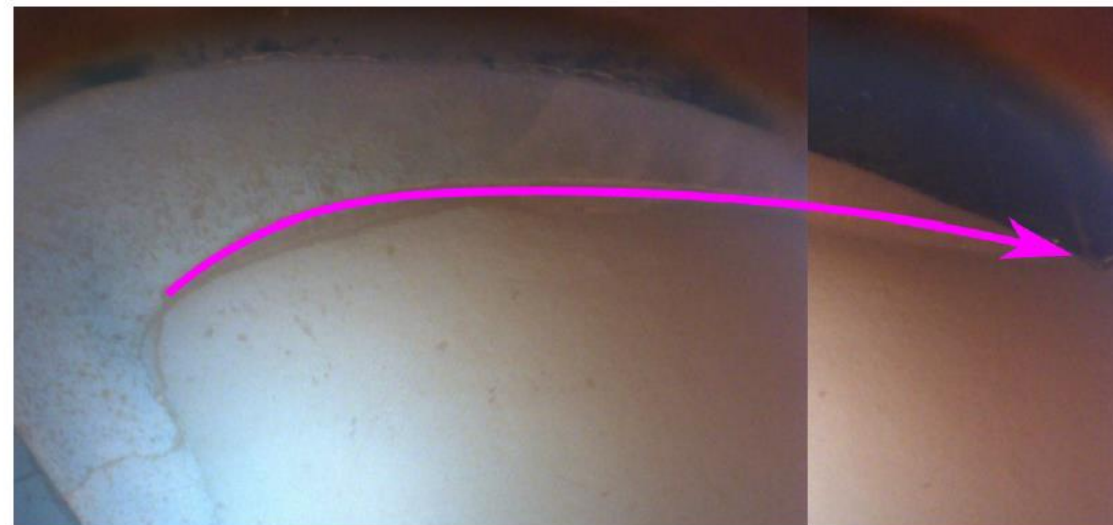
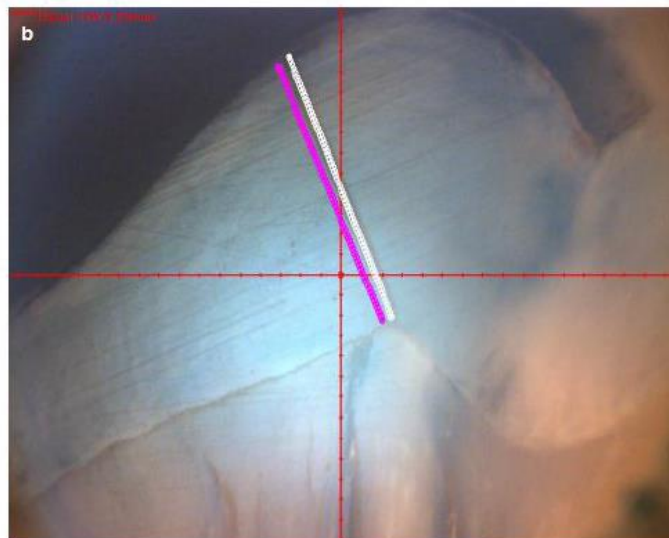
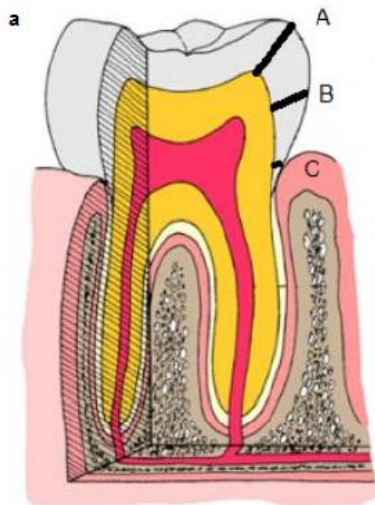
Měřené izotopy

Pomocí průletového (TOF) byly proměřeny izotopy: ^{86}Sr , ^{87}Sr , ^{88}Sr , ^{137}Ba , ^{138}Ba , ^{43}Ca , ^{208}Pb a ^{238}U .

Pomocí kvadrupólového (Q), ICP-MS: ^{88}Sr , ^{138}Ba , ^{43}Ca a ^{208}Pb

Volba ablačního místa

Dva typy experimentů:

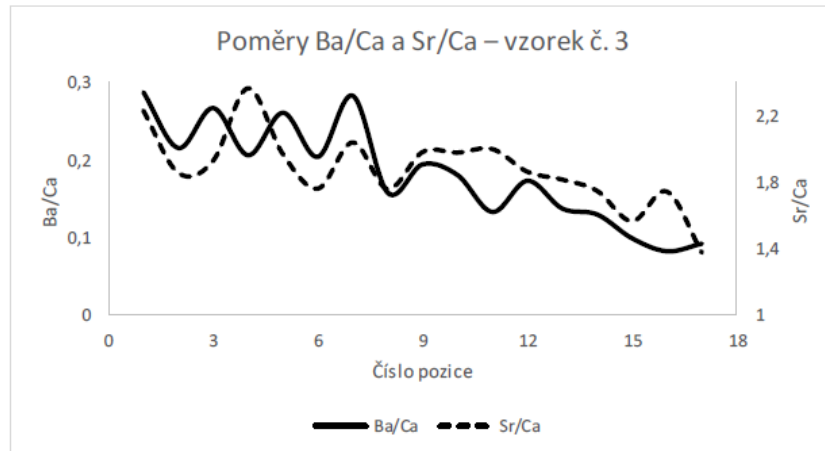


Výsledky experimentu

Potvrzení (Austin et al. 2013)

1. Ba/Ca výraznější než Sr/Ca
2. Vyšší hodnoty a jasnější trend vykazovala metoda ICP-Q-MS
3. Průměrné hodnoty ze tří sekcí vykazovaly jen mírný trend změny x linie vedené podél DEJ
4. Vápník je skutečným standardem, který je organizmem regulován = všechny hodnoty byly stejné
5. U některých zubů byly vysoké hodnoty olova

Ba/Ca výraznější než Sr/Ca

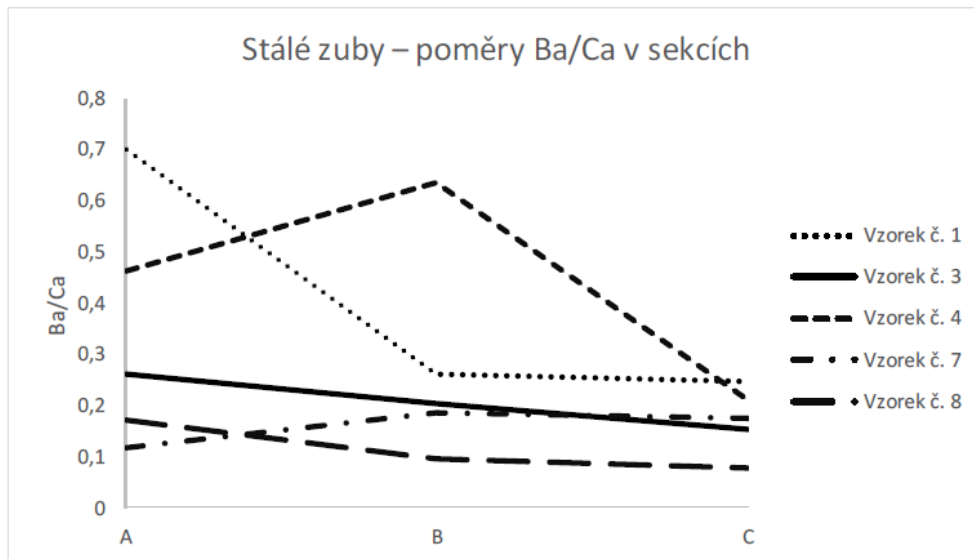
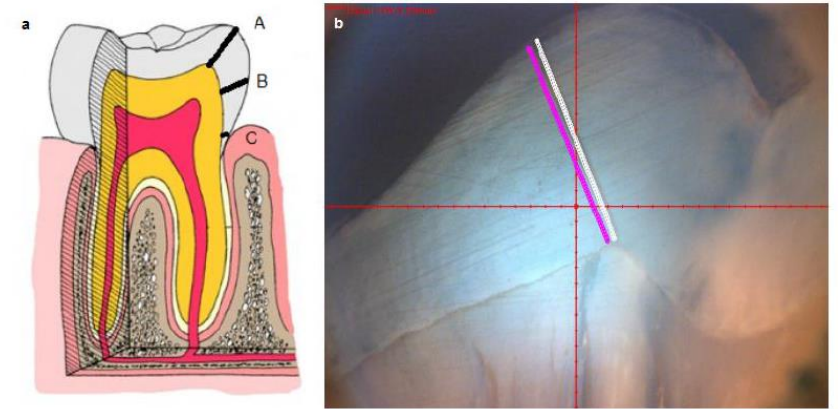


Graf 17 Srovnání tvaru profilů poměrů $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ a $^{88}\text{Sr}/^{43}\text{Ca}$ získaných analýzou linie vedené v sekci „A“ vzorku č. 3. Jsou patrné větší procentuální změny poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$.

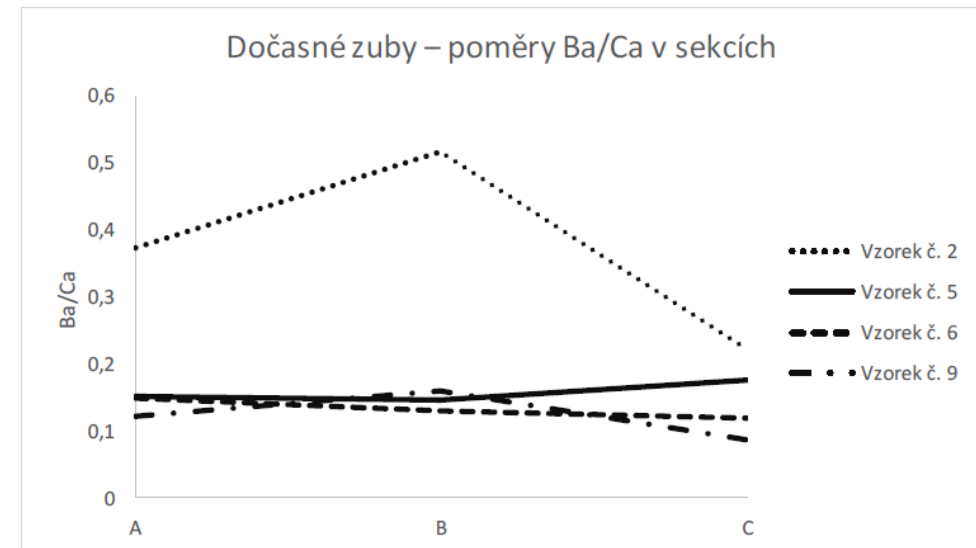
ICP-Q-MS vyšší hodnoty než ICP-TOF-MS

- větší počet bodů, detailnější
- lépe odhalí lokální odchylky
- signál 43-Ca výrazně vyšší
- detekce vysokých hodnot olova
- lepší software
- menší citlivost na změny teploty v laboratoři

Výsledky ze sekcí (A,B,C)



Graf 13 Vývoj poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ v jednotlivých sekcích stálých zubů



Graf 14 Vývoj poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ v jednotlivých sekcích dočasných zubů

Výsledky ze sekcí (A,B,C):

a) vyšší hodnoty Pb,

b) interní standard Ca

Stálé zuby		⁸⁶ Sr	⁸⁷ Sr	⁸⁸ Sr	¹³⁷ Ba	¹³⁸ Ba	⁴³ Ca	²⁰⁸ Pb	²³⁸ U	⁸⁸ Sr/ ⁴³ Ca	¹³⁸ Ba/ ⁴³ Ca
Vzorek č. 1	A průměr	19 052	15 150	103 690	5 476	27 212	38 963	1 270	949	2,68	0,70
	B průměr	14 462	11 201	65 918	2 413	9 514	36 950	1 019	539	1,79	0,26
	C průměr	12 950	10 069	56 226	2 091	7 643	30 799	849	654	1,83	0,25
	celkový průměr	15 488	12 140	75 278	3 327	14 790	35 571	1 046	714	2,10	0,40
Vzorek č. 3	A průměr	12 634	8 421	53 983	1 487	6 165	23 793	501	232	2,28	0,26
	B průměr	10 888	7 762	47 056	1 515	5 269	25 910	488	260	1,82	0,20
	C průměr	10 854	7 375	45 354	1 320	3 763	24 561	530	254	1,85	0,15
	celkový průměr	11 459	7 853	48 797	1 441	5 066	24 755	506	248	1,98	0,21
Vzorek č. 4	A průměr	12 003	10 703	48 501	2 458	10 504	22 619	568	397	2,15	0,46
	B průměr	16 789	13 585	97 605	3 513	19 145	30 010	630	367	3,26	0,64
	C průměr	14 716	11 375	77 944	1 804	5 744	27 958	510	237	2,81	0,21
	celkový průměr	14 503	11 888	74 683	2 591	11 798	26 862	569	333	2,74	0,44
Vzorek č. 7	A průměr	13 191	9 586	64 010	1 337	3 426	29 395	15 032	479	2,18	0,12
	B průměr	26 325	17 521	135 082	2 350	6 656	35 962	17 914	760	3,78	0,19
	C průměr	17 404	13 162	89 611	2 009	5 492	31 791	4 320	871	2,84	0,17
	celkový průměr	18 973	13 423	96 234	1 899	5 191	32 383	12 422	704	2,93	0,16
Vzorek č. 8	A průměr	20 994	9 831	73 257	1 776	6 077	35 316	2 113	541	2,08	0,17
	B průměr	13 013	8 278	46 922	1 487	3 256	34 459	2 037	610	1,37	0,10
	C průměr	11 221	7 610	46 052	1 299	2 423	31 853	2 647	568	1,45	0,08
	celkový průměr	15 076	8 573	55 410	1 521	3 919	33 876	2 266	573	1,63	0,11

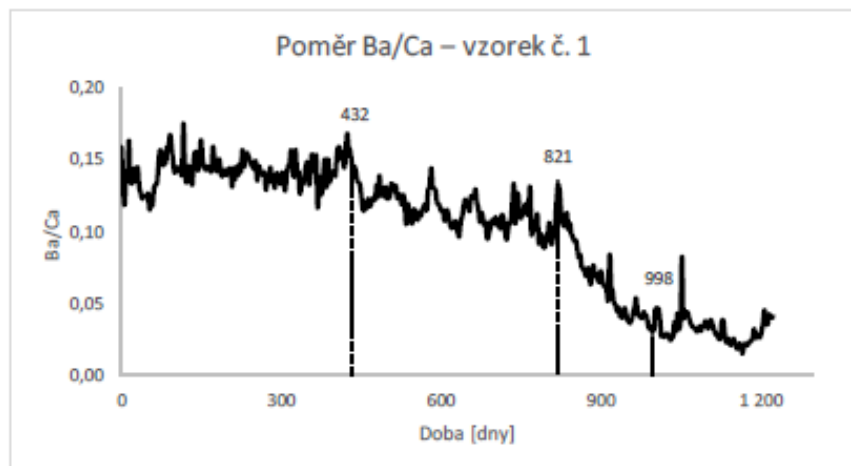
Dočasné zuby		⁸⁶ Sr	⁸⁷ Sr	⁸⁸ Sr	¹³⁷ Ba	¹³⁸ Ba	⁴³ Ca	²⁰⁸ Pb	²³⁸ U	⁸⁸ Sr/ ⁴³ Ca	¹³⁸ Ba/ ⁴³ Ca
Vzorek č. 2	A průměr	13 667	10 317	64 377	2 754	11 796	31 417	704	631	2,05	0,38
	B průměr	12 464	9 117	61 849	3 397	15 699	30 397	912	522	2,04	0,52
	C průměr	11 198	7 512	46 232	2 033	6 557	29 326	1 435	528	1,58	0,22
	celkový průměr	12 443	8 982	57 486	2 728	11 351	30 380	1 017	560	1,89	0,37
Vzorek č. 5	A průměr	10 953	8 057	38 359	1 314	3 670	24 275	639	269	1,53	0,15
	B průměr	9 670	7 606	34 955	1 467	3 936	26 847	584	232	1,31	0,15
	C průměr	8 654	6 341	29 000	1 348	4 676	26 216	790	271	1,10	0,18
	celkový průměr	9 759	7 335	34 105	1 376	4 094	25 779	671	257	1,32	0,16
Vzorek č. 6	A průměr	11 294	8 717	45 164	1 854	4 683	31 124	2 667	895	1,45	0,15
	B průměr	10 690	7 629	40 378	1 503	3 829	29 555	2 141	632	1,37	0,13
	C průměr	10 211	7 262	38 427	1 371	3 358	28 328	1 274	619	1,36	0,12
	celkový průměr	10 732	7 870	41 323	1 576	3 957	29 669	2 027	715	1,39	0,13
Vzorek č. 9	A průměr	13 271	10 059	66 142	1 483	3 714	30 201	1 635	583	2,20	0,12
	B průměr	13 580	8 947	65 412	1 592	4 932	31 334	715	577	2,11	0,16
	C průměr	12 385	8 685	55 468	1 192	2 774	32 148	625	566	1,73	0,09
	celkový průměr	13 079	9 230	62 341	1 422	3 807	31 228	992	575	2,01	0,12

ICP-Q-MS a linie vedená podél DEJ

Jelikož je celá linie vedená v nejhlubší části skloviny, výsledky by neměly být ovlivněny rozdílnou mineralizací zubu a s ní spojeným rozdílným obsahem prvků v různě „hlubokých“ částech skloviny.

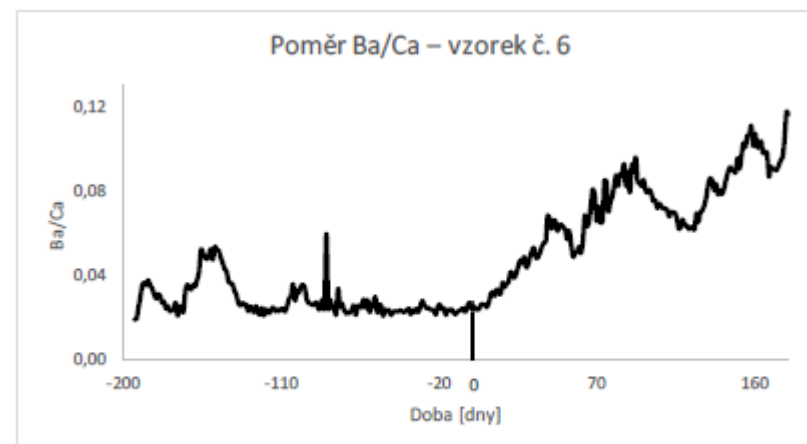


STÁLÁ STOLIČKA, SLAVONÍN (ENEOLIT)



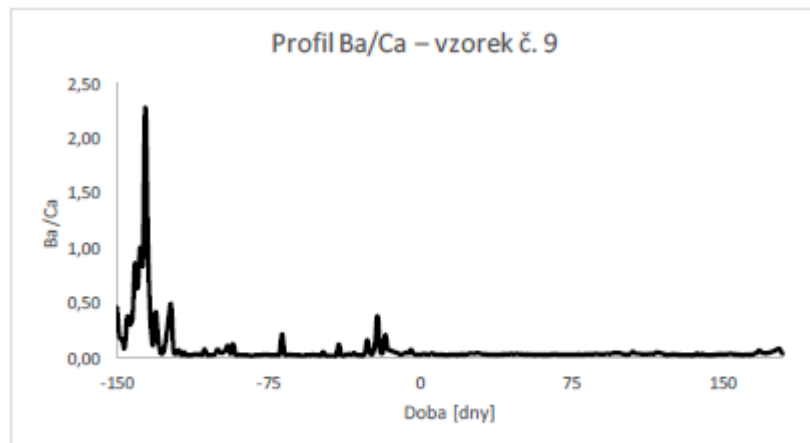
Graf 21 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 1); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

DOČASNÁ STOLIČKA, U ZVONU (STŘEDOVĚK)



Graf 26 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 6); vertikální přerušovaná čára odděluje předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

SOUČASNÁ DOČASNÁ STOLIČKA

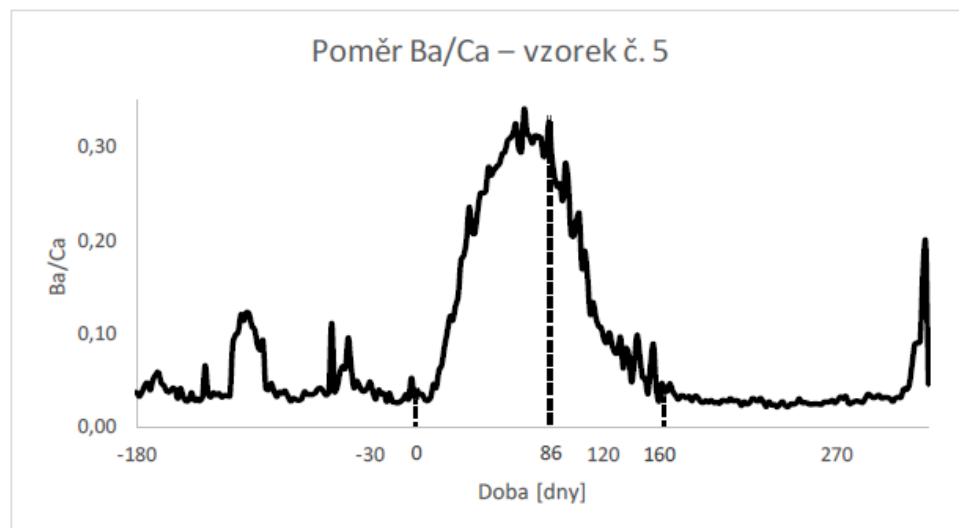


Graf 29 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 9)

PRASKLINA (?)



DRUHÁ DOČASNÁ STOLIČKA, PŘEMÝŠLENÍ (STARŠÍ DOBA BRONZOVÁ)



Graf 25 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 5); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

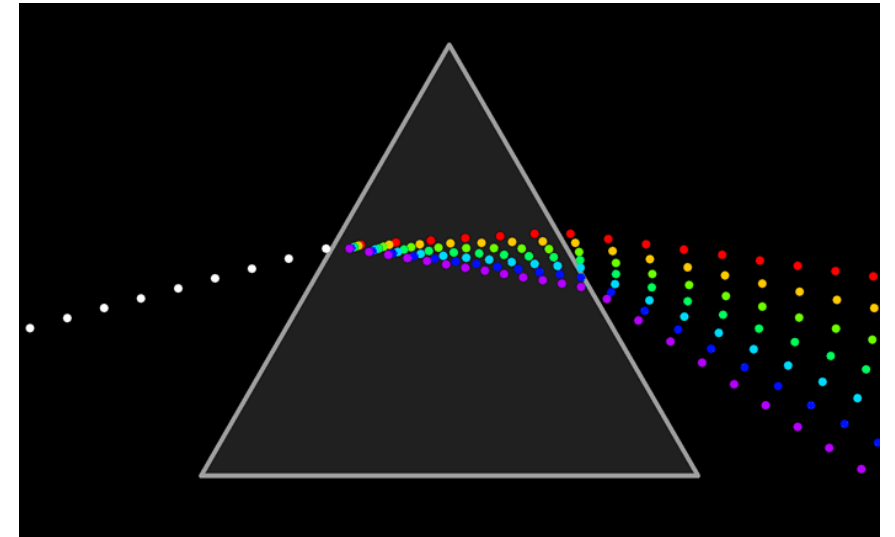


Rentgeno Fluorescenční analýza XRF

X-Ray Fluorescence Spectrometry

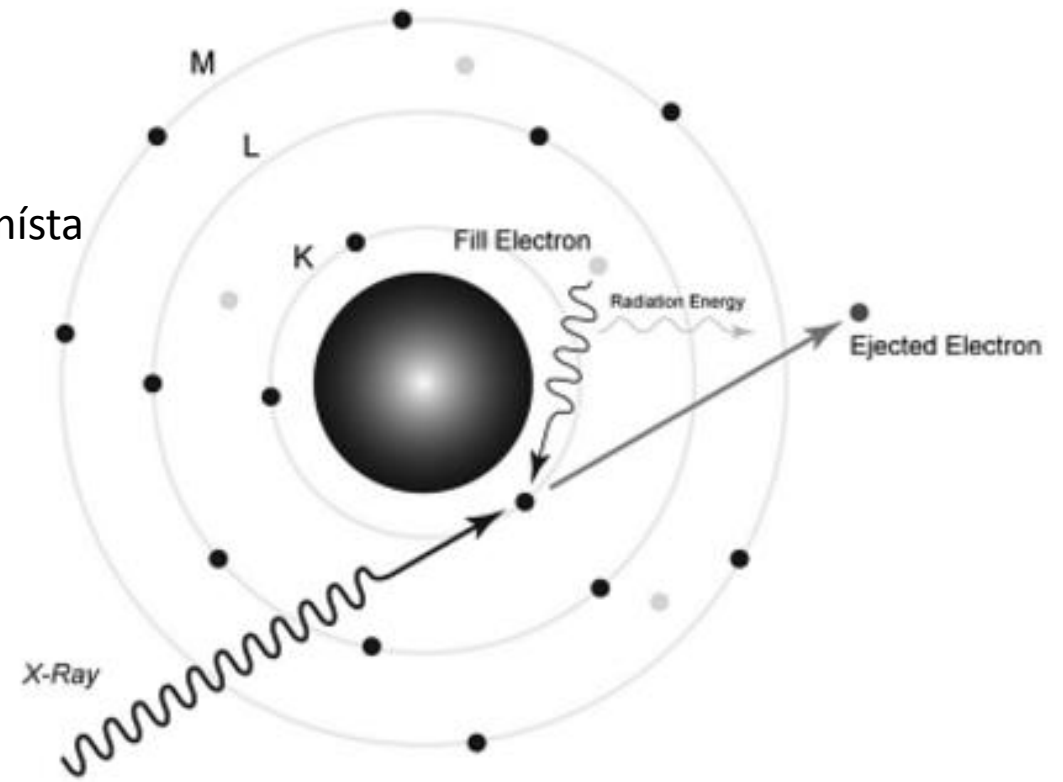
Spektroskopie

1. Elektromagnetická spektroskopie
2. Hmotnostní spektroskopie



Princip XRF

1. Paprsek X je absorbován atomem = ionizace
2. Excitace elektronu z vnitřní vrstvy obalu, vytvoření prázdného místa
3. Deexcitace elektronů z vnější vrstvy = energie ve formě fotonu
4. Kaskádovitá deexcitace = spektrum fotonů = **druh atomu**



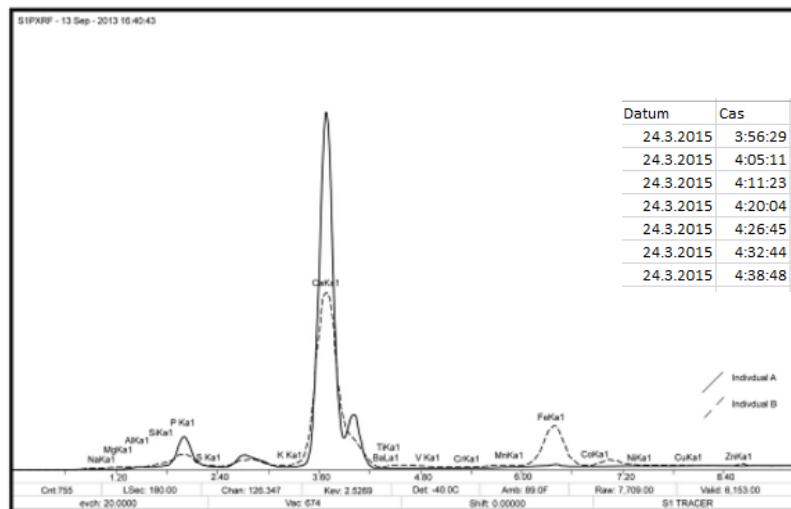
Perone et al. 2014

XRF

Podle uvolněné energie fotony identifikujeme atom, prvek

Intenzitou paprsků X získáme informaci o množství prvku v předmětu

Opět vhodnější pro těžší prvky



Datum	Cas	Vysledek	Mod	Jmeno sac	LOD Si	Nazev P	Pol	Naz	Pole 2	Uplynuly c	Uplynuly c	Cas celker	Live cas 1	Live cas 2	Live cas ct P	P +/-	Mg	Mg +/-	Al	Al +/-	Si	Si +/-	S	
24.3.2015	3:56:29	#1	STD kontrola		3					14,26		14,26	12,28		12,28									
24.3.2015	4:05:11	#2	Geochem	Factory-Di	3			CH3-65		139,16	140,06	279,21	120,16	120,29	240,45	7,8396	0,0214	<LOD	0,74	5,46	0,05	10,387	0,0311	<LOD
24.3.2015	4:11:23	#3	Geochem	Factory-Di	3			CH3-65		153,12	133,06	286,18	120,24	120,22	240,47	0,6293	0,0066	<LOD	1,51	4,1141	0,0489	11,968	0,0336	<LOD
24.3.2015	4:20:04	#4	Geochem	Factory-Di	3			CH3-65		139,39	137,51	276,9	120,19	120,07	240,27	6,3497	0,0199	<LOD	0,87	5,38	0,05	10,9608	0,0331	<LOD
24.3.2015	4:26:45	#5	Geochem	Factory-Di	3			CH3-65		140,93	136,55	277,48	120,36	120,22	240,58	5,8335	0,0193	<LOD	0,89	4,25	0,05	15,3384	0,0385	<LOD
24.3.2015	4:32:44	#6	Geochem	Factory-Di	3			CH3-65		151,56	130,87	282,43	120,36	120,41	240,77	0,0478	0,0036	<LOD	1,84	6,47	0,06	13,8414	0,0382	<LOD
24.3.2015	4:38:48	#7	Geochem	Factory-Di	3			CH3-65		149	130,96	279,96	120,23	120,15	240,38	0,6061	0,0069	<LOD	1,61	6,66	0,06	12,3433	0,0372	<LOD

ppm = *parts per milion*

pXRF (portable)



Perone et al. 2014



Využití v kosterní antropologii

U tafonomicky velmi alterovaných fragmentů (drobné zlomky, žeh) FORENZNÍ ANTROPOLOGIE

1. Identifikace kosti (odlišení od ostatních materiálů)
2. Odlišení druhové příslušnosti
3. Diskriminace jedinců (smíšené kosti)
4. Spálené kosti

1. Identifikace kosti (odlišení od ostatních materiálů)

- U velmi fragmentárních zlomků
- Obvykle: mikroskopie, Ca/P, SEM/EDS (Ubelaker et al., 2002), DNA, HHXRF X-ray spektrometrie (Zimmerman et al., 2014)
- Christensen et al. (2012) **XRF**: test stejných vzorků jako Ubelaker et al., velmi dobrá diskriminace i ručním XRF. Odlišili paroží, měkkýše, zobáky, korály a nebiologické materiály (sklo, keramiku, dřevo a jiné minerály apod.)

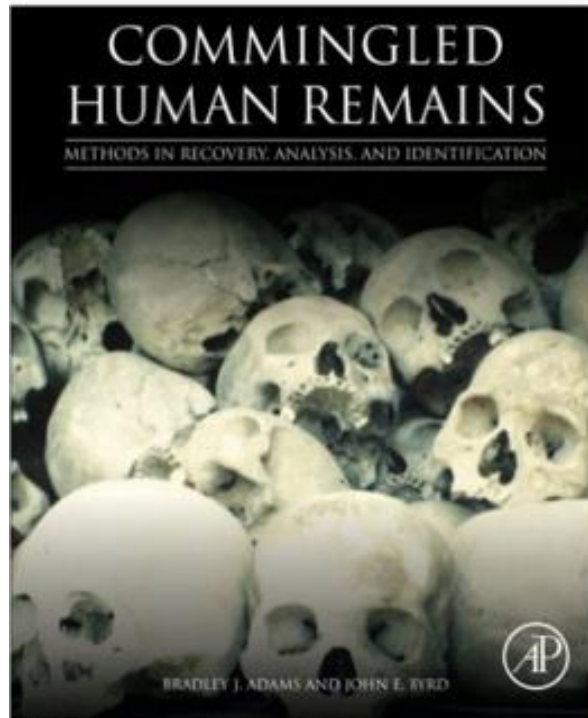
2. Odlišení druhové příslušnosti

- U dětských fragmentárních zlomků (ovšem i u dospělých)
- Problematictější (podobné složení)
- Ca/P neodlišuje zvířecí a lidské kosti, velký překryv (stejné prostředí, stejná strava, stejné depoziční podmínky)
- Využívá se: **Ramanova spektroskopie** (McLaughlin and Lednev, 2012), FT, LIBS (Vass et al 2005)
- **Není publikovaný výzkum s XRF**

3. Diskriminace jedinců (smíšené kosti)

- U celých koster, kostí i fragmentů
- Velmi obtížné, očekává se velký překryv
- LA ICP MS (Castro et al., 2010): 12 jedinců, nejlépe diskriminuje jen Hu a Fe (63,1-75,2%) = nelze jí použít ve forenzní praxi

XRF: Využití pro diskriminaci jedinců



Perone et al. 2014

[Forensic Sci Int.](#) 2013 Sep 10;231(1-3):407.e1-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.04.035. Epub 2013 May 28.

A study on the discrimination of human skeletons using X-ray fluorescence and chemometric tools in chemical anthropology.

[Gonzalez-Rodriguez J¹](#), [Fowler G](#).

⊕ **Author information**

Abstract

Forensic anthropological investigations are often restricted in their outcomes by the resources allocated to them, especially in terms of positively identifying the victims exhumed from commingled mass graves. Commingled mass graves can be defined as those graves that contain a number of disarticulated human remains from different individuals that have been mixed by either natural processes or human interventions. The research developed aimed to apply the technique of non-destructive XRF analysis to test whether there is substantial differentiation within the trace elemental composition and their ratios of individuals to separate them using chemometric analysis. The results of the different atomic spectroscopic analyses combined with the use of multivariate analysis on a set of 5 skeletons produced a series of plots using Principal Component Analysis that helped to separate them with a high percentage of accuracy when two, three or four skeletons needed to be separated. Also, two new elemental ratios, Zn/Fe related to metabolic activities and K/Fe related to blood flow into the bone, have been defined for their use in forensic anthropology for the first time to aid in the separation.

Copyright © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Gonzalez-Rodriguez and Fowler 2013;

Perone et al. 2014 *In* Adams and Byrd 2014

Gonzalez-Rodriguez and Fowler (2013)

- Pět jedinců ze středověkého pohřebiště
- Z každého jedince změřili obsah prvků z 26 kostí
- Každou kost měřili 3x
- Ca, Fe, K, Pb, Sr a Zn
- Diskriminační analýza
- 96 – 100 % diskriminace u **tří jedinců**

V dalším kroku:

- Pb/Ca, Zn/Fe, Sr/Pb, Sr/Ca a K/Fe
- PCA = jaké prvky přispívají k největší variabilitě, k odlišení
- 83 – 96 % diskriminace u **čtyř jedinců**
- „jen“ **53 – 96 %** u všech pěti jedinců

Gonzalez-Rodriguez and Fowler (2013)

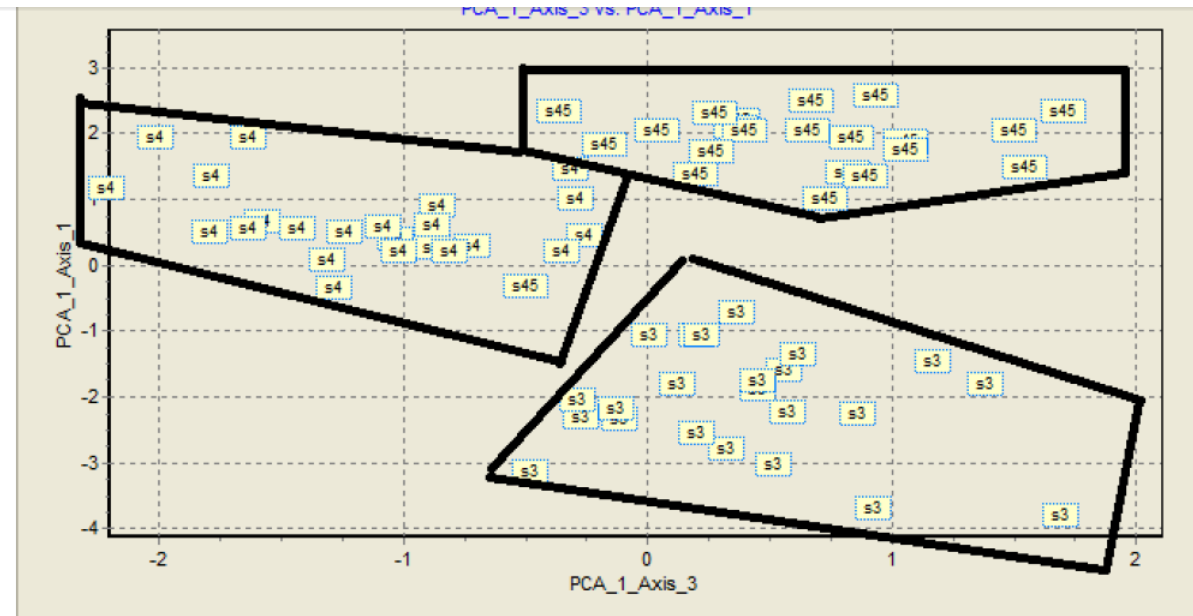


Figure 2. Principal Component Analysis of three skeletons from the sample set using elemental ratios: Sr/Ca, Pb/Ca, Sr/Pb, Zn/Fe and K/Fe.

4. Spálené kosti

▪Není publikovaný výzkum s XRF

Rozlišení kostí od ostatních materiálů, od zvířecích kostí a diskriminace jedinců

PIXE, ICP-OES (Brooks et al., 2006) = rozlišení kostí od jiného materiálu, nerozlišili mezi druhy, identifikovali projektil ze zbraně

ICP MS (Schultz et al. 2008), našli v kremaci darovaného těla vzácný kontaminant Gd (= gadolinium). Kontaminant se mohl do těla dostat CT či MRI vyšetřením během života = bylo potvrzeno lékařským záznamem.

POZITIVNÍ IDENTIFIKACE



Dále už číst/studovat
nemusíte!

Do cremains leave a chemical trace in grave infills? Empty urns as evidence of symbolic funeral rite.



1. intentional and symbolic action of past ritual practices
2. accidental post-depositional processes
3. *indicate handling by excavators*

Pankowská A.
Moník M.
Spěváčková P.
Kašparová H.
Šneberger J.

Inhumation: Phosphate analysis

When an empty grave is found and inhumation is suspected, phosphate analysis is conducted in order to determine whether the body had decomposed or had never been interred (e.g. Ernée and Majer 2009).

In addition to phosphorus there are used traces of **iron**, **aluminium** and **manganese**, which are accumulated through microbial activity in the surrounding soil. Furthermore, calcium amount was usually higher in the soil under the decomposed body (Lambert 1997).

Cremation Burials

In cremains, we usually do not expect chemical dissolution into the soil, firstly due to the absence of soft tissues and secondly because of the higher resistance to diagenetic processes (Herrmann et al. 1990).

However, this assumption could be valid only in the case of completely calcined bones. Completely and incompletely cremated bones are recognizable by color, consistency, microstructure and indirectly by Ca/P ratio, which is around 2.15 in fresh bones. Bone mineral hydroxyapatite transforms into different phases through the burning and the Ca/P ratio decreases to 1.11-1.46 in whitlockite (Skinner 2005).

Aim

The aim of this study is to investigate the origin of empty urns using chemical traces of soil samples from out of the infills of cremation burials.

We expect a difference in chemical content between empty burials and burials with cremains. **The question is whether we can interpret empty urns as the consequence of symbolic action.**

Material

13 cremation burials from the site **Ostrov u Stříbra (Late Bronze Age)**.

Samples of **1) bones**; **2) infills** directly from around the bones and **3) several control samples** from the outsides

Total of 35 of samples

We divided the infills into four categories based on bone weight:

- **infill with no bones;**
- **infill with bones from 0.5 to 10.5 g;**
- **infill with bones from 10.6 to 56.0 g;**
- **infill with bones from 56.1 to 216.0 g.**

Method

For the purpose of our research we used portable X-ray fluorescence spectroscopy (pXRF), in concrete the DELTA (Innov Inc.) portable device.

The measurements were then conducted in the GeoChem mode using the voltage of 10 kV for 240 seconds in each case.

Eighteen elements out of 39 tested were detected in the soil and bone samples (from 0.05 up to 15 ppm): Si, Al, Fe, K, Ca, P, Al, Ti, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Zr, Pb.

Steps of proceedings

1) **Testing of pXRF measurements.** We conducted an assessment of agreement between two measurements a month apart from each other. We analyzed two soil samples which originated in one burial infill with high amount of bones excavated and the presence of chemical traces (95% LA using Bland-Altman plot and t-test).

2) **Detection of Ca/P ratio in bone samples.** If the ratio is the same as in the unburnt bones (approx. 2.15), it can be assumed that the temperature of burning was low and thus fresh bones with parts of soft tissue had been buried, which later dissolved into the soil.

3) **Variance in soil chemistry depending on presence of bones.** One-way ANOVA was used to compare the soil samples. Our null hypothesis is that there is no significant difference in element content between the soil samples (at the 5% and 10% significance level).

Results: Testing of pXRF measurements.

There weren't any differences between the first and second measurements (t-test = -1.0; p=0.331)

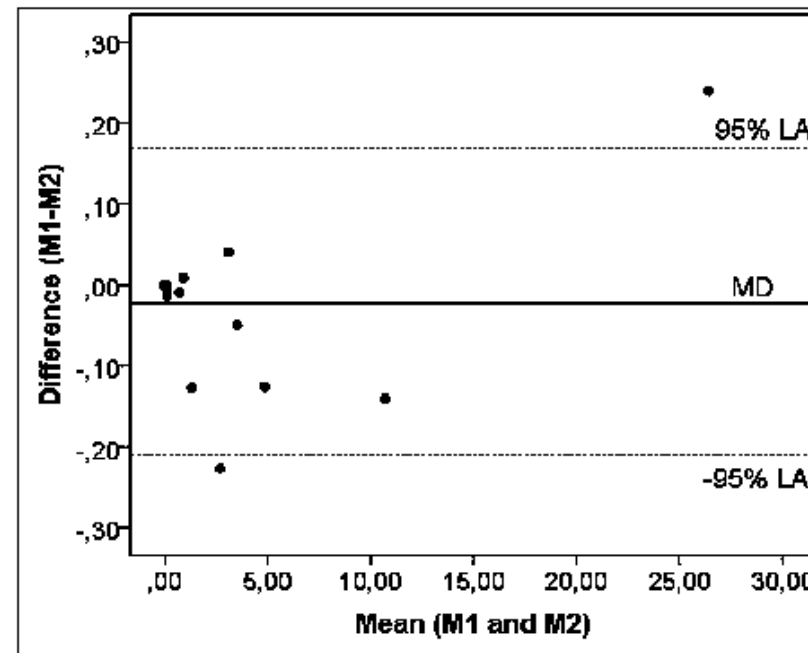


Figure 1. Bland-Altman plot. Assessment of agreement between first and second measurements by pXRF.

Results: Detection of Ca/P ratio in bone samples.

We assume **low** temperature of burning. Bones probably contained organic matrix and could **have left chemical trace in the surrounding soil.**

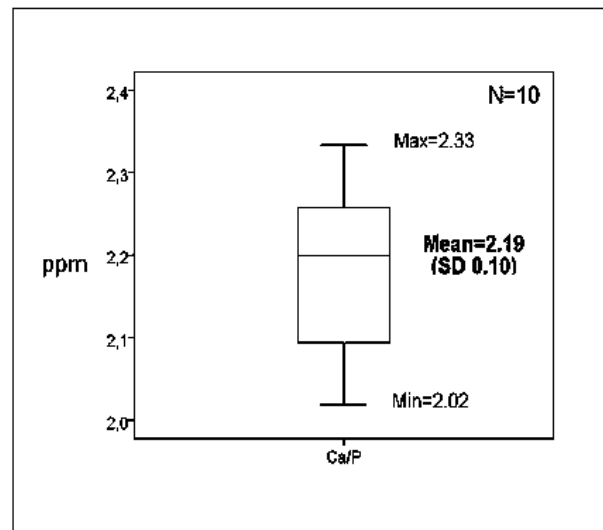
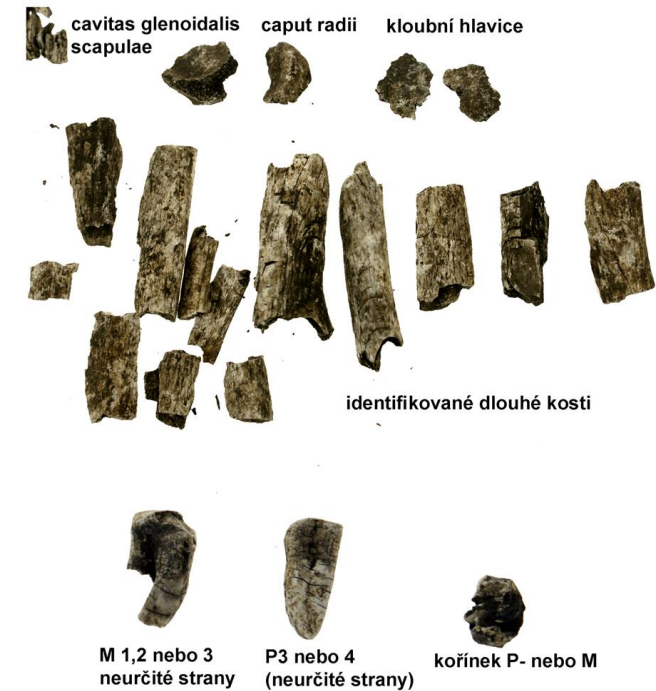
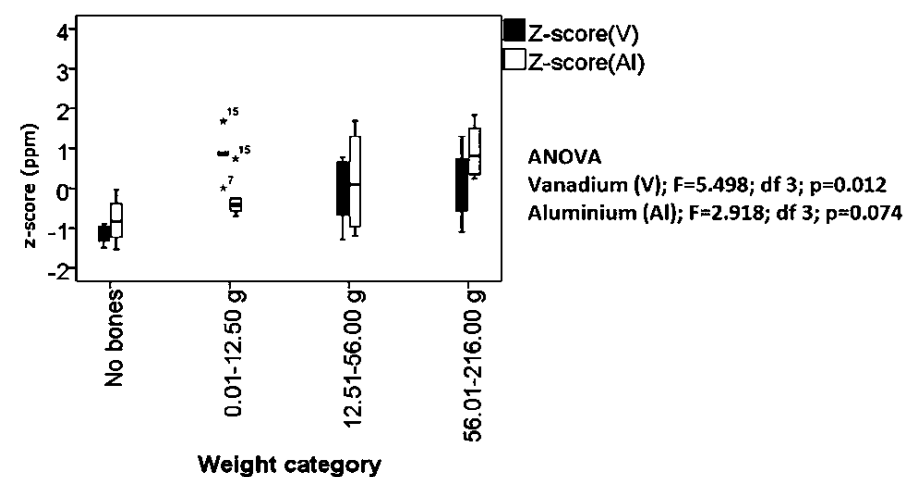
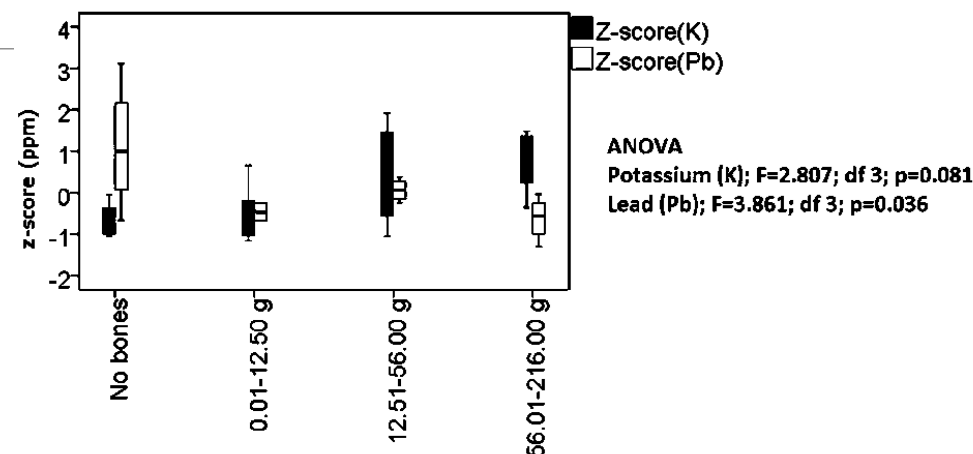
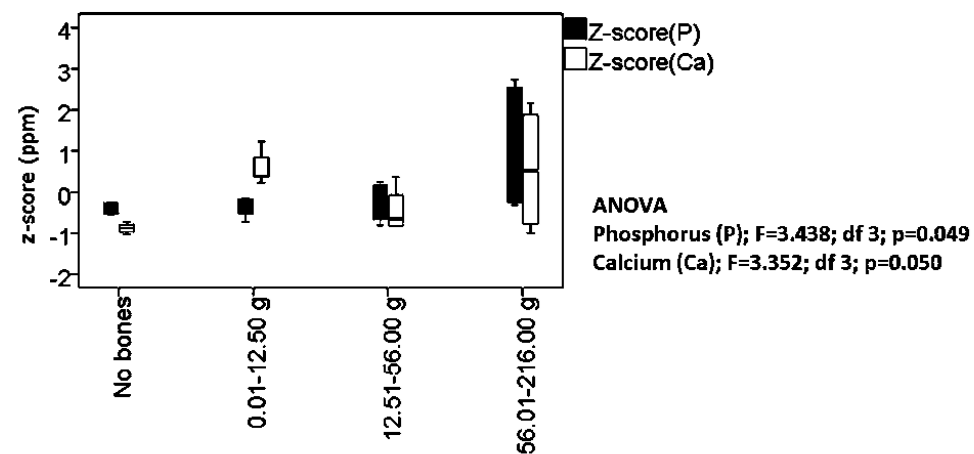


Figure 2. Box plot of Ca/P ratio in 10 bone samples.



Results: Variance in soil chemistry depending on presence of bones



Conclusion

Result confirms that burnt bones dissolved into the soil.

pXRF is a suitable instrument for funeral archaeology.

The urns without bones were probably initially empty. Those individuals who carried out the funerals, had not buried cremains in four of the thirteen urns which we explored.

The results contradict the statement of Herrmann et al. (1990) that cremains do not dissolve. **However, in the strict sense we can say that only bones that are incompletely cremated might have dissolved into the surrounding soil.**

Do cremains leave a chemical trace in grave infills? Empty urns as evidence of symbolic funeral rite.

Pankowská Anna¹, Moník Martin², Spěváčková Petra¹, Šneberger Jiří³, Kašparová Hana¹

¹Laboratory of Biological Anthropology, Department of Anthropology, Faculty of Philosophy and Arts, University of West Bohemia in Pilsen ²Department of Geology, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, ³Museum of West Bohemia (Czech Republic)

Background

The amount of cremains in cremation burials varies and does not reach the expected number in most cases. The possible reasons of this may be:

- Intentional and symbolic action of past ritual practices
- accidental post-depositional processes
- Indelicate handling by excoavators.

When an empty grave is found and inhumation is suspected, phosphate analysis is conducted in order to determine whether the body had decomposed or had never been interred (e.g. Emée and Majer 2009). In addition to phosphorus there are used traces of iron, aluminium and manganese, which are accumulated through microbial activity in the surrounding soil. Furthermore, calcium amount was usually higher in the soil under the decomposed body (Lambert 1997).

In cremains, we usually do not expect chemical dissolution into the soil, firstly due to the absence of soft tissues and secondly because of the higher resistance to diagenetic processes (Hermann et al. 1990). However, this assumption could be valid only in the case of completely calcined bones. Completely and incompletely cremated bones are recognizable by color, consistency, microstructure and indirectly by Ca/P ratio, which is around 2.15 in fresh bones. Bone mineral hydroxyapatite transforms into different phases through the burning and the Ca/P ratio decreases to 1.11-1.46 in whitlockite (Skinner 2005).

Aim

The aim of this study is to investigate the origin of empty urns using chemical traces of soil samples from out of the infills of cremation burials. We expect a difference in chemical content between empty burials and burials with cremains. The question is whether we can interpret empty urns as the consequence of symbolic action.

Material

We studied 13 cremation burials from the site Očtov u Štřelova (Late Bronze Age). The excavation was conducted under the leadership of ZP (NPO), Píseň (Mgr. Kateřina Postránecká). We collected samples of 1) bones; 2) infills directly from around the bones and 3) several control samples from the outside (total of 35 of samples). We divided the infills into four categories based on bone weight:

- Infills with no bones;
- Infills with bones from 0.5 to 10.5 g;
- Infills with bones from 10.6 to 68.0 g;
- Infills with bones from 68.1 to 216.0 g.

This research was supported by Faculty of Pilsen (grant "Pilsen - unexcavated mounds").

Measures and Methods

For the purpose of our research we used portable X-ray fluorescence spectroscopy (pXRF), in concrete the DELTA (Innov Inc.) portable device. To minimize the error caused by large particles from out of the grave or soil, all samples had been ground in an agate mortar prior to the measurement. The measurements were then conducted in the GeoChem mode using the voltage of 10 kV for 240 seconds in each case. Eighteen elements out of 39 tested were detected in the soil and bone samples (from 0.05 up to 15 ppm): Si, Al, Fe, K, Ca, P, Al, Ti, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Zr, Pb.

Steps of proceedings:

1) Testing of pXRF measurements. We conducted an assessment of agreement between two measurements a month apart from each other. We analyzed two soil samples which originated in one burial infill with high amount of bones excavated and the presence of chemical traces (95% LA using Bland-Altman plot and T-test).

2) Detection of Ca/P ratio in bone samples. If the ratio is the same as in the unburnt bones (approx. 2.15), it can be assumed that the temperature of burning was low and thus fresh bones with parts of soft tissue had been buried, which later dissolved into the soil.

3) Variance in soil chemistry depending on presence of bones. One-way ANOVA was used to compare the soil samples. Our null hypothesis is that there is no significant difference in element content between the soil samples (at the 5% and 10% significance level).

Results

1) Measurement agreement between the two measurements was significant (Figure 1). There weren't any differences between the first and second measurements (t-test = -1.0; p=0.331).

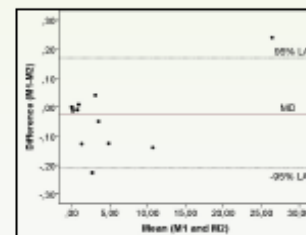


Figure 1. Bland-Altman plot. Assessment of agreement between first and second measurements by pXRF.

2) Ca/P ratio. The Ca/P ratio was relative constant in all 10 bone samples (Figure 2). The mean ratio was 2.19 (SD 0.10). The ratio corresponds to unburnt and fresh bones. We assume low temperature of burning. Bones probably contained organic matrix and could have left chemical trace in the surrounding soil.

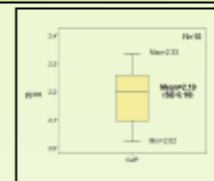


Figure 2. Box plot of Ca/P ratio in 10 bone samples.

3) Variance in chemistry of soil samples.

a. From among selected elements of higher ppm values, only Ca, P, V and Pb significantly differed at the 0.05 level and further Al and K differed at the 0.10 level among the infills considering bone weight (Figure 3). The content of most of the elements increases in relation to weight of bones deposited in the urns. This result confirms that bones dissolved into the soil. Only Pb significantly decreased with increasing bone weights.

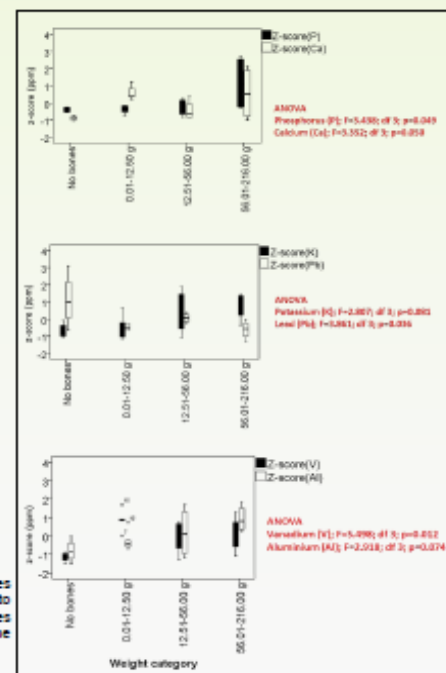


Figure 3. Box plots of element's variance based on presence of bones and weight category.

b. The infills of all cremation burials significantly differ in Ca, Mn, V and Sr (at the 0.05 level) and in P (at the 0.10 significant level) from the control sample from outside. The amounts of all these elements were higher in the infills than the surrounding soils (Figure 4).

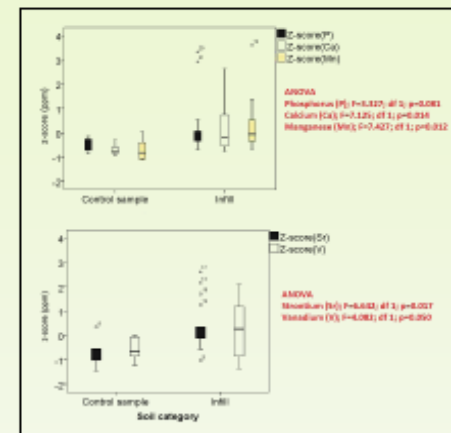


Figure 4. Box plots of element's variance in control sample from the outside and from within the urn's infill

Conclusion

We conclude that pXRF is a suitable instrument for funeral archaeology. The urns without bones were probably initially empty. Those individuals who carried out the funerals, had not buried cremains in four of the thirteen urns which we explored. We assume this since there were significant increases of phosphorus (P), calcium (Ca), vanadium (V), aluminium (Al) and potassium (K) in relation to the amount of the bones. We also found significant differences in P, Ca, Mn, V and Sr between all infills and the control samples. Elements as a P, Ca, Mn are usually connected with corpse decomposition in inhumations (Lambert 1997).

The results contradict the statement of Hermann et al. (1990) that cremains do not dissolve. However, in the strict sense we can say that only bones that are incompletely cremated might have dissolved into the surrounding soil. Burials under this study were cremated at low temperatures. This is suggested by the bone color, consistency and unchanged Ca/P ratio in bones. The Ca/P ratio serves as an indirect evidence that the temperature did not reach critical values of 700 °C and bone mineral did not start to recrystallize.

Emée M, Mager A. 2006. Uniformita, či rozmanitost pohřebního ritu? Interpretace výsledků fosforové plošné analýzy na pohřebišti ústecké kultury v Praze 9 – Mělnickách. *Archeologické rozhledy* 91:493-500.

Hermann B, Grube G, Hummel S, and Pieperbrink H. 1990. *Prähistorische Anthropologie. Leitfaden der Feld- und Labormethoden*. Berlin.

Lambert JB. 1997. *Traces of the Past: Unveiling the Secrets of Archaeology through Chemistry*. MA, USA.

Schöner HW. 2005. *Mineralogy of bone. Essentials of medical geology: Impact of the natural environment on public health*. Chapter 20. New York, NY, USA.