



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

BIOAPATIT JAKO ARCHIV KONTAMINANTŮ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

BIOAPATITE AS AN ARCHIVE OF ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavla Křemečková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1869/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Pavla Křemečková**
Studijní program: Aplikovaná analytická,
environmentální a forenzní chemie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Michaela Vašinová**
Galiová, Ph.D.

Název bakalářské práce:

Bioapatit jako archiv kontaminantů životního prostředí

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat rešerši popisující bioapatit, jeho možnosti inkorporace možných kontaminantů životního prostředí do své struktury a metody používané pro 2D imaging vybraných prvků v recentním kosterním materiálu se zaměřením na LA-ICP-MS.
2. Vypracovat metodiku pro sledování anorganických kontaminantů in situ pomocí LA-ICP-MS a ověřit možnosti přípravy recentních vzorků k měření s minimálním dopadem na přirozenou distribuci prvků.
3. Analýza reálných vzorků a zhodnocení míry inkorporace vybraných prvků do apatitu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Pavla Křemečková
studentka

doc. Mgr. Michaela Vašinová
Galiová, Ph.D.
vedoucí práce

vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Narůstající kontaminace životního prostředí se za poslední léta stává jedním z nejvíce celosvětově řešených témat. K důkladnému porozumění dopadu kontaminantů na jednotlivé složky životního prostředí může být využit i kosterní materiál, jehož hlavní minerální složka bioapatit je schopna akumulovat a uchovávat nežádoucí prvky ve své struktuře. V rámci této bakalářské práce byla studována prvková distribuce v kostech divoké zvěře pocházející jak z inkriminované, tak i kontaminací nezasážené oblasti. Pomocí metody LA-ICP-MS se podařilo detekovat prvky přirozeně se v kostech vyskytující i vybrané kontaminanty, které se v kostech zvířete ze znečištěné oblasti vyskytovaly ve vyšších obsazích. Též byly vyzkoušeny různé techniky využívané pro očištění kostí od měkkých tkání a na základě výsledků provedených experimentů bylo konstatováno, že použité techniky nemají na prvkovou distribuci v analyzovaných kostech divokých zvířat žádný vliv.

ABSTRACT

Increasing environmental contamination has become one of the most globally addressed issues in recent years. Skeletal material, whose main mineral component bioapatite is able to accumulate and retain unwanted elements in its structure, can be used to thoroughly understand the impact of contaminants on different environmental components. In the framework of this bachelor thesis, the elemental distribution in the bones of wildlife originating from both contaminated and non-contaminated areas was studied. Using the LA-ICP-MS method, it was possible to detect elements naturally occurring in the bones as well as selected contaminants that were present in higher contents in the bones of the animal from the contaminated area. Also, different techniques used for bone cleaning from soft tissues were tested and based on the results of the experiments performed, it was concluded that the techniques used had no effect on the elemental distribution in the analyzed bones of wild animals.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kost, bioapatit, macerace, analýza kosterního materiálu, LA-ICP-MS, prvková distribuce

KEYWORDS

Bone, bioapatite, maceration, skeletal material analysis, LA-ICP-MS, elemental distribution

KŘEMEČKOVÁ, Pavla. *Bioapatit jako archiv kontaminantů životního prostředí* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-21]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149047>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí . Vedoucí práce Michaela Vašinová Galiová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych velmi poděkovala své vedoucí doc. Mgr. Michaela Vašinové Galiové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala. Také bych chtěla velice poděkovat konzultantovi Mgr. Ing. Lubomíru Prokešovi, Ph.D. za odborné rady a konzultace spojené s problematikou prvkové distribuce v kostech. Mé díky patří též Ing. Matěji Březinovi Ph.D. za pomoc s přípravou nábrusů a Ing. Václavu Práškoví za pomoc s přípravou vzorků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i mé rodině a blízkým za velkou podporu během celého studia.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Kost.....	8
2.1.1	Makroskopická struktura kosti	8
2.1.2	Mikroskopická struktura kosti.....	9
2.1.3	Chemické složení kostní tkáně	10
2.1.4	Diageneze	16
2.2	Metody využívané k odstranění měkkých tkání z kostí	16
2.2.1	Kožojedi	17
2.2.2	Pohřbení	18
2.2.3	Macerace	18
2.3	Metody analýzy kosterních pozůstatků	19
2.3.1	Ramanova spektroskopie.....	19
2.3.2	Infračervená spektroskopie	20
2.3.3	Elektronová mikrosonda	20
2.3.4	Rentgenová fluorescenční spektrometrie	20
2.3.5	Spektrometrie laserem buzeného plazmatu.....	21
2.3.6	LA-ICP-MS.....	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie a certifikované referenční materiály	26
3.2	Použité pomůcky a přístroje	26
3.3	Vzorky	27
3.3.1	Příbramsko a Liptovská Lúžna.....	28
3.4	Příprava vzorků.....	28
3.5	Analýza kostí pomocí metody LA-ICP-MS	31
3.5.1	Ladění ICP-MS	31
3.5.2	Nastavení experimentálních parametrů LA-ICP-MS analýzy	31
3.5.3	Popis měření	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Metody využité k odstranění měkkých tkání z kostí	38
4.1.1	Kožojed šedý	38
4.1.2	Kapsle do myčky	39
4.1.3	Savo	41
4.1.4	3% NaOH	44

4.2	Sledování prvkové distribuce	47
4.2.1	Analýza vzorků kostí z nekontaminované oblasti.....	47
4.2.2	Analýza vzorků kostí z kontaminované oblasti.....	54
4.2.3	Bodová analýza	60
5	ZÁVĚR.....	66
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	67
7	ZDROJE.....	68
8	PŘÍLOHY.....	76

1 ÚVOD

V dnešní době je ochrana životního prostředí a sledování výskytu kontaminantů jednou z klíčových priorit vědeckých výzkumů. K porozumění vlivu kontaminantů na všechny složky životního prostředí se využívá informací z nejrůznějších zdrojů, kterými mohou být kromě půdy, vody a ovzduší i biologické materiály jako jsou právě kosti.

Význam kostí jako biologického materiálu se z hlediska posuzování míry kontaminace životního prostředí neustále rozšiřuje a poukazuje se zvláště na jejich využití jako archivu kontaminantů životního prostředí. Především minerální složka kostí zvaná bioapatit má jedinečnou schopnost akumulovat a uchovávat kontaminanty ve své struktuře i na několik let, a může tedy sloužit jako důležitý informační pramen vypovídající o současné či historické expozici kontaminantů. Jedná se zejména o expozice kovů vyskytujících se v ekosystémech ve velké míře díky rozsáhlému těžebnímu průmyslu.

Pro studium současné kontaminace z pohledu zhodnocení alterace kontaminantů do bioapatitu se využívá recentních kostí zvířat, která žila na znečištěných lokalitách. Nejčastěji se jedná o kosti ryb, malých savců a ptáků. Inkorporované cizí prvky bývají v kosterním materiálu obsaženy ve stopovém množství, a proto je na jejich detekci potřebná vhodná analytická metoda. Přesná identifikace a kvantifikace výskytu sledovaných kontaminantů je nezbytná pro posouzení jejich rozsahu a potencionálních rizik. Hmotností spektrometrie indukčně vázaného plazmatu spolu s laserovou ablací (LA-ICP-MS) umožňuje ultrastopové detekce prvků a zároveň je schopna analyzovat přímo pevný materiál bez potřeby převádění vzorků do roztoku.

Avšak recentní kosti je i tak nutné na analýzu připravit odstraněním měkkých tkání a jiných organických fází, jelikož by mohly ovlivňovat výsledky měření. Nejpoužívanějšími technikami k očištění kostí jsou macerace v různých chemikáliích či využití brouků konzumujících měkké tkáně.

Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku inkorporace možných kontaminantů do struktury bioapatitu recentních kostí divoké zvěře. Pro účely této práce byly vybrány dvě lokality, ze kterých divoká zvěř pochází. První z nich je Příbramsko známé pro svou kontaminaci těžkými kovy a jako oposit Liptovská Lúžna, lokalita neznečištěná. Dále je cílem vypracování metodiky pro sledování prvkové distribuce v kostech *in situ* metodou LA-ICP-MS, vyzkoušení různých maceračních technik využívaných k odstranění měkkých tkání z kosterního materiálu a posouzení jejich efektivity a vlivu na přirozenou prvkovou distribuci kostí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

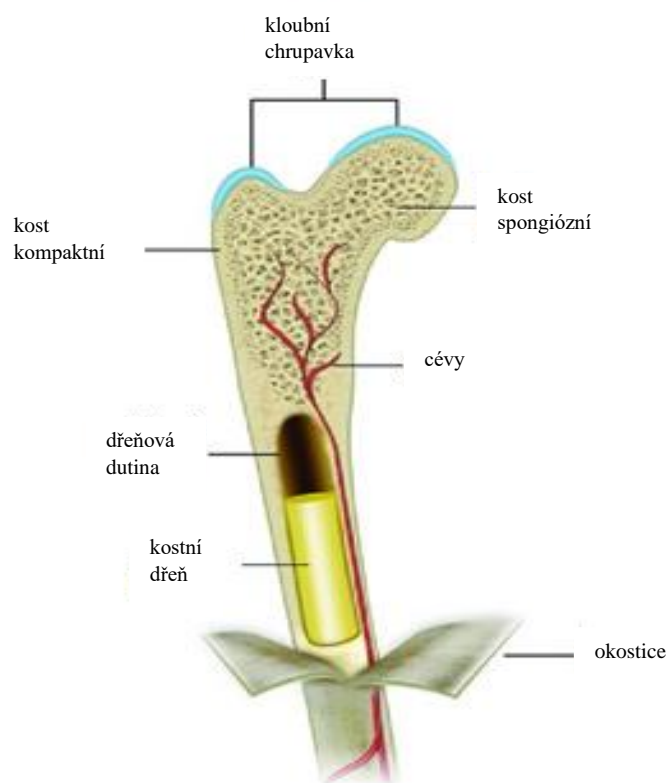
2.1 Kost

Kost (*os*) je mineralizovaný typ pojivové tkáně složený ze tří typů buněk (osteoblastů, osteocytů a osteoklastů) a kostní matrix s organickou a anorganickou částí. Jedná se o pevný a tvrdý orgán. Existuje několik rozdělení typů kostí, které se liší svou funkcí, tvarem a stavbou (kosti dlouhé, krátké, ploché, nepravidelného tvaru a pneumatizované) [1].

Spolu s chrupavkami a vazivem tvoří kostru – oporu těla obratlovců. Zajišťují ochranu orgánů a spolu se svaly umožňují pohyb. Slouží také jako zásobárna iontů, které jsou dle potřeby vyplavovány a transportovány do jiných částí těla. Případný nedostatek ochranných a minerálních látek v potravě vede ke změně složení a ztrátě pevnosti kosti. Přítomnost červené kostní dřeně uděluje kosti funkci hlavního a definitivního krvevorného orgánu. Kosti vznikají procesem zvaným osifikace (kostnatění), při kterém se osteoblasty zcela obklopují organickou a anorganickou hmotou, což vede k jejich změně v osteocyty a zpevňování [1, 2].

2.1.1 Makroskopická struktura kosti

Povrch kosti kryje tuhá a pevná vrstva okostice (periost, *periosteum*) (*obr. 1*). Periost je tvořen svazky kolagenních vláken a fibroblasty, zajišťující fixaci okostice ke kosti. Osteogenní buňky a jejich diferenciaci v osteoblasty zajišťuje růst a hojení kostí. Periost je mimo jiné i citlivý na bolest, za což jsou zodpovědné cévy a nervová zakončení. Vnitřní povrch kostních dutin je pokryt tenkou vazivovou vrstvou endostem (*endosteum*) [1].



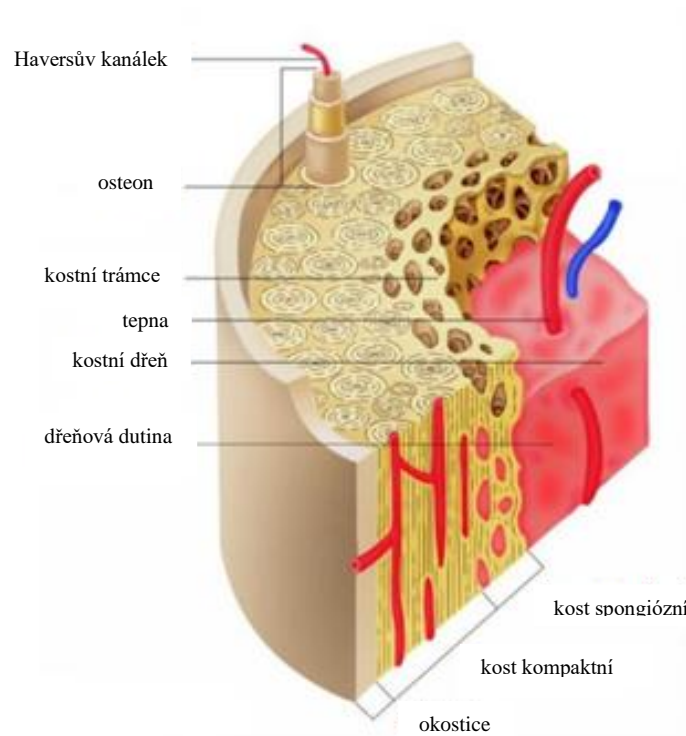
Obr. 1: Makroskopická struktura kosti. Převzato a upraveno z [3].

Dutiny kostí vyplňuje kostní dřeň. V mládí lidí i zvířat jsou dřeňové dutiny vyplněny červenou kostní dření tvořenou buňkami krvevorné tkáně. V dospělosti se krvevorná tkáň

nahrazuje tkáň tukovou a v dřevné dutině vzniká žlutá kostní dřev, která je význačným energetickým zdrojem organismu. Při zvýšené potřebě krve může dojít k regeneraci žluté dřevě v červenou. Důsledkem stáří a vyčerpání dochází ke gelatinosní degeneraci, ztrátě tuku a změně v šedou kostní dřev. Kromě periostálních cév je kost řádně prokrvena i medulárními cévami a tepnami, které zásobují houbovitou kost i dřev [1, 2].

2.1.2 Mikroskopická struktura kosti

Rozlišují se dva typy kostní tkáně – primární a sekundární. Primární, plst'ovitá, kostní tkáň je nezralý, přechodný typ kostní tkáně. Později dochází k přestavbě primární kostní tkáně na sekundární, avšak její zbytky lze registrovat například při novotvorbě hojících se fraktur. Sekundární, lamelární, kostní tkáň je na rozdíl od plst'ovité mechanicky odolnější. Na povrchu kosti se vyskytuje ve formě kosti hutné, kompaktní (*substantia compacta*) a uvnitř kosti jako kost trámčitá, houbovitá (*substantia spongiosa*) (obr. 2) [1].



Obr. 2: Mikroskopická struktura kosti. Převzato a upraveno z [4].

Kompakta zajišťuje odolnost vůči tahu a tlaku a to díky charakteristickému uspořádání silných kolagenních vláken do koncentricky vrstvených lamel. Pět až dvacet lamel obklopuje cévní, Haversův, kanálek. Ve stěnách lamel jsou drobné prostory, lakuny, které slouží jako úložiště kostních buněk – osteoblastů a osteocytů. Takto vytvořené mnohvrstevné sloupečky se označují jako Haversův systém, neboli základní stavební jednotka kompaktní kosti, osteon. Na příčném řezu jsou viditelné jako kruhy. Mezi Haversovými systémy se nacházejí nepravidelně uspořádané lamely intersticiální, tvořené zbytky starších osteonů. Jednotlivé osteony jsou od sebe a okolí odděleny cementovou linií. Haversovy kanálky

jednotlivých osteonů jsou vzájemně propojeny pomocí příčných Volkmannových kanálků a tím tvoří prostorovou síť obstarávající krevní zásobení hutné kosti [1, 5].

Spongióza je tvořena mnohonásobně propojenými trámečky a ploténkami. Jejich charakteristické prostorové uspořádání (tzv. architektura spongiózní kosti) připomínající strukturu houby je výsledkem působení mechanických sil na kost. Drobné skuliny vyplňují kostní dřev. Trámce jsou tvořeny lamelami podobně jako v kompaktě, ale s tím rozdílem, že nedochází k tvorbě osteonů [1, 5].

2.1.3 Chemické složení kostní tkáně

Kostní matrix obsahuje jak organickou, tak anorganickou složku. Organická hmota syntetizována osteoblasty zahrnuje kolagen typu I a amorfni hmotu. Organické látky tvoří 35 % hmoty, zbylých 65 % představuje složka anorganická. Obsahuje sloučeniny vápníku a fosforu v podobě krystalků hydroxyapatitu a amorfniho fosforečnanu vápenatého, také stopové prvky a uhličitany či citráty [1, 6].

Složení kostní matrix determinuje základní vlastnosti kostní tkáně. Minerální látky jsou odpovědné za pevnost a tvrdost, zatímco organická hmota podmiňuje pružnost. Podpůrná tkáň vznikající kombinací těchto vlastností je velmi odolná, tvrdá a zároveň do určité míry i pružná [7].

Organická složka kosti

Organický podíl kosti tvoří z 95 % kolagen typu I a amorfni látky – glykosaminoglykany vázané s proteiny. Kolagen typu I patří do skupiny strukturálních proteinů a jedná se o nejrozšířenější typ kolagenu v organismu. Tvoří kolagenní vlákna mající tendenci se spojovat ve větší svazky. Vlákna jsou velmi pevná, ohebná, ale postrádají elasticitu [8].

Kostní sialoprotein a osteokalcin jsou zástupci specifických glykoproteinů, které se pevně vážou s vápníkem a mohou být odpovědné za jeho ukládání v kostech [5, 9]. Jsou také důležitým faktorem kalcifikace kostní matrix [10].

Anorganická složka kosti

Anorganickou složku kosti tvoří fosforečnan vápenatý jak ve formě amorfni, tak krystalické. Svou strukturou a složením spadá k minerálům apatitové skupiny a často bývá označován jako hydroxyapatit (HAP) se stechiometrickým vzorcem $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Stechiometrický apatit avšak v biologických systémech nenajdeme, jelikož často podléhá substitučním reakcím a jeho složení je tedy proměnlivé. Tento variabilní biogenní apatit se nazývá bioapatit a jeho složení se může vymežit vzorcem:

$(\text{Ca}, \text{Na}, \text{Mg} [\])_10(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl}, \text{CO}_2, \text{O}, [\])_2$, kde [] značí vakanci [11, 12].

Krystalky bioapatitu jsou uloženy podél kolagenních vláken a obklopeny základní amorfni hmotou. Povrch krystalů je hydratován, což ulehčuje iontovou výměnu mezi minerálem a tělními tekutinami [10].

2.1.3.1 Prvky přirozeně se vyskytující v kostní tkáni

V kostech se nachází mnoho prvků a každý z nich má svou důležitou funkci. Především Ca a P determinují kvalitu kostní hmoty. Bylo ale prokázáno, že i obsah esenciálních prvků (Mg, K, Zn, Cu, Mn, F a další) přijímaných v potravě, je klíčovým faktorem vedoucím ke zdravé kosti. Naopak výskyt toxických prvků (např. Cd, Al, Pb) vyúsťuje v dysfunkci kostního metabolismu a řadu kostních onemocnění. Kostí díky své struktuře a velikosti slouží v organismech také jako úložiště prvků. V určitých fyziologických stádiích (např. těhotenství, stáří), při kterých dochází k metabolismu vápníku, mohou být stopové prvky uvolněny a přeneseny krevním řečištěm do jiných orgánů na místa potřeby [13, 14]. Obsah prvků v kosti se liší v závislosti na jejím typu. Tedy v části kompaktní jsou jiné obsahy prvků než v části spongiózní [15].

Prvky obsažené v kostech tedy mohou vypovídat jak o samotném zdraví jedince, tak i o jeho výživě či geografickém původu a migraci. Této skutečnosti využívají například archeologové při sledování pohybu a výživy dávných populací pomocí zjišťování izotopového poměru některých prvků (především $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ a $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) v tkáních studovaného organismu. Pro určení stravy jsou využívány především izotopy dusíku (rozlišení rostlinné, masité a mořské stravy) a izotopy uhlíku (rozdílný metabolismus C3 a C4 rostlin). Stabilní izotopy přijímá organismus formou potravy a tekutin a poté dochází k jejich zabudování do kostí a zubů [16, 17].

Některé kontaminující prvky (např. Pb) mají výbornou kumulativní funkci. Na rozdíl od krve, ze které se vyplaví olovo po cca 30 až 40 dnech, v zubech a kostech dokáží setrvat i několik let. Ultrastopové analýzy kostí a zubů tedy umožňují identifikaci historických nezjištěných případů expozice kontaminantů životního prostředí i po té, co se indexy znečištění vrátily do normálu [18]. Schopnost akumulace kovů ve složkách životního prostředí (půda, voda) je celosvětovým problémem. Kovy se poté skrze rostliny z takto kontaminovaných oblastí kovy stávají součástí potravního řetězce a dochází k jejich zabudování do organismů [19].

Vápník a fosfor

Většina Ca^{2+} tvoří v tělech obratlovců nerozpustnou minerální složku základní extracelulární hmoty kostí a zubů. Spolu s vápníkem se v kostech vyskytuje i fosfor. Společně se vyskytují ve formě fosforečnanů vápenatých, zejména jako dříve zmiňovaný HAP $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, který váže téměř 99 % Ca. Vitamín D (kalcitriol) a hořčík napomáhají ukládání vápníku do kostí, a proto je jejich přítomnost velmi důležitá pro jeho správné využití. Vápník je nezbytný pro správný průběh srážení krve, svalové kontrakce, sekrece některých látek buňkami či uvolnění neurotransmiterů na nervových zakončeních.

Hlavním zdrojem vápníku je mléko a mléčné výrobky. Průměrný obsah vápníku v kostech se pohybuje okolo $3,82 \times 10^5$ – $4,02 \times 10^5$ mg/kg, což odpovídá procentuálnímu obsahu 39,2 %, Nedostatek vápníku vzniká při jeho nedostatečném příjmu v potravě. Deficit kalcia se nejvýrazněji projevuje demineralizací kostí tkáně, čímž kost ztrácí svou pružnost a pevnost, nebo dokonce i paralýzou. Za klíčový zdroj fosforu se považují potraviny živočišného původu [14, 15, 20].

Poměr Ca/P

Poměr vápníku ku fosforu bioapatitu vykazuje větší rozpětí v hodnotách oproti stechiometrickému hydroxyapatitu. Změřené hodnoty Ca/P pro bioapatit vyjádřené v hmotnostních procentech se pohybují od 1,3 až po 2,2. U stechiometrického hydroxyapatitu má tento poměr hodnotu 2,15. Takto odlišné hodnoty poměru Ca/P bioapatitu od stechiometrického HAP jsou vysvětlovány několika teoriemi, které jsou především založeny na variabilitě molekuly bioapatitu. Existuje totiž skupina kalciumfosfátových minerálů (oktakalciumfosfát, brushit aj.) o nižším Ca/P, které se mohou tvořit a následně stabilizovat v těle organismů. Jejich přítomnost je možným důvodem zmíněné proměnlivosti a snížení hodnot Ca/P naměřených ve vzorcích kostí. Složení bioapatitu se během času mění a každá změna vyvolaná substitucí či dokonce vznikem vakance, může ovlivnit poměr Ca/P. Vyšší hodnoty Ca/P mohou být zapříčiněny substitucí SO_4^{2-} či CO_3^{2-} za PO_4^{3-} . Naopak náhrada sodíku, olova či stroncia za vápník poměr snižuje [21].

Poměr Ca/P je také ukazatelem kvality a zdraví kostní tkáně. Jako optimální bývá uváděna hodnota cca 2,5:1. Právě změny v poměru silně souvisí se ztrátou kvality a síly kosti, které zapříčiňují kostní onemocnění. S úbytkem kostní hmoty klesá i hodnota poměru. Tento trend je mnohem více zřetelný u kosti kompaktní než u spongiózní, jelikož se pomaleji obměňuje a má nízkou porozitu. Poměr Ca/P by tedy mohl sloužit jako biomarker pro efektivní diagnostiku osteoporózy, osteomalacie či křivice [14, 22].

Velký pokrok v kvantifikaci a zobrazování poměru Ca/P v kostech nastal s využitím techniky CT-DEA neboli DECT (Dual-Energy Computed Tomography, výpočetní tomografie s duální energií záření). Tato zobrazovací metoda je založena na vyhodnocení absorpce rentgenového záření tkáněmi, respektive atomy prvků, které je tvoří. Díky systému s duální energií záření jsou výsledkem analýzy 3D mapy zobrazující distribuci a hodnoty poměru Ca/P ve všech místech vzorku kosti. Na takových 3D obrázcích lze pak snadno vidět rozdíl mezi zdravou kostí a kostí zasaženou osteoporózou, co se obsahu a lokalizace prvků týče [23, 24].

Hořčík

Ionty Mg^{2+} jsou součástí všech biologických tekutin, zčásti vázané zápornými náboji bílkovin a nukleotidů. Asi 60 % celkového obsahu hořčíku v těle dospělého člověka je vázáno právě v nerozpustné minerální složce extracelulární hmoty kostní tkáně, což odpovídá obsahu v rozmezí 1560–2320 mg/kg. Ionty Mg^{2+} lze označit jako přirozené antagonisty iontů Ca^{2+} , jelikož snižují nervovou dráždivost a zpomalují nervosvalový přechod vzruchu. Hořčík do organismu vstupuje rostlinnou stravou – je součástí chlorofylu. Co se kostí týče, může jeho dlouhodobý deficit přispívat k osteologickým chorobám [15, 20].

Mangan

Mangan je esenciální stopový prvek, který je součástí enzymů syntézy proteoglykanů organické matrix kosti a chrupavek. Na ostatní enzymy působí Mn^{2+} jako účinný katalyzátor. V kostech se vyskytuje v obsahu 0,055–0,155 mg/kg. Bohatým zdrojem Mn jsou cereálie. Deficit manganu způsobuje deformace kostí (zakrňování či ztlustění) kvůli porušené obnově kostní tkáně a chrupavek. Stejně dopady na kost se objevují i při přebytku manganu, navíc

doprovázené poruchami nervového systému, jelikož přemíra manganu působí neurotoxicky [15, 20, 25, 26].

Sodík a draslík

Ionty Na^+ a K^+ jsou biogenní prvky nezbytné k udržení osmotického tlaku, hospodaření s vodou a šíření elektrického signálu v nervových a svalových buňkách. Sodné ionty jsou ústředními kationty extracelulárních tekutin a na jejich koncentraci závisí osmolalita a celkový objem krevní plazmy. Zajišťují také přesuny vody mezi extra- a intracelulárním prostorem. Draselné ionty jsou hlavním kationtem intracelulárním. Draslík obohacuje povrch kostí. Na^+ je tělem organismů přijímán prostřednictvím jedlé soli NaCl , K^+ stravou rostlinného původu. Oba kovy jsou pak součástí mnoha nerostů [14, 20]. Typický obsah sodíku v kostech se pohybuje v rozmezí 9450–14700 mg/kg, u draslíku jsou to pak hodnoty 900–2490 mg/kg. Onemocnění kostí není přímo spojeno s nedostatkem či nadbytkem sodíku a draslíku, tedy kostní metabolismus není citlivý na jejich výkyvy [15, 25].

Fluor

Fluor je považován za esenciální prvek v zubech a kostech. Ve své iontové podobě F^- tvoří složku fluoroapatitu. Má velký význam v léčbě osteoporózy, jelikož snižuje rozpustnost kostních minerálů, tím omezuje jejich resorpci a podporuje mineralizaci a tvorbu nové extracelulární hmoty kostní tkáně. Stejný efekt má i na zubní sklovinu, zabraňuje vzniku kazů, a proto se přidává do zubních past. Normální obsah fluoru v kostech dosahuje hodnot od 500 do 2200 mg/kg. Při několikaletém nadměrném příjmu fluoridů potravou či tekutinami vzniká kostní fluoróza, která narušuje homeostázu kosti a snadno dochází k frakturám [14, 20, 21]. Fluoróza se objevuje zejména u lidí žijících ve vulkanických oblastech (např. okolí Vesuvu). Fluoridy jsou totiž přítomny ve vyvěřelých horninách a vzniklých prachových částicích, odkud se poté depozicí dostávají do vodních zdrojů. Vysoká dávka fluoridů sice způsobuje ztluštění a novotvorbu kosti, ale takto vytvořená kost bohužel vykazuje abnormální charakteristiky. Osteocyty jsou nepravidelně uspořádány, dochází ke zvětšení lakun a oslabení biomechanických vlastností kosti [25, 27, 28].

Zinek

Zinek je významný prvek mnoha funkcí. Je například součástí desítek různých enzymů, uplatňuje se u stabilizací struktur proteinů a má antioxidační účinky. Zinek stimuluje tvorbu osteoblastů a zároveň inhibuje diferenciaci osteoklastů, které odbourávají kostní tkáň. Zmírňuje také toxické dopady kovů, především kadmia. Bohatým zdrojem zinku je hovězí, obecně červené maso, mořští korýši a měkkýši. Obsah Zn v kosti odpovídá 100–148 mg/kg. Nedostatek zinku zapříčiňuje zpomalení osifikace a růstu kostí, ohýbání dlouhých kostí a další vývojové abnormality [20, 25].

Stroncium a baryum

Stroncium a baryum se v tělech organismů vyskytují z více než 90 % v kostní tkáni. Mají silnou afinitu k PO_4^{3-} a jsou v kostech vázány silněji než vápník. Základem působení stroncia spočívá v chemické podobnosti s vápníkem a schopnosti ho dokonce i nahradit

v samotném HAP. Postupně dochází ke snížení obsahu Sr a Ba v ekosystému přes různé úrovně potravního řetězce (hornina – půda – býložravci – masožravci). Do těla se tyto prvky dostávají z potravy a tím pádem jejich obsah determinuje půda, ze které potrava pochází. Díky této skutečnosti jsou poznatky o obsazích barya, stroncia a jejich izotopových poměrů s dalšími prvky přítomných kostech hojně využívány archeology k mapování výživy a mobility starověkých populací [14, 29].

Organické soli stroncia podporují proliferaci osteoblastů, mineralizaci a naopak inhibuje činnost osteoklastů. Přírodní hodnoty obsahu stroncia v kostech bývají v rozmezí 41,7– 81,7 mg/kg, u barya se jedná o hodnoty kolem 15 mg/kg. Míra zabudování Sr a Ba do kosti souvisí i s obsahem Ca v potravě. Studie prokázaly, že užívání stroncia snižuje riziko zlomenin a tím pádem slouží jako účinná léčba postmenopauzální osteoporózy. Za poslední léta ale vznikly obavy, že dlouhodobé užívání barya a stroncia zvyšuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění [15, 25, 26, 30].

Železo

Železo je mikroprvek nezbytný pro správnou funkci organismu. V dospělém lidském těle je celkem 3–5 g Fe a 60–70 % je vázáno hemoglobinem. Jeho důležitým úkolem je tedy transport molekulárního kyslíku krví do všech buněk organismu. Proteiny, kterých je železo součástí a mají k němu silnou afinitu (ferritin a hemosiderin), jsou zodpovědné za jeho ukládání v játrech, slezině a kostní dřeni [31].

V kostech je železo esenciální pro bezproblémovou funkci osteoblastů a je také součástí syntézy kolagenu. Hlavním zdrojem Fe je maso, některé vnitřnosti, vaječný žloutek a pšeničné otruby. V kostech bývá koncentrace železa v rozsahu 83,1–122,9 mg/kg. Nedostatek železa zapříčiňuje oslabení kostí, změny kostní mikroarchitektury a snižování obsahu minerálů. Jeho nadbytek negativně ovlivňuje metabolismus kostních buněk. To se projevuje stejným oslabením kosti jako při deficitu železa, osteoporózou, osteopenií a kosti jsou celkově velmi náchylné k lámavosti [15, 25, 31].

Měď

Téměř 70 % mědi vyskytující se v lidském těle se nachází ve svalech a kostře. Cu v organismu zastává funkci kofaktoru několika enzymů či se účastní oxidačně-redukčních procesů jako koenzym, který má na starosti regulaci metabolismu, transportu železa a metabolismu kolagenu. U savců je součástí procesu tvrdnutí kolagenu, keratinizace vlasů a srsti a správné depozice Ca a P v kostech. Mezi potravu bohatou na měď patří hovězí maso, ovčí játra, sušené ovoce, kešu a mořské plody. Měď se v kostech vyskytuje v přibližném obsahu 2,2 mg/kg. Mezi příznaky nedostatku Cu patří křehkost kostí, špatná mineralizace a osifikace, tedy příznaky podobné osteoporóze. Další nepříznivý účinek nedostatku mědi souvisí s poruchou funkce proteinu LOX (lysyl oxidáza), přičemž nedojde k tzv. cross-linkingu mezi kolagenem a elastinem a kost ztrácí svou pevnost. Vysoký obsah mědi zapříčiňuje křivici a řídnutí kostí, především u pacientů s Wilsonovou chorobou [15, 25, 31].

Chrom

Chrom se vyskytuje v přírodě především v oxidačních stavech Cr^{3+} a Cr^{6+} . Pro člověka je Cr^{3+} ve stopovém množství esenciální pro správný metabolismus a regulaci sacharidů. Naopak Cr^{6+} je toxický a do životního prostředí se dostává jako odpad textilního průmyslu, při spalování fosilních paliv nebo galvanickém pokovování. Podporuje kostní resorpci a způsobuje poruchy osifikace. Chrom se přirozeně vyskytuje v mase, vaječných žloutcích, dokonce i v zelenině a ovoci. V kostech se jeho koncentrace pohybuje okolo 0,465–0,785 mg/kg [15, 19, 25].

2.1.3.2 Kontaminanty kostní tkáně

Olovo

Přibližně 90 % celkového obsahu olova v organismu je uloženo právě v kostech. Kosterní materiál tedy může sloužit jako spolehlivý ukazatel případné Pb expozice. Olovo je vysoce toxický prvek ovlivňující funkci osteoblastů, osteoklastů a chondrocytů (buňky tvořící chrupavku). Olovnaté ionty Pb^{2+} mohou nahradit Ca^{2+} ve struktuře hydroxyapatitu a osteokalcinu. Tato substituce by mohla zhoršit rychlost vazby osteokalcinu na hydroxyapatit. Olovo se do organismu dostává například z lokalit, které jsou kontaminované z jeho těžby, stříbra či z tavení materiálů obsahující olovo. V běžném životě můžou být lidé vystaveni expozici olova při manipulaci se starším nádobím, které bylo glazováno olovnatou glazurou nebo při konzumaci vody protékající olovenými trubkami. Tento kontaminant se v kosti akumuluje a způsobuje problémy kostního metabolismu i po krátké expozici z okolí a jeho obsah v kosti setrvává i několik let. Intenzita a místa akumulace se liší v závislosti na funkci a struktuře kosti. Další faktor ovlivňující shromažďování olova je přítomnost kostní dřene, do které se olovo dostává pomocí krve. Pb způsobuje zpomalení mineralizace a růstu kosti, tím se snižuje hustota kostních minerálů a v nejzávažnějších případech dochází ke vzniku osteoporózy [25, 32].

Arsen

Arsen je prvkem jak esenciálním, tak toxickým. Esenciální je pro správný průběh metabolismu methioninu. Zdrojem As jsou pesticidy či metalurgické závody zpracovávající Pb, Cu a jiné kovy obsahující arsen ve svých rudách. V minulosti byl arsen ve formě oxidu arsenitého součástí rodenticidů, ve formě arsenitanů pak složkou barviv na tapety a textilní materiály. Arsen nahrazuje fosfor v kostní matrix, ve které je schopen se usadit na několik let. Bylo prokázáno, že otrava arsenem souvisí s poruchou metabolismu kosti a může vést k remodelaci kostí a jejich onemocnění [25, 33, 34].

Uran

Uran je všude přítomný prvek nacházející se na povrchu Země. Neletální dávky uranu narušují růst kostí, diferenciaci osteoblastů, endochondrální osifikaci a také zpomalují hojení alveolární kosti [25].

Nikl

Studie in vitro prokázaly, že vysoké koncentrace niklu působí jako inhibitory alkalické fosfatázy a mineralizace kostí [19]. Zdrojem jsou zejména průmyslové oblasti, kde dochází k zpracování niklových rud, Ni a jeho sloučenin [20].

2.1.4 Diagenéze

Proces diagenéze zahrnuje společné působení chemických, fyzikálních a biologických faktorů, jejichž výsledkem je transformace původní sloučeniny. U kosterního materiálu se jedná jak o změnu složky anorganické, tak organické. Začátek diagenéze je spojen s prvotní alterací kosti, která nastane díky geochemickým vlivům prostředí. Tato brzká fáze zahrnuje degradaci měkkých tkání (svalstvo a kůže) a kolagenu a také počáteční chemickou a strukturní změnu bioapatitu. Jakmile dojde k odstranění organických složek, kost se stane přístupnou pro okolní látky. Látky z okolního prostředí migrují do kosti a jejich ionty nahrazují ionty v původní struktuře bioapatitu a tím vytvoří její termodynamicky stabilnější formu. Pozdější fáze diagenéze spočívá v dalších strukturních a chemických úpravách bioapatitu za možného kompletního nahrazení původního bioapatitu a vytvoření nové apatitové fáze. Vlivem kyselého a velmi vlhkého prostředí dochází k rekrystalizaci hydroxyapatitu na minerál brushit v sekvenci hydroxyapatit → oktakalciumfosfát → brushit. V tomto případě pak dochází k rozpraskání kostní tkáně a rozpadu osteonů, jelikož jsou laminární krystaly brushitu větší než krystaly HAP. Diagenéze může trvat celá tisíciletí, dochází k fosilizaci a z recentní kosti se stává kost fosilní [35, 36].

Diagenézí mohou být do struktury bioapatitu inkorporovány nejrůznější prvky. Například kovy Fe, Al, Mn, Sr, a Mg, stejně jako prvky vzácných zemin, mohou nahradit vápník. Zdrojem kovů bývá půda, voda aj. a pak samotná výbava hrobů a rakve. Anaerobním rozkladem organických látek v uzavřených kovových rakvích vznikají organické kyseliny. Ty mohou zapříčinit rozpouštění kovů ze stěn rakve a jejich následné zabudování do kostí a záměnu vápníku jinými prvky, což může přispívat ke změně krystalické struktury kosti. Například na kostrách z olověných rakví byl nalezen minerál pyromorfit. Kontaminace některými kovy je dokonce okem rozpoznatelná. Při rekrystalizaci kosti v přítomnosti železa z železných předmětů hrobové výbavy a v anaerobním, kyselém prostředí (např. podmáčená půda) může vznikat minerál vivianit, který se oxidací na vzduchu zbarvuje světle modře. Mangan pocházející z půdy je zodpovědný za tmavé zbarvení kostí. Kontaminace mědí z hrobové výbavy se projevuje zeleným zbarvením kostí. Kontaminace vápníkem v krasových oblastech či spraších může vést k vysrážení uhličitanu vápenatého [21, 35, 36].

Hydroxylový ion může být substituován F^- či Cl^- . Vzniklý fluoroapatit je stabilnější než hydroxyapatit a to vede k jeho akumulaci v kostech. Inkorporace uhličitanového CO_3^{2-} iontu za fosforečnanový PO_4^{3-} či hydroxylový OH^- probíhá snadno, ale pouze v určitém rozmezí pH [21, 35].

2.2 Metody využívané k odstranění měkkých tkání z kostí

Pro analýzu kostí je často potřebné jejich úplné očistění od měkkých tkání. Například v archeologii je čistá lebka a pánevní kost důležitá ke správnému určení pohlaví, věku nebo demografických údajů. V prostředí forenzního vyšetřování je esenciální zřetelné zkoumání povrchu kostí z důvodu přítomnosti stop, které na kosti mohla zanechat vražedná zbraň.

Toto hojné zkoumání kostí v různých vědních disciplínách vedlo k rozvoji metod využívaných k přípravě kosterních pozůstatků na další analýzy [37].

Mezi nejpoužívanější techniky k likvidaci měkkých tkání patří konzumace tkání hmyzem, macerace ve vodě nebo anorganických a organických chemikáliích či pohřbení ostatků v půdě [38].

2.2.1 Kožojedi

Brouci čeledi *Dermestidae* (kožojedovití) jsou řazeny do nadčeledi *Bostrichoide*. Na území Česka a Slovenska je doposud známo 64 druhů kožojedů, ve střední Evropě je celkem druhů 78. Tělo kožojedovitých žijících na tomto území je drobné, oválné a častokrát hustě chloupkované. Většinou dorůstají maximální délky 1 cm s výjimkou některých druhů, které mohou být nepatrně delší. Každý druh má pak své charakteristické znaky. Je u nich také značná pohlavní dvojtvárnost neboli dimorfismus. K nejznámějším zástupcům patří kožojed obecný (*Dermestes lardarius*) či kožojed šedý (*Dermestes maculatus*) (obr. 3) [39].



Obr. 3: Dospělec Kožojeda šedého (*Dermestes maculatus*). Převzato z [40]

Kožojedi jsou význačnými škůdci v domácnostech, skladištích či muzeích. Jejich potravou bývá nejčastěji živočišná hmota typu maso, kůže nebo zbytky hmyzu [39]. Larvy brouků stráví větší množství měkkých tkání než samotný dospělec [41].

Zprvu byli kožojedovití brouci vnímáni zcela negativně, pouze jako ničitelé. Jejich destruktivní činnost se ale postupem času stala výhodnou právě při čištění ostatků od měkkých tkání [41]. Nedochozí totiž k poškození DNA a povrchu kostí jako u jiných metod a zároveň by její provedení nemělo být složité [42] [41].

Kolonie kožojedů se nejčastěji uchovává v nádobě na tmavém místě. Optimální teplota jejich chovu se pohybuje v rozmezí 21–29 °C. Nevýhodou této metody je její delší časový průběh. Celý proces může trvat od několika dní až týdnů v závislosti na velikosti ostatků [41].

2.2.2 Pohřbení

Pohřbení ostatků do půdy může sloužit jako jednoduchý a levný nástroj k odstranění měkkých tkání z kostí. K dekompozici tkání dochází díky aktivitě bakterií spolu s masožravým hmyzem [41]. Po vyjmutí z hlíny mívá kost často nahnědlou barvu, jinak ale nedochází k žádnému popraskání či jinému poškození [43]. Tato metoda je používána minimálně, protože je časově náročná a je doprovázena nepříjemným zápachem, který vzniká při bakteriálním rozkladu [41, 43].

2.2.3 Macerace

Oblíbenou metodou k přípravě kosterních vzorků je macerace, což je obecně proces, při kterém je látka ponořena do vodného roztoku za účelem rozkladu [44]. Nejjednodušší aplikací je máčení kostí ve vodě při určité teplotě za účelem rozložení měkkých tkání, které je zapříčiněno množением bakterií [41]. Jelikož macerace v čisté vodě není časově efektivní, přidávají se do vody různá aditiva, která ji dokáží urychlit. Mezi tato aditiva nejčastěji patří enzymy, detergenty a další chemikálie. Dalším faktorem, který napomáhá k urychlení macerace je zahřívání roztoku na vyšší teplotu [44]. Celý proces může být usnadněn tzv. fyzickou macerací, kdy člověk odstraní část tkáně pomocí skalpelu či pinzety jak před samotným vložením vzorku do roztoku, tak i v průběhu macerace. Práce s těmito nástroji by měla být velmi opatrná, aby nedošlo k poškození kosti [45].

2.2.3.1 Enzymatická macerace

Trypsin, pepsin nebo papain se řadí mezi často užívané enzymy při enzymatické vodní maceraci. Při optimální konstantní teplotě (40 °C–60 °C) roztoku jsou enzymy schopny rozložit měkkou tkáň za necelých 48 hodin, někdy dokonce jen za 24 hodin. V průběhu ale vzniká silný nepříjemný zápach a navíc manipulace s práškovou formou enzymů přináší zdravotní rizika, jelikož jejich inhalace způsobuje podráždění dýchacích cest [41, 45].

Vodný roztok proteázy a lipázy se jeví jako šetrnější a rychlejší způsob macerace. Pro maximální efektivnost je důležité zachování správného poměru těchto dvou enzymů. Lipáza se podílí na štěpení tuků a proteáza na štěpení proteinů. Při optimální teplotě 60 °C se pohybuje celkový čas macerace v průměru okolo 3 až 5 hodin. Tento typ enzymatické macerace probíhá bez jakéhokoliv zápachu a poškození kosti [46].

2.2.3.2 Macerace v roztoku detergentu

Macerace s použitím detergentu je srovnatelná s macerací enzymatickou, jelikož většina těchto prostředků obsahuje enzymy. V tomto případě se ale jedná o tzv. biologické enzymy, které jsou bezpečné a zdraví nezávadné [47].

Detergent je prací a čisticí prostředek, který nejčastěji obsahuje povrchově aktivní látky, antiredepoziční látky, alkálie, bělidla a již zmiňované enzymy. Nepříjemný odér, který vzniká u enzymatické macerace, je díky parfemaci čisticích prostředků značně eliminován [47]. Využívají se čisticí prostředky do pračky a myčky, nejvíce značky Ariel, Persil či Daz, které jsou dostupné v supermarketech a drogeriích po celém světě [37].

Macerace probíhá ve vodě s rozpuštěným detergentem při teplotách 40 °C až 60 °C, přičemž macerace při vyšší teplotě se prokázala jako rychlejší. Čas macerace byl v rozmezí od 24 hodin do 72 hodin v závislosti na velikosti ostatku [37, 47].

2.2.3.3 Macerace v roztoku hydroxidu sodného

Hydroxid sodný jakožto žíravina funguje v rozkladu tkání účinně. Aby byla degradace šetrnější, využívá se 3% nebo 5% roztoku hydroxidu sodného. Vzorky byly v hydroxidu macerovány po dobu 6 a 7 hodin na přímém slunci. Čisté kosti byly po vyjmutí z roztoku zabarveny do hněda a některé i popraskaly. Této skutečnosti by se dalo předejít použitím roztoku s nižší koncentrací [43].

2.2.3.4 Macerace v bělidle

Bělidlo je hojně užívané na čištění díky svým dezinfekčním a bělicím účinkům, za které je zodpovědný chlornan sodný. K rozkladu měkkých tkání lze použít čisté bělidlo či jeho vroucí vodný roztok. V obou případech se jedná o rychlý proces trvající desítky minut a častá kontrola je esenciální [44]. Kost se nesmí v bělidle ponechat příliš dlouho, jinak by mohlo dojít ke vzniku bílých skvrn na jejím povrchu, což by to znamenalo, že bělidlo začalo narušovat i samotnou kost. Tato metoda je tedy efektivní, ale musí být prováděna se značnou opatrností [48].

2.3 Metody analýzy kosterních pozůstatků

Pro studium prvkového složení kosti je zapotřebí vybrat vhodnou analytickou metodu, která je schopna analyzovat vzorky nejlépe v pevném skupenství a zároveň je dostatečně citlivá a přesná. Využít se dá analýzy roztokové či pevné. Pro prvkovou analýzu roztoků se často využívá optických metod atomové spektroskopie – atomové absorpční spektrometrie (Atomic Absorption Spectrometry, AAS) a optické emisní spektrometrie (Optical Emission Spectroscopy, OES). Roztoková analýza má ale velkou nevýhodu v nutnosti převádění vzorku do roztoku a s tím spojené případné kontaminace při přípravě [49].

Proto se raději využívá metod, které jsou schopny přímé stopové analýzy pevného materiálu a navíc poskytnou informace o přesné distribuci prvků ve vzorku. Mezi takové metody patří laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, LA-ICP-MS), spektrometrie laserem buzeného plazmatu (Laser Induced Breakdown Spectroscopy, LIBS) rentgenová fluorescenční spektrometrie (X-ray Fluorescence, XRF), Ramanova spektroskopie (Raman Spectroscopy, RS), elektronová mikrosonda (EPMA, Electron Probe MicroAnalysis) a infračervená spektroskopie (Infrared Spectroscopy, IR).

2.3.1 Ramanova spektroskopie

Při Ramanově spektroskopii dochází k ozařování vzorku fotony, jejichž zdrojem bývá nejčastěji laserový paprsek. Principem metody je měření rozptýleného záření, které vzniká interakcí fotonu s molekulou vzorku a současně dochází ke změně jejich vibračních a rotačních stavů [50, 51]. Ramanův spektrometr tvoří zdroj záření, místo pro vzorek, sběrná optika s filtry a detektor [52].

Jedná se účinnou kvalitativní a kvantitativní analytickou metodu, která je schopna rychle a efektivně určit složení látek. Technika je nedestruktivní a vzorek se před ní nemusí nijak upravovat. Používá se k analýze jak minerální, tak organické složky kostí a zubů a určení jejich prvkové distribuce a stupně mineralizace [53]. Pomocí měření spekter v jednotlivých bodech rozsázených do mřížky přes vzorek lze získat mapu celého vzorku v prostorovém rozlišení cca 1 μm [50]. Mobilní Ramanovy spektrometry jsou za pár sekund schopny identifikovat neznámé látky, drogy, potraviny atd. a jsou proto využívány záchrannými a ochrannými složkami.

2.3.2 Infračervená spektroskopie

IČ spektroskopie je založena na interakci infračerveného záření s molekulou vzorku. Energie fotonů IČ záření většinou nestačí k excitaci elektronů v molekule vzorku, ale způsobuje změny vibračního či rotačního stavu molekuly. Příslušným vibračním a rotačním přechodům odpovídá příslušná hodnota energie, která je charakteristická pro různé skupiny atomů. Na základě této vlastnosti získáváme informace pro kvalitativní analýzu. Jedna z možných konstrukcí spektrometru může být tvořena zdrojem záření, zrcadly, prostorem pro kyvetu se vzorkem, monochromátorem, detektorem a vyhodnocovací zařízením [51].

Je to metoda kvantitativní i kvalitativní, schopná analyzovat vzorky všech skupenství a využívaná především ke strukturní analýze a identifikaci anorganických a organických. Při analýze kvality kostí se uplatňuje především IČ spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR spektrometrie), která dokáže poskytnout informace o následujících vlastnostech kosti: zralost kolagenu, poměr minerálů/kostní matrix a poměr zralost/krystalinita kosti [51, 54]. 2D imaging funguje stejným způsobem jako u Ramanovy spektrometrie, akorát v horším prostorovém rozlišení (5–10 μm) [50].

2.3.3 Elektronová mikrosonda

Elektronová mikroanalýza funguje na principu dopadu urychlených elektronů na vzorek a následného vyzáření rentgenového záření. Pevný materiál je bombardován urychleným fokusovaným svazkem elektronů, který má dostatečnou energii k uvolnění jak hmoty, tak energie ze vzorku. Dochází tedy hlavně k uvolnění tepla a emisi sekundárních elektronů a RTG záření. Elektronová mikrosonda se skládá ze zdroje elektronů (wolframová katoda), optiky, komory pro vzorek, mikroskopu a detektor RTG záření [55].

Výsledkem analýzy je získání kvantitativních a kvalitativních informací o vzorku i možnost 2D imagingu. Je schopna detekovat skoro všechny prvky až na ty nejlehčí – H, He a Li. EPMA je hojně využívána na analýzu geologických materiálů, syntetických materiálů a i kostí [55].

2.3.4 Rentgenová fluorescenční spektrometrie

XRF je analytická metoda založená na měření charakteristického rentgenového záření vzbuzeného ozařováním vzorku rentgenovým či γ zářením. Díky vysoké energii záření dochází k vyrazení elektronu ze slupky atomu (většinou ze slupky K) a kvůli vzniklé nestabilitě následně elektrony z vyšších slupek přeskočí na volná místa. Při přeskoku dojde k vyzáření energie, jejíž hodnota je charakteristická pro každý prvek. Z výsledného spektra lze získat

jak kvalitativní, tak kvantitativní informace. Zařízení tvoří rentgenka, detektor a spektrometr [56, 57].

Jedná se o metodu nedestruktivní, která je schopna analyzovat kapalné i pevné vzorky. Limity detekce se pohybují okolo jednotek $\mu\text{g/g}$, u nejlehčích prvků jsou limity vyšší. Co se analýzy kostí týče, nejnovější články poukazují na využití XRF především při sledování distribuce prvků – hlavně olova [57–59]. Mobilní XRF analyzátory jsou hojně využívané například pro analýzu výtvarných děl *in situ*, jelikož rychle a spolehlivě poskytují informace o chemickém složení pigmentů bez nutnosti odběru vzorku [56].

2.3.5 Spektrometrie laserem buzeného plazmatu

LIBS je forma atomové emisní spektroskopie (AES) využívající laserový pulz jako budící zdroj. Při interakci vzorku s laserovým paprskem, laserové ablací, dochází k přenosu zářivé energie, odpaření materiálu a odštěpení částic z povrchu vzorku. Vzniká laserem indukované mikroplazma, v němž dochází k excitaci ablatovaného atomizovaného materiálu vzorku. Měření emitovaného záření poté probíhá pomocí optického spektrometru. Jedná se o metodu kvalitativní a při provedení správné kalibrace je možné ji použít i pro analýzu kvantitativní [60].

Aparatura pro LIBS je tvořena laserem, optickým systémem, ablační komorou s posuvnou platformou a spektrometrem. Přesné zaměření paprsku laseru mají na starosti zrcátka a čočky odolná proti ablací [60].

Metoda LIBS má široké uplatnění při identifikaci nejrůznějších materiálů. Nedochozí při ní k destrukci materiálu, tudíž se využívá ke kvalitativní analýze předmětů kulturního dědictví (malby, keramika, kůže, kost atd.) z archeologických vykopávek. Může se stejně jako LA-ICP-MS využít pro tvorbu 2D a 3D map povrchů vzorků [60, 61].

LIBS slouží k analýze jak pevných materiálů, tak kapalných i plyných. Mezi hlavní výhody této techniky patří přímá a rychlá analýza vzorků bez jakékoliv úpravy vzorku. Naopak není možné stanovit prvky obsažené ve stopovém množství, jelikož se meze detekce pohybují v řádech jednotek až stovek mg/kg . [60, 61].

2.3.6 LA-ICP-MS

LA-ICP-MS je účinná kvalitativní i kvantitativní technika pro měření prostorové distribuce prvků ve vzorcích. Metoda umožňuje jejich lokální mikroanalýzu i mapování. Kromě nízkých detekčních limitů je její velkou předností také schopnost přímé stopové analýzy pevných vzorků bez nutnosti převádění do roztoku, čímž se omezí případné přípravy a kontaminace. Využití tedy nachází například při analýze pevných geologických, archeologických, forenzních či environmentálních vzorků [49].

Ve srovnání s ICP-OES je technika ICP-MS schopna stanovovat jak prvky, tak i jejich izotopy. Charakteristické jsou pro tuto metodu také velmi nízké meze detekce, a to až o 3 řády nižší (ng/l – $\mu\text{g/l}$) než u ICP-OES. [57].

2.3.6.1 Laserová ablace

Explozivní působení laserového paprsku a zkoumaného vzorku lze označit jako laserovou ablací. Při této interakci se přenáší zářivá energie zaostřeného paprsku pulsního

laseru na vzorek, což má za následek odštěpení atomů, iontů, molekul a fragmentů molekul z povrchu vzorku [62].

Jedná se o destruktivní vzorkovací techniku, která tímto způsobem umožňuje analýzu pevných materiálů. Pomocí laserového paprsku dojde k odběru malého množství (μg nebo pg) materiálu z povrchu vzorku, čímž se vytvoří ablační kráter. Výběr laserového zařízení, matrice, odolnost samotného vzorku a celá řada dalších faktorů mají vliv na velikost vzniklého ablačního kráteru. Většinou je jeho velikost vzhledem k velikosti vzorku zanedbatelná [63].

Ablační systém se typicky skládá z laseru, čočky, ablační cely s posuvnou platformou umožňující posun vzorku po osách x a y a detekčního systému. Bývá často vybaven i CCD kamerou pro snímání obrazu povrchu vzorku [64].

Paprsek laseru vstupuje přes křemenné okénko do ablační komory s analyzovaným vzorkem. V minulosti se využívaly lasery rubínové, od kterých se v současné době přešlo k pevnolátkovým laserům yttrium-aluminiového granátu s příměsí neodymu (Nd:YAG) či plynovým laserům excimerovým. Základní vlnová délka pevnolátkového Nd:YAG laseru se nachází v blízké IČ oblasti při 1064 nm. Tento typ laseru je také hojně využíván díky své snadné údržbě a příznivé ceně [49, 62].

Ablatovaný materiál lze poté pomocí nosného plynu (Ar a He) přenést do ICP spektrometru. Během procesu samotné laserové ablace nebo přenosu aerosolu do ICP ulpíváním částic v trubicích či v ICP může dojít k frakcionaci. Tento jev se projevuje vznikem nestabilního signálu a s ním nereprezentativního vzorku. Frakcionaci můžeme omezit například využitím laserů s vlnovou délkou pod 200 nm, jelikož generují zcela ionizovatelné částice, které jsou svou velikostí reprezentativní pro ablatovaný vzorek [49, 62].

Vzorek může být analyzován buď bodově, nebo pomocí liniového skenu. U obou případů se jedná o tzv. mapování. Při liniovém skenu doprovází laserovou ablaci pohyb vzorku. Bodová analýza spočívá v ablaci pouze konkrétních míst vzorku, které jsou předmětem zájmu, a takových bodů může být po vzorku několik. Výsledkem je 2D mapa znázorňující distribuci prvků ve vzorku. Pokud je do jednoho bodu puštěno více laserových pulzů za sebou, hovoří se o tzv. hloubkovém profilování, které poskytuje informace o dílčích vrstvách vzorku (3D mapa) [63].

2.3.6.2 ICP-MS

Princip této metody je založen na měření toku atomárních iontů z ionizačního zdroje ICP (indukčně vázané plazma) [57]. Plazma je kvazineutrální plyn nabitých a neutrálních částic vykazujících kolektivní chování. Tyto volné nosiče náboje mohou reagovat na elektrická a magnetická pole a jejich vzájemná interakce poté vede k vytvoření globálních kolektivních polí. Plazma je považováno za čtvrté skupenství hmoty. [65].

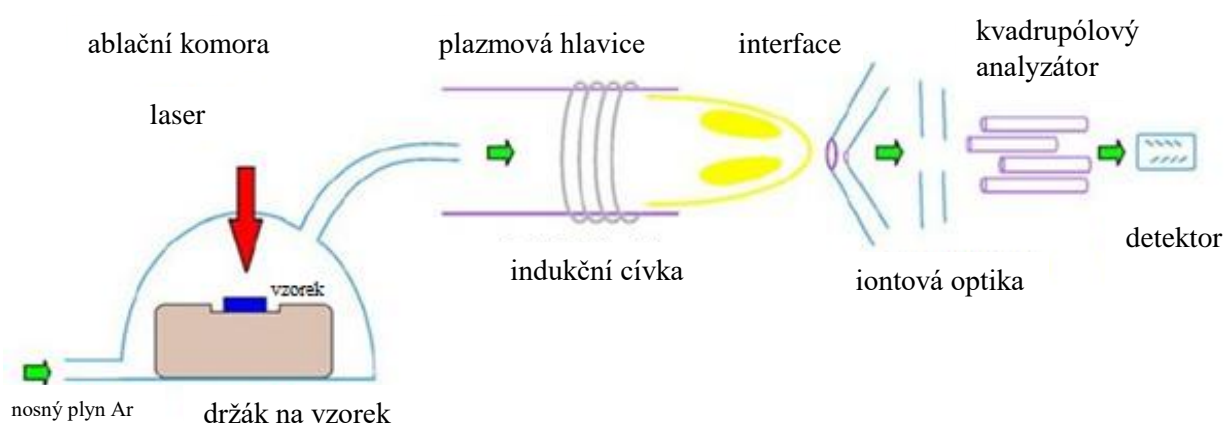
ICP-MS spektrometry zahrnují zařízení pro přívod analyzovaného vzorku, iontový zdroj, rozhraní mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem, iontovou optiku, analyzátor, detektor, vakuový systém a řídicí jednotku. Díky možnosti výběru vhodné vzorkovací techniky se dají analyzovat kapalné, plynné i pevné látky [57, 65].

Dochází ke vnášení částic analyzovaného vzorku do plazmového hořáku, ve kterém je ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli udržováno argonové plazma o vysoké teplotě (6000–10000 K). Aerosol vzorku je vysušen, vypařen a následně účinně atomizován

a ionizován. ICP představuje účinné atomizační prostředí a ionizace probíhá přednostně do prvního stupně, s téměř 100% účinností [65, 66].

Takto upravený vzorek putuje z oblasti atmosférického tlaku přes rozhraní, tzv. interface, do vakua hmotnostního spektrometru s elektromagnetickými čočkami. Fokuzovaný svazek iontů z iontové optiky je poté rozdělen v hmotnostním spektrometru podle poměru hmotnosti iontu a jeho náboje (m/z) díky působení elektrického nebo magnetického pole, či obou polí zároveň. Existují 3 typy analyzátorů – průletový analyzátor (separace iontů podle m/z v čase), sektorový analyzátor (rozdělení iontů podle m/z v prostoru) a kvadrupólový analyzátor, který povolí průchod pouze iontům o určitém poměru m/z [65].

Ionty po průletu analyzátozem dopadají na detektor, který převede proud iontů na elektrický signál. V hmotnostních spektrometrech se jako detektor využívá například Faradayův kelímek, který je sice konstrukčně jednoduchý, ale má velkou časovou konstantu a nízkou citlivost. Elektronové násobiče s kontinuální či diskrétní dynodou mají na rozdíl od Faradayova kelímku relativně krátkou časovou konstantu a vysokou citlivost, avšak nevýhodou je jejich krátká životnost [65]. Schéma laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu je zobrazeno na obr. 4.



Obr. 4: Schéma LA-ICP-MS. Převzato a upraveno z [65].

2.3.6.3 Interference

Výsledné hmotnostní spektrum by mělo v ideálním případě poskytovat informace pouze o zkoumaných analytech, které byly získány atomizováním vzorku a ionizací do prvního stupně. Metoda ICP-MS ale není dokonalá a stále zde hrají svou roli interference, které ovlivňují správnost a preciznost měření. Ty se dělí na nespektrální a spektrální.

Nespektrální interference

Nespektrální interference jsou dány maticí vzorku. Jsou ovlivňovány celou řadou parametrů ICP – konstrukcí a frekvencí oscilátoru, konfigurací plazmové hlavice, složením a průtoky plynů, příkonem do plazmatu a zobrazením výboje a výškou pozorování. Nejčastějšími interferenty ovlivňujícími odezvu přístroje, bývají snadno ionizovatelné prvky (Li, Na, K atd.) obsažené v matici nebo minerální kyseliny, které byly použity při přípravě vzorku. Rušivé vlivy těchto interferencí lze odstranit přibližným modelováním kalibračních roztoků (kvantifikací) a použitím porovnávacího prvku (vnitřního standardu) [67].

Spektrální interference

Pokud má interferující částice stejnou hodnotu m/z jako izotop analyzovaného prvku, hovoří se pak o interferenci spektrální, též nazývanou izobarická. Podle typu interferující částice ji dělíme na interferenci atomární, polyatomickou a interferenci dvojnásobně nabitých iontů [68].

Ke stanovení je vždy snaha zvolit nejvíce zastoupený izotop daného prvku, což bohužel není vždy možné, protože při dané hmotnosti může docházet k interferenci s izotopem jiného prvku. Nejvýznamnějším případem atomární interference je interference při hmotnosti 40, která odpovídá hlavnímu izotopu $^{40}\text{Ca}^+$ (zastoupení 96,9 %), ale i $^{40}\text{Ar}^+$ (99,6 %), který pochází z plazmového plynu. Tato skutečnost znemožňuje použití $^{40}\text{Ca}^+$ pro všechna stanovení. Tyto interference je možné eliminovat nahrazením problémového izotopu jiným. Místo $^{40}\text{Ca}^+$ by se tedy použil alternativní izotop $^{42}\text{Ca}^+$ (0,65 %), $^{43}\text{Ca}^+$ (0,14 %) nebo $^{44}\text{Ca}^+$ (2,09 %). Alternativní izotop má ale většinou nižší zastoupení a to vede ke zhoršení meze detekce. Mezi další způsoby eliminace řadíme matematickou korekci či výběr spektrometru s lepším rozlišením [68].

Polyatomické interferenty vznikají v plazmatu kombinací různých iontů různého původu (pracovní plyny – argon; matrice vzorku a rozpouštědla). Tyto interference jsou založeny na pravděpodobnosti srážek jednotlivých iontů v plazmatu. Příkladem takového interferentu je například kombinace argonu a kyslíku a tvorba aduktu $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, který interferuje s dominantním izotopem železa $^{56}\text{Fe}^+$. Tvorba polyatomických interferencí může být snížena energií dodávanou do plazmatu a správnou volbou vzdálenosti plazmové hlavice od vstupu do hmotnostního spektrometru. K eliminaci těchto interferencí se používá volba alternativního izotopu, sektorový spektrometr s dvojitou fokusací vyznačující se lepším rozlišením, využívá se i tzv. „studeného plazmatu“ nebo kolizně-reakční cely (CRC) [68].

CRC se nachází v kvadrupólovém ICP-MS za iontovou optikou před vstupem do kvadrupólového filtru. Tvoří ji 4, 6 nebo 8 elektrod, na které je přiváděno radiofrekvenční napětí a prostor mezi nimi je naplněn pracovním plynem. Eliminace interferencí funguje na principu srážek interferujících iontů s atomy inertního plynu (He), což vede ke ztrátě jejich kinetické energie. Tento způsob nazýváme jako diskriminace kinetickou energií. Díky poklesu energie neprojdou přes potenciálovou bariéru a zůstanou zachyceny v kolizní cele. Dochází i ke srážkám iontů analytu s atomy He, ale jelikož jsou výrazně menší než polyatomické ionty, srážky nejsou tak početné a pokles jejich kinetické energie není tak výrazný jako u interferentů a ionty analytu tedy projdou přes bariéru do analyzátoru. Další způsob funguje na stejném principu s pomocí potenciálové bariéry, rozdíl je jen v tom, že mezi interferujícím iontem a reakčním plynem dochází k chemické reakci a tím vznikne částice s nižší energií a poměrem m/z , která poté neprojde přes bariéru. Použití CRC k odstranění interferencí je účinné, ale není stoprocentní a analýza se tím stává méně citlivou [66, 68].

K tvorbě vícenásobných iontů může docházet, pokud má prvek hodnotu druhého ionizačního potenciálu nižší než je ionizační energie argonu (16 eV). Tyto interferenty se v hmotnostním spektru projevují píkem v polovině hmotnosti daného izotopu – $^{138}\text{Ba}^+$ se objeví jako pík s hmotností 69. Jejich tvorbu se daří potlačit stejně jako u polyatomických interferencí nižším příkonem do plazmatu nebo vhodnou volbou vzdálenosti plazmové hlavice od vstupu do hmotnostního spektrometru [68].

2.3.6.4 Aplikace LA-ICP-MS

LA-ICP-MS nachází díky své schopnosti provádět citlivé prvkové a izotopové analýzy přímo na pevných vzorcích širokou škálu využití. Jedná se především o analýzy archeologického, geologického či biologického materiálu [63].

V oblasti environmentální chemie se využívá k monitorování změn a kontaminací v atmosféře a půdě skrze analýzu stromů, přesněji jejich letokruhů. Díky této aplikaci můžou vědci zpětně popsat vývoj kontaminací v různých oblastech [64, 69]. Analýza mušlí a korálů nám poskytuje informace o změnách vlastností mořských vod. Při růstu korálů dochází k postupné kalcifikaci a případnému ukládání prvků, které se vodě nachází díky znečištění. Jejich prostorovou analýzou jde tedy zjistit, k jakým změnám ve vodě docházelo v průběhu určité doby [64].

V archeologii a geologii je důležité, aby při analýze nalezeného materiálu nedošlo k výraznému poškození. Častokrát bývá nalezený materiál ve velmi malém množství, což pro metodu LA-ICP-MS také není žádný problém. Lze tedy jednoduše určit složení, původ a datování archeologických vzorků v závislosti na obsahu izotopů. Také díky této technice můžeme ověřovat pravost drahých kamenů či stříbra a jiných kovů například při padělání starožitností [64, 70].

Kosterní a zubní materiál slouží jako úložiště velké řady prvků, k jejichž ukládání dochází v průběhu celého života. Přítomnost těchto prvků poskytuje informace o výživě, s tím spojeném potravním řetězci a migraci zvířat a lidí. Původ vzorku lze určit podle obsahu stroncia, které se do kostí a zubů dostává z půdy přijímanou potravou [63]. V kostech se mohou také akumulovat prvky kontaminující životní prostředí. Díky 2D-zobrazování prvkové distribuce v kostech pak mohla být lépe pochopena například souvislost mezi zahynutím orlů a labutí a jejich vystavení olovem znečištěnému prostředí [32].

LA-ICP-MS bylo rakouskými vědci využito například i k ověření pravosti kostí, zubů a vlasu, které měly údajně patřit Mozartovi, ale DNA analýza to nebyla schopna potvrdit. V rámci studie se snažili porovnat obsahy vybraných prvků (Pb, Cr, Hg, As a Sb) v ostatcích údajného Mozarta s ostatky soudobých lidí žijících na stejném území, které byly uloženy v muzeu. Bohužel se ale domněnka o původu pozůstatků nepotvrdila, jelikož se výsledky analýz napříč vzorky lišily a nešlo tedy ani s jistotou určit, že se jedná o kosti ze stejné doby [71].

V oblasti medicíny byla metoda využita například na identifikaci a lokalizaci depozic krystalů fosforečnanu vápenatého v kolenních kloubech zasáhnutých osteoartritidou. Informace o distribuci prvků v nemocné kosti napomáhá lékařům k lepšímu pochopení kostních onemocnění [72].

Přesné složení rostlin závisí na konkrétní lokalitě jejich výskytu. Pomocí LA-ICP-MS je možno složení určit a vzorek přímo spojit s určitým místem. Tento fakt může být velmi nápomocný ve forenzních vědách, například při zjišťování původu marihuany či jiných drog [64]. Další využití nachází i v potravinářství při analýze olivového oleje či másla na přítomnost těžkých kovů, které se do potravin mohou dostat při výrobě [73].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

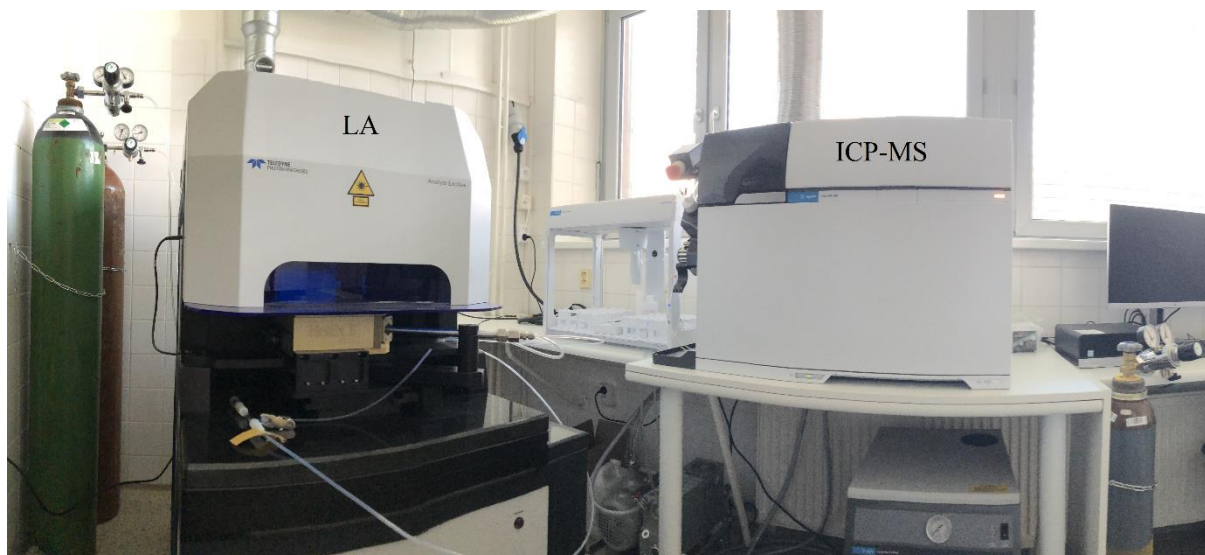
3.1 Použité chemikálie a certifikované referenční materiály

- Argon ($\geq 99,996$ %, SIAD, Česká republika)
- Dusík ($\geq 99,9$ %, SIAD, Česká republika)
- Helium (99,998 %, SIAD, Česká republika)
- Premix ArF (Linde, Spolková republika Německo)
- NaOH p.a. (98 %, PENTA, Česká republika)
- Savo Prim Svěží vůně (Unilever, Česká republika)
- Somat: Excellence kapsle 4 v 1 (Henkel, Česká republika)
- mQ voda
- Thiosíran sodný (18 mg/l, VWR, Spojené státy americké)
- Aka-Cure Slow-2 (Akasel, Dánsko)
- Standardní referenční materiál NIST 610 (National Institute of Standards and Technology, Spojené státy americké)
- Standardní referenční materiál NIST 612 (National Institute of Standards and Technology, Spojené státy americké)
- Standardní referenční materiál NIST 1468 (National Institute of Standards and Technology, Spojené státy americké)

3.2 Použité pomůcky a přístroje

- Polypropylenové uzavíratelné nádoby
- Běžné laboratorní vybavení (plastová pinzeta, plastová lžička, Petriho miska atd.)
- **Academic Milli-Q** (EMD Millipore Corporation, Německo) – přístroj pro přípravu mQ (deionizované) vody
- **Ceran 500** (Harry Gestigkeit GmbH, Německo) – topná deska
- **CitoVac** (Struers, Spojené státy americké) – vakuová komora využívaná pro snadné zalívání forem s pórovitými vzorky (kost) epoxidovou pryskyřicí
- Brusné SiC papíry o zrnitosti 60, 280, 600, 2500 a 4000
- **Kompakt 1031** (MTH Hrazdil s.r.o., Česká republika) – metalografická bruska na broušení a následné leštění nábrusů
- **Analyte Excite+** (Teledyne CETAC Technologies, Spojené státy americké) – laserový ablační systém (*obr. 5*) obsahující excimerový ArF laser, který emituje laserové záření o vlnové délce 193 nm s délkou pulzu <4 ns. Systém je ovládán počítačem přes aplikaci Chromium. Díky kameře je možné sledování vzorku v reálném čase. Program také umožňuje nastavení parametrů jako například hustoty zářivé energie ($1\text{--}15$ J/cm²), průměr laserového svazku ($1,0\text{--}245\mu\text{m}$) a frekvence ($1\text{--}300$ Hz). Vzorek pak může být analyzován bodově, liniovým skenem nebo složitějšími vzorci. Systém také obsahuje ablační celu HelEx II a je zcela kompatibilní s ICP hmotnostním spektrometrem (Agilent 7900 ICP-MS), se kterým je propojena polyuretanovými hadičkami.
- **Agilent 7900 ICP-MS** (Agilent Technologies, Inc., Spojené státy americké) – hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (*obr. 5*), do kterého jsou částice vzorku vnášeny po laserové ablaci. Pomocí radiofrekvenčního generátoru, o výkonu $500\text{--}1600$ W, se v plazmové křemenné hlavici (s průměrem injektoru $2,5$ mm) tvoří plazma. Interface je složen z vnějšího kužele (sampleru) o průměru 1 mm

a kužele vnitřního (skimmeru) o průměru 0,45 mm). Za rozhraním je iontová optika, kterou tvoří extrakční a mimoosá čočka. Následuje zařízení pro minimalizaci interferencí – oktapólová kolizně-reakční cela s tokem helia (1–12 ml/min). Jako hmotnostní analyzátor je využit hyperbolický kvadrupól s rozsahem 2–160 atomových hmotnostních jednotek, který separuje ionty podle m/z a dosahuje vysoké citlivosti. K detekci iontového toku slouží elektronásobič, který pracuje v pulzním a analogovém režimu. Vakuum je v MS zajištěno turbomolekulárním čerpadlem.



Obr. 5: Laserový ablační systém Analyte Excite+ (vlevo) a ICP spektrometr Agilent 7900 (vpravo).

Autor: doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.

3.3 Vzorky

Zkoumanými vzorky byly řezy kostí srnců obecných, žijících na Příbramsku nebo v Liptovské Lúžni. Jednalo se o část končetin – srostlé nártní kosti 3. a 4. prstu a články prstů. Kost z Příbramska byla poskytnuta Ing. Františkem Chytkou, jednatelem Městských lesů Příbram. Kost z Liptovské Lúžně poskytlo Poľovnícke združenie SALATÍN. Vzorky a jejich označení jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Seznam vzorků

Lokalita	zvíře	označení	vzorky
Příbramsko	srnec obecný	S3	S3_1
			S3_2
			S3_3
			S3_4
Liptovská Lúžna	srnec obecný	S4	S4_1
			S4_2*
			S4_3
			S4_4
			S4_5

*vzorek nebyl analyzován z důvodu absence páte macerační metody

3.3.1 Příbramsko a Liptovská Lúžna

Příbramsko je lokalita známá pro svou rozsáhlou historii v těžebním průmyslu. V minulosti se zde těžily a tavily vzácné kovy (Ag, Au), U, Ni, Mn a rudy obsahující Pb, Zn, Sn, Cu, Sb, Bi. Sám těžební průmysl a s ním spojené vzniklé odpady jsou důvodem, proč je Příbramsko jednou z nejvíce těžkými kovy kontaminovanou oblastí České republiky a jejich obsahy často přesahují povolené meze. Například v roce 2020 dosahovaly naměřené obsahy olova v půdě hodnot v rozmezí 55–9241 mg/kg. Co se arsenu týče, naměřené obsahy se pohybovaly v rozsahu 9–1249 mg/kg. Mezní hodnoty obsahů olova a arsenu v půdě jsou 60 a 20 mg/kg, což naměřené hodnoty značně přesahují [74–76].

Liptovská Lúžna není těžební oblastí, a proto byla zvolena jako oposit Příbramska. Doposud nevyšly ani žádné studie pojednávající o jejím znečištění, a proto je pro účely této práce považována za oblast čistou, bez známých kontaminací.

3.4 Příprava vzorků

Jelikož byly končetiny poskytnuty ve svém původním stavu (*obr. 6*), bylo zapotřebí provést důkladnou preparaci a kosti oddělit od měkké tkáně se srstí.



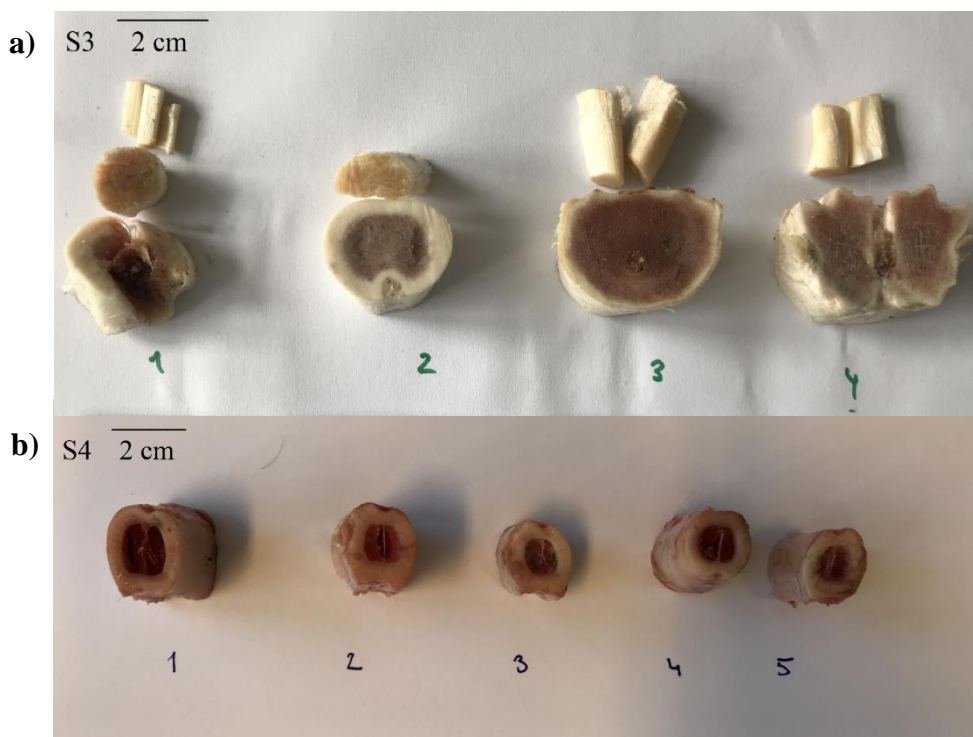
Obr. 6: Končetiny srnce obecného, a) z Příbramska (označení S3), b) z Liptovské Lúžně (označení S4).

Aby mohlo být odzkoušeno více maceračních technik, byly končetiny nařezány pomocí pilky do příčných řezů o šířce cca 2 cm (obr. 7). Končetina byla nařezána postupně od původního řezu nártní kosti směrem ke článkům prstů a jednotlivé řezy na sebe navazují.



Obr. 7: Příčné řezy kosti srnce obecného, a) srnec S3, b) srnec S4.

Takto nařezané vzorky kostí byly zbaveny srsti a části měkkých tkání pomocí skalpelu a pinzety (obr. 8). Poté byly skladovány v PE sáčcích v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího zpracování.



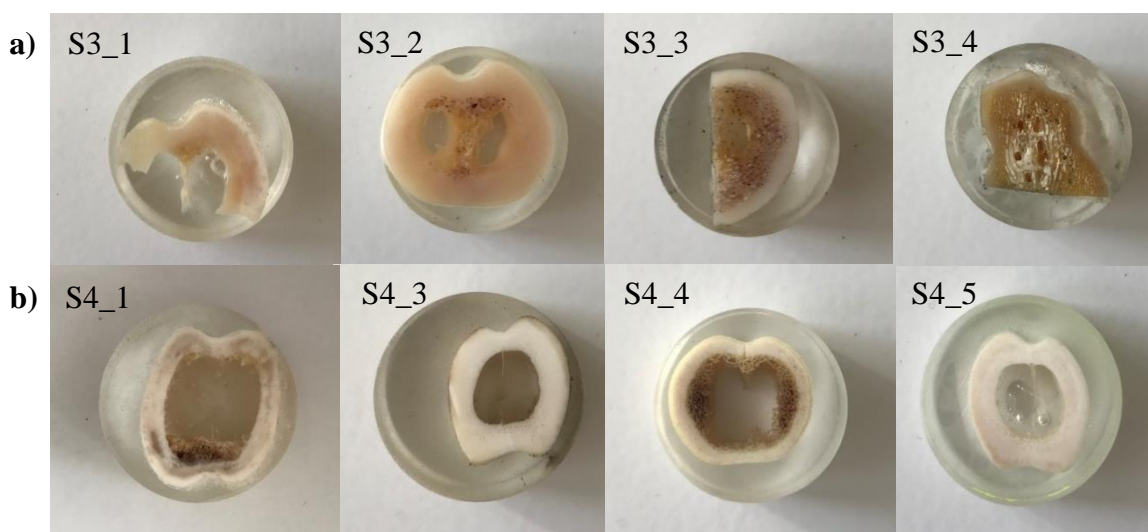
Obr. 8: Vzorky kostí po mechanickém odstranění měkkých tkání pomocí skalpelu, a) srnec S3, b) srnec S4.

Měkká tkáň, která nešla odpreparovat skalpelem, byla u části vzorků odstraněna kolonií **Kožojedů šedých** na Ústavu biologie obratlovců AV ČR v Brně. Druhá část vzorků byla podrobena maceraci. Byly odzkoušeny celkem tři macerační techniky – v **3% roztoku NaOH**, ve vodném roztoku **kapsle do myčky** (Somat: Excellence kapsle 4 v 1) a v **savu** (Savo Prim Svěží vůně). Přehled vzorků a metod, které byly využity k jejich očištění, je uveden v *tabulce 2*. Kost byla vložena do polypropylenové nádoby s chemikálií, ve které probíhala za určité teploty macerace. Po skončení macerace byla kost vždy opláchnuta deionizovanou vodou a vysušena přes noc při laboratorní teplotě. Suché vzorky byly skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C do dalšího zpracování.

Tabulka 2: Seznam vzorků a využitých metod k jejich očištění

vzorek	metoda
S3_1	kapsle
S3_2	savo
S3_3	kožojedi
S3_4	3% NaOH
S4_1	kapsle
S4_3	kožojedi
S4_4	savo
S4_5	3% NaOH

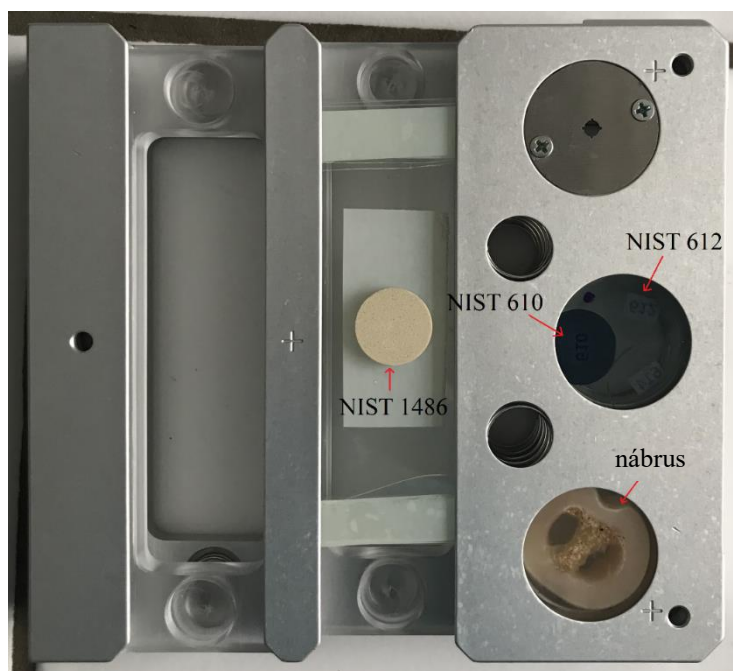
Zcela očištěné kosti byly poté s pomocí Ing. Matěje Březiny, Ph.D. zality ve formách kruhového tvaru o průměru 2,5 cm epoxidovou pryskyřicí ve vakuové komoře CitoVac. Po vytvrnutí byly pryskyřicové tablety s kostmi zbroušeny na brusce Kompakt 1031 (některé předem rozřezány lupénkovou pilkou) tak, aby šířka nábrusu byla cca 1 cm. Broušení probíhalo postupně za využití brusných SiC papírů o různé zrnitosti, počínající tou nejhrubší a konče nejjemnější – na vyleštění vzorku. Takto vytvořený nábrus (*obr. 9*) byl připraven na analýzu pomocí LA-ICP-MS.



Obr. 9: Nábrusy použité pro LA-ICP-MS analýzu, a) vzorky ze srnce S3, b) vzorky ze srnce S4.

3.5 Analýza kostí pomocí metody LA-ICP-MS

Nábrus kosti byl vložen do držáku ablační komory laseru společně se standardními referenčními materiály NIST 610 a NIST 612. Práškový NIST 1486 (kostní moučka) byl slisován do pevné tablety a pomocí oboustranné lepicí pásky připevněn na podložní sklíčko, které bylo taktéž vloženo do držáku. Takto připravený držák (obr. 10) byl následně vložen do ablační komory. Výběr prvků za účelem sledování jejich distribuce v kosti byl odvozen od dvou faktorů. Na základě rešerše bylo vybráno 8 prvků, které se v kosti přirozeně vyskytují (P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Ba, Cr) a 4 prvky, které se do kosti mohly dostat alterací z okolního kontaminovaného prostředí (Pb, Ni, As, U).



Obr. 10: Držák laserové ablační komory s nábrusem vzorku kosti S3_2 a standardními referenčními materiály NIST.

3.5.1 Ladění ICP-MS

Před zahájením měření vzorku bylo vždy provedeno kontrolní ladění ICP hmotnostního spektrometru pro dosažení maximální odezvy. Kontrolovány byly údaje o intenzitě a stabilitě signálu, citlivosti detektoru apod. K ladění byl využit standardní referenční materiál (SRM) NIST 612. Ladění probíhalo tak, aby bylo dosaženo minimální tvorby oxidů ($^{248}\text{ThO}/^{232}\text{Th}^+ < 5\%$), dvakrát nabitých iontů ($^{70}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^+ < 5\%$) a poměr $^{238}\text{U}/\text{Th}^{232}$ jako faktor frakcionace by měl být roven 1.

3.5.2 Nastavení experimentálních parametrů LA-ICP-MS analýzy

Parametry pro laserovou ablací byly zvoleny na základě dřívějších zkušeností doc. Mgr. Michaely Vašinové Galiové, Ph.D. a zkušebních měření na části vzorku S3_1, které byly provedeny právě za účelem optimalizace parametrů. Na každém vzorku probíhaly 2 typy měření. První analýzou byla odprašována část vzorku laserovým svazkem v módu liniového skenu, při kterém je posun vzorku doprovázen laserovou ablací za účelem mapování distribuce sledovaných prvků ve vzorku. Volba menšího průměru laserového svazku při tomto typu analýzy zajišťovala dostatečné prostorové rozlišení, zato ale horší limity detekce. Proto bylo

vždy provedeno i druhé měření, tentokrát v módu bodové analýzy. Větší průměr laserového svazku vytvářející linii bodů přes vzorek zajistil nízké limity detekce.

Průměr laserové svazku, rychlost posunu a frekvence byly tedy zvoleny s ohledem na dosažení dostatečného prostorového rozlišení a zároveň aby doba analýzy nebyla příliš dlouhá. Hustota zářivé energie byla vybrána tak, aby docházelo k odprašování dostatečného množství materiálu. Podle předpokládaného zastoupení izotopů prvků ve vzorku byly nastaveny jejich integrační časy (IT) – izotopy prvků s očekávanými vysokými obsahy měly nižší IT a naopak. Byl kladen důraz na dosažení dostatečného časového rozlišení signálu a udržení odstavu signálu sledovaného izotopu od pozadí. Při optimalizaci parametrů byly vzaty v potaz i možnosti metody ICP-MS z hlediska limitů detekce.

Pro možnost následné kvantifikace a ověření odezvy stability signálu byl po každé analýze měřen taktéž NIST 610 a NIST 1486. U měření byla použita také kolizně-reakční cela k minimalizaci interferencí. Parametry obou analýz jsou uvedeny v *tabulce 3*.

Tabulka 3: Pracovní parametry LA-ICP-MS

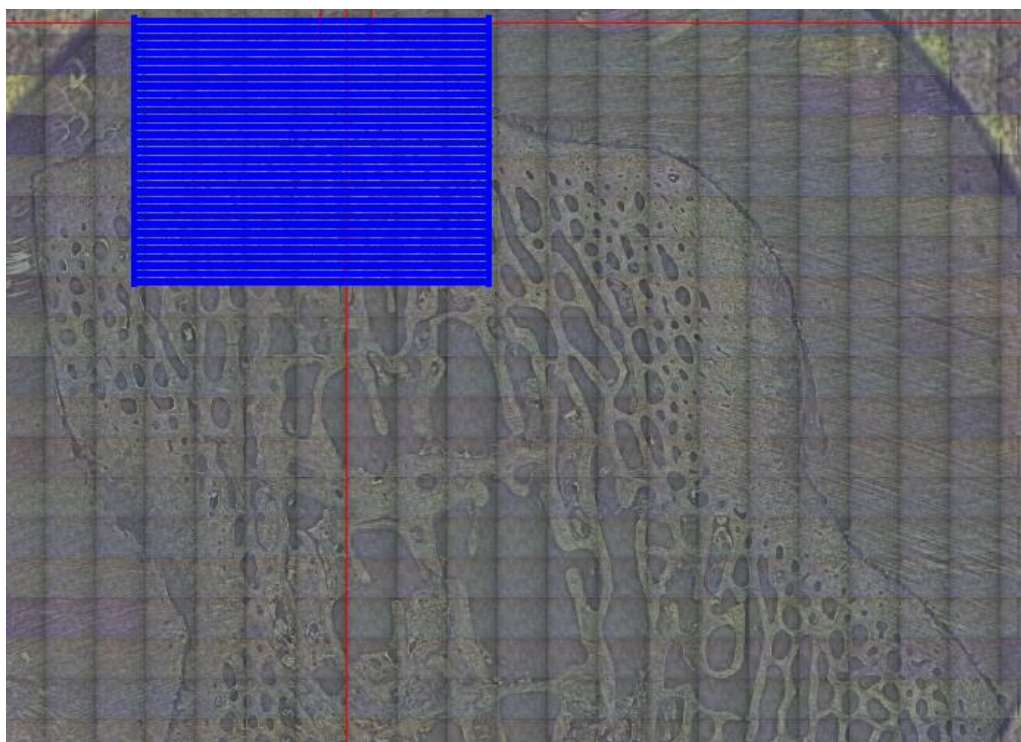
Parametry ICP-MS		
Příkon [W]	1550	
Průtok nosného plynu - Ar [l/min]	~ 1	
Izotop prvku	Integrační čas [ms]	
⁴³ Ca ⁺	6	
⁸⁸ Sr ⁺	10	
¹³⁷ Ba ⁺	30	
³¹ P ⁺	30	
⁶⁶ Zn ⁺	100	
⁵³ Cr ⁺	100	
⁵⁵ Mn ⁺	100	
⁵⁶ Fe ⁺	100	
²⁰⁸ Pb ⁺	100	
²³⁸ U ⁺	100	
⁶³ Cu ⁺	200	
⁵² Cr ⁺	300	
⁶⁰ Ni ⁺	300	
⁷⁵ As ⁺	500	
Parametry LA		
Ablační mód	liniový sken	bodová analýza
Průměr svazku [μm]	35	110
Hustota zářivé energie [J/cm ²]	5	5
Frekvence [Hz]	50	10
Rychlost posunu [μm/s]	70	-
Vzdálenost mezi liniemi/body [μm]	35	115
Průtok ablačního plynu – He	0,5 + 0,3 l/min	
Kolizně reakční cela – He	1 ml/min	

3.5.3 Popis měření

Pomocí LA-ICP-MS byly analyzovány nábrusy vzorků kostí za účelem určení jejich prvkové distribuce a alterace kontaminujícími prvky. Z výsledků je vyhodnocován možný dopad různých maceračních technik na tuto distribuci. Seznam všech analyzovaných vzorků je uveden v *tabulce 1*.

3.5.3.1 Sledování prvkové distribuce

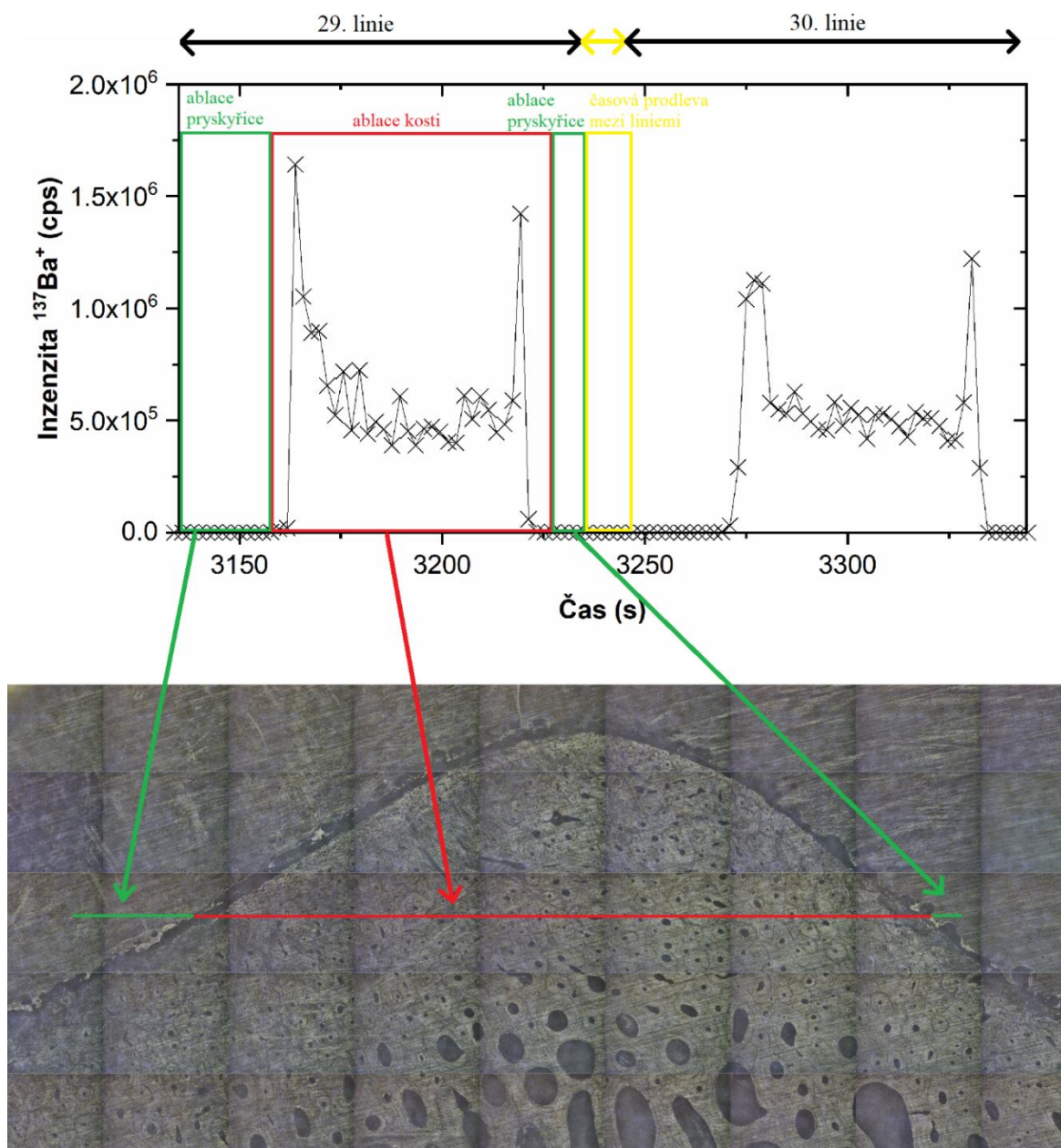
Na každý vzorek bylo umístěno 150 linií (parametry uvedeny v *tabulce 2*) tvořících mapu části vzorku (*obr. 11*). Délky linií se napříč vzorky lišily kvůli rozdílné velikosti a struktuře kostí. Jelikož byl průměr kruhového laserového svazku 35 μm , byla vzdálenost mezi jednotlivými liniemi nastavena na 35 μm , aby na sebe linie naléhaly a zamezilo se ztrátě rozlišení v ose y. Kvůli velkým rozměrům kostí, a s tím spojené časové náročnosti, nebyl analyzován celý vzorek, ale pouze jeho část. Pozice linií byla vybrána tak, aby byla pokryta jak část kompaktní kosti, tak i část spongiózní. Alespoň první linie byla vždy umístěna v pryskyřicové části nábrusu. Mezi jednotlivými liniiovými skeny vždy proběhla 10sekundová pauza, která byla dostatečná pro vymytí aerosolu z ablační cely. Po analýze vzorku byly za stejných podmínek ablatovány i standardní referenční materiály NIST 610 a NIST 1486 pro kontrolu změny citlivosti a stability ICP-MS a také za účelem kvantifikace.



Obr. 11: Ukázka liniiových skenů (modře) umístěných na vzorku S3_4

Výsledkem měření je časově rozlišený signál odpovídající závislosti intenzity signálu na čase. Grafická závislost intenzity izotopu barya na čase (obr. 12) zobrazuje 2 po sobě jdoucí linie. Linie začíná i končí v pryskyřičné části nábrusu (značeno zeleně) a v grafu se jedná o oblast s téměř nulovou intenzitou. Červeně je vyznačená ablatovaná část kosti, korespondující se zvýšenou intenzitou. Po dokončení linie proběhne 10sekundová pauza (značeno žlutě) a poté začíná ablace další linie.

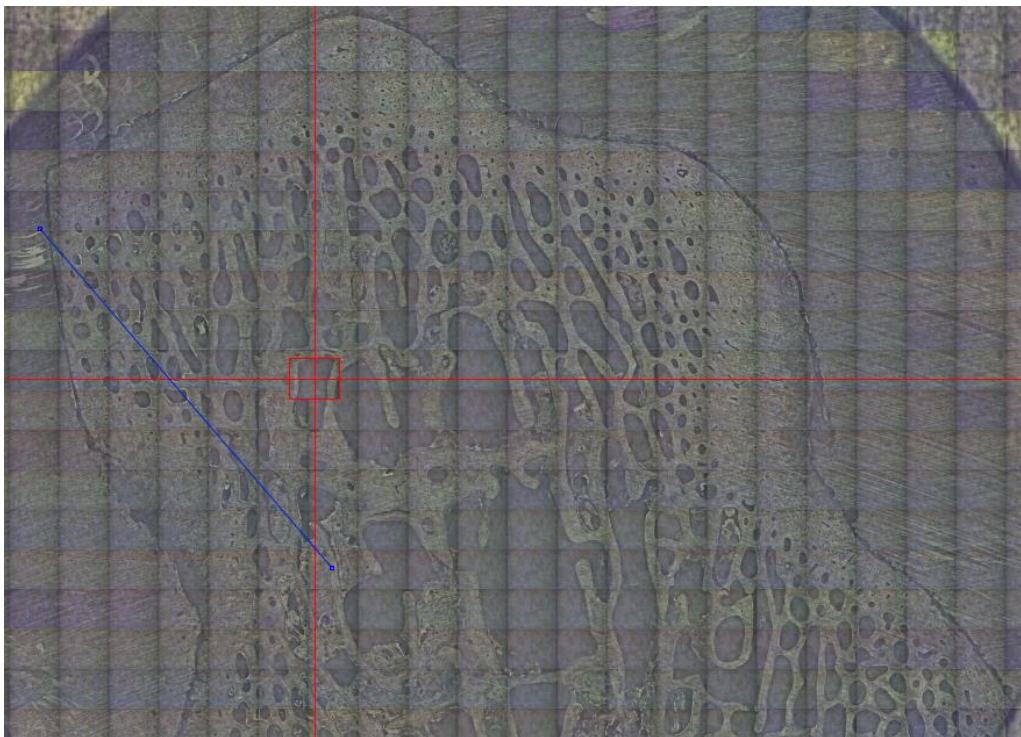
Ke zpracování dat a zobrazení 2D distribuce prvků byl použit software HDIP (Teledyne CETAC Technologies, Spojené státy americké). Software odečítá pozadí, separuje signál pro jednotlivé linie, vytváří výslednou matici dat a vizualizuje distribuci izotopů prvků v rámci ablatované plochy.



Obr. 12: Časový průběh intenzity signálu $^{137}\text{Ba}^+$ s jednotlivými úseky ablace u vzorku S3_4 a fotografie vzorku S3_4 (pořízená kamerou laseru) s vyznačenou linií, na které ablace probíhala.

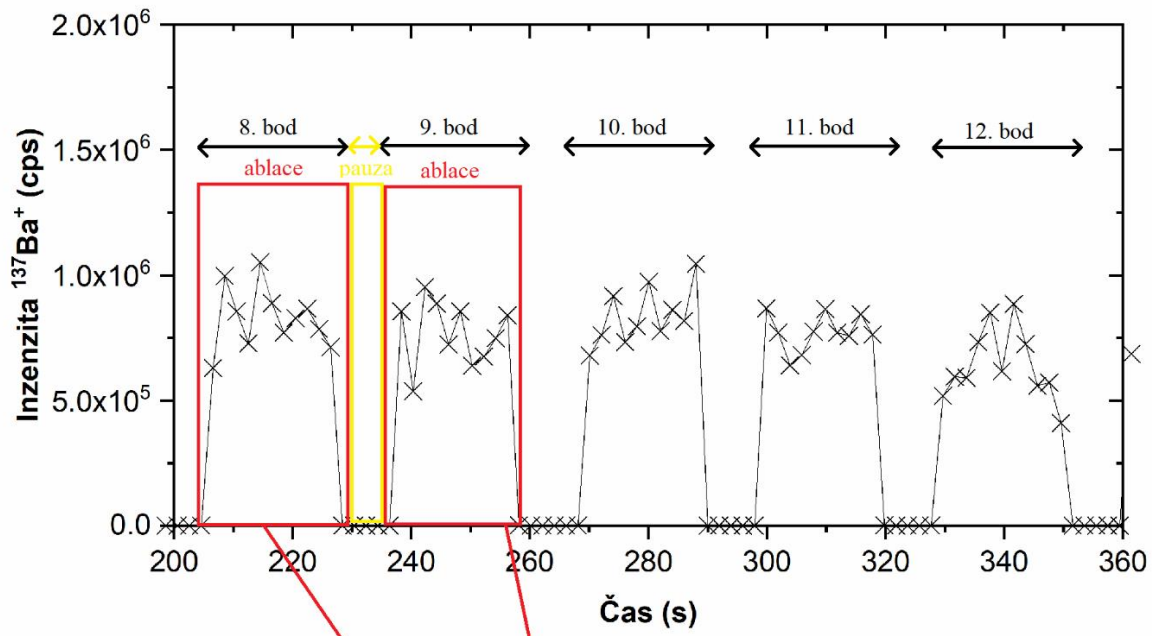
3.5.3.2 Bodová analýza

Po mapování liniovým skenem vždy následovala bodová analýza vzorku dle parametrů uvedených v *tabulce 2*. Linie bodů byla natažena přes vzorek tak, aby začínala a nejlépe i končila v pryskyřicové části nábrusu, a procházela jak kompaktní, tak spongiózní částí kosti (*obr. 13*). Délka linie a tedy i počet bodů byl determinován velikostí daného vzorku. Průměr kruhového svazku byl 110 μm a vzdálenost mezi jednotlivými body činila 115 μm , aby nedocházelo k překryvu. Mezi jednotlivými body byla pauza 10 sekund. Nakonec bylo ablatováno 5 bodů na NIST 610 a 5 bodů na NIST 1486 za identických podmínek jako proběhlá bodová analýza pro kontrolu stability ICP-MS a kvantifikaci.



Obr. 13: Ukázka linie bodů (modře) umístěná na vzorku S3_4

Výsledkem měření je taktěž časově rozlišený signál odpovídající závislosti intenzity signálu na čase. Grafická závislost intenzity izotopu barya na čase (obr. 14) zobrazuje vybraných 5 po sobě jdoucích bodů (první dva značeny červeně) ablatované kosti. V grafu tyto body odpovídají zvýšené intenzitě signálu. Mezi jednotlivými body je 10sekundová pauza, v grafu se jedná o oblasti s nulovou intenzitou.



Obr. 14: Časový průběh intenzity signálu $^{137}\text{Ba}^+$ vybraných bodů ablace u vzorku S3_4 a fotografie vzorku S3_4 (pořízená kamerou laseru) s vyznačenými body.

Ke zpracování dat bodové analýzy byl použit software HDIP (Teledyne CETAC Technologies, Spojené státy americké). Software odečítá pozadí a integruje plochy píků. Z výsledných hodnot intenzit se poté vypočítají obsahy jednotlivých prvků daného izotopu podle vzorce:

$$c_i = \frac{I_i \times c_{PP}}{I_{PP}} \times \frac{c_{i_{SRM}} \times I_{PP_{SRM}}}{c_{PP_{SRM}} \times I_{i_{SRM}}} \quad (1)$$

c_i = obsah prvku daného izotopu ve vzorku

I_i = intenzita daného izotopu ve vzorku naměřená metodou LA-ICP-MS

c_{PP} = obsah porovnávacího prvku

I_{PP} = intenzita porovnávacího prvku ve vzorku naměřená metodou LA-ICP-MS

$c_{PP_{SRM}}$ = hodnota obsahu porovnávacího prvku daného izotopu ve SRM 1486

$c_{i_{SRM}}$ = obsah prvku daného izotopu ve SRM NIST 1486

$I_{i_{SRM}}$ = intenzita izotopu daného prvku ve SRM NIST 1486 naměřené metodou LA-ICP-MS

$I_{PP_{SRM}}$ = intenzita izotopu porovnávacího prvku ve SRM 1486 naměřená metodou LA-ICP-MS

Jako porovnávací prvek byl zvolen vápník, jelikož se jedná o matriční prvek kostní tkáň a je předpokládána jeho homogenní distribuce. Jeho obsah vyplývá ze stechiometrie HAP a činí 39,9 %. Normalizace na vápník byla provedena pro korekci rozdílné ablační rychlosti mezi hydroxyapatitovou fází vzorku a kostní moučkou. Byly vypočítány i limity detekce podle vzorce:

$$LOD = \frac{3 \times SD_{BKG}}{\frac{I_{i_{SRM}}}{c_{i_{SRM}}}} \quad (2)$$

SD_{BKG} = směrodatná odchylka pozadí

$I_{i_{SRM}}$ = průměr intenzit izotopu daného prvku ve SRM NIST 1486 naměřené metodou LA-ICP-MS

$c_{i_{SRM}}$ = obsah prvku daného izotopu ve SRM NIST 1485

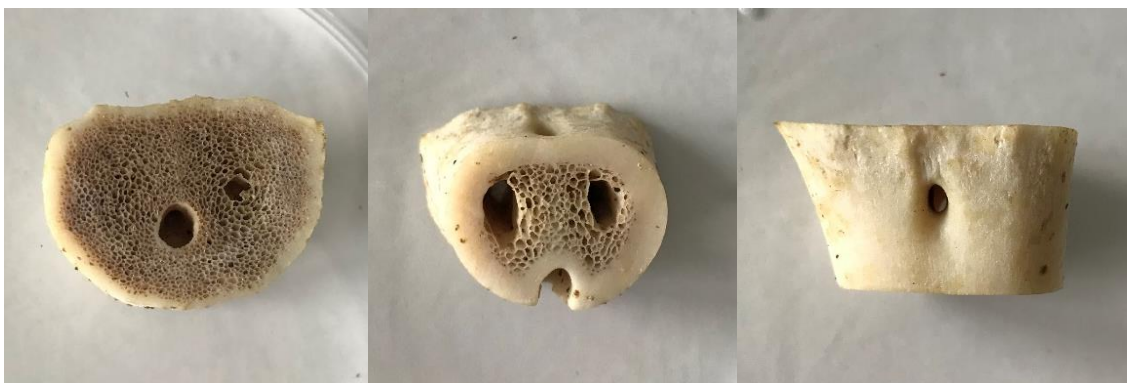
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Metody využité k odstranění měkkých tkání z kostí

Na základě rešerše byly vybrány 3 macerační techniky, aby byla ověřena jejich účinnost a případný vliv na prvkovou distribuci v kostech. Jednalo se o chemické macerace ve vodném roztoku kapsle do myčky, sava a v 3% roztoku NaOH. Před samotnou macerací byl vzorek kosti vždy ponechán samovolnému rozmrazení při laboratorní teplotě. Poslední metodou, jedinou bez přítomnosti chemikálií, bylo využití kolonie Kožojedů šedých.

4.1.1 Kožojed šedý

Očištění kosterních vzorků kolonií Kožojedů šedých probíhalo na Ústavu biologie obratlovců AV ČR v Brně pod dozorem správce sbírek pana Ing. Václava Práška. Podle poskytnutých informací je kolonie kožojedů udržována při teplotě pohybující se okolo 30 °C. Jelikož byly vzorky kostí lehké a brouci by je dokázali přemístit, byl každý vzorek opatřen plíškem s názvem daného vzorku, aby nedošlo k případnému promíchání. Očištění vzorků (S3_3 a S4_1) trvalo cca 12 dní. U vzorku S3_3 (*obr. 15*) jde vidět, že je povrch kosti čistý, a že se larvy kožojedů dokázaly dostat i do pórů kostí spongiózní.



Obr. 15: Vzorek S3_3 po očištění kožojedy.

Na povrchu kosti u vzorku S4_3 (*obr. 16*) kožojedi ponechali vyschlé zbytky měkké tkáně. Je taky zřetelné porušení kosti na okrajích, které bylo způsobeno jak pilkou, tak nejspíše i kožojedy.



Obr. 16: Vzorek S4_3 po očištění kožojedy.

4.1.2 Kapsle do myčky

Jako první byla k odstranění měkkých tkání otestována macerace pomocí obsahu kapsle do myčky. Před samotnou macerací byl vzorek samovolně rozmražen při laboratorní teplotě. Ve studiích [37, 47] se prokázala nejefektivnější macerace v roztoku detergentu při 60 °C, i tak ale trvala cca 2 až 3 dny. Jednalo se ale o vzorky větších částí spodních končetin prasat či kostí lidských bez předchozího odpreparování alespoň části měkkých tkání. Jelikož vzorky studované v této práci byly řezy kostí o šířce cca 2 cm a převážně byly obklopeny už jen zbytky měkkých tkání, bylo předpokládáno, že macerace v tomto případě bude probíhat rychleji. Aby nedošlo k případnému narušení kosti, byla zvolena macerace při nižší teplotě (45 °C), při které ve zmíněných studiích máčení probíhalo také, pouze bylo méně efektivní. Tři lžičky práškové části kapsle Somat: Excellence 4 v 1 byly rozpuštěny v 60 ml deionizované vody v polypropylenové nádobce. Nádobka s roztokem byla položena na topnou desku. Jakmile roztok dosáhl požadované teploty, byl do něj vložen vzorek S3_1 (2 rozlomené části). Průběh macerace byl pravidelně kontrolován a je uveden v *tabulce 4*. Po 20ti minutách začala měkká tkáň degradovat a po další cca hodině ji bylo možné od kosti mechanicky oddělat.

Tabulka 4: Průběh macerace vzorku S3_1 (kapsle do myčky)

S3_1 – kapsle do myčky	
čas [min]	stav
0	začátek macerace
20	uvolnění mastnoty, měkká tkáň zbledla a začala se odchlípnout
40	počátek uvolnění kostní dřevě, povrch kosti z části čistý
60	beze změny
80	beze změny
100	měkká tkáň oddělována pinzetou, kost vložena zpět do roztoku
120	konec macerace, kost zcela očištěna

Macerace vzorku S3_1 ve vodném roztoku kapsle do myčky tedy celkově trvala 2 hodiny. V průběhu nebyl zaznamenán zápach nebo poškození kosti, k rozlomení došlo už před macerací. Vzorek byl po skončení na 5 minut ponořen do deionizované vody a ponechán přes noc v laboratoři k vysušení (*obr. 17*).



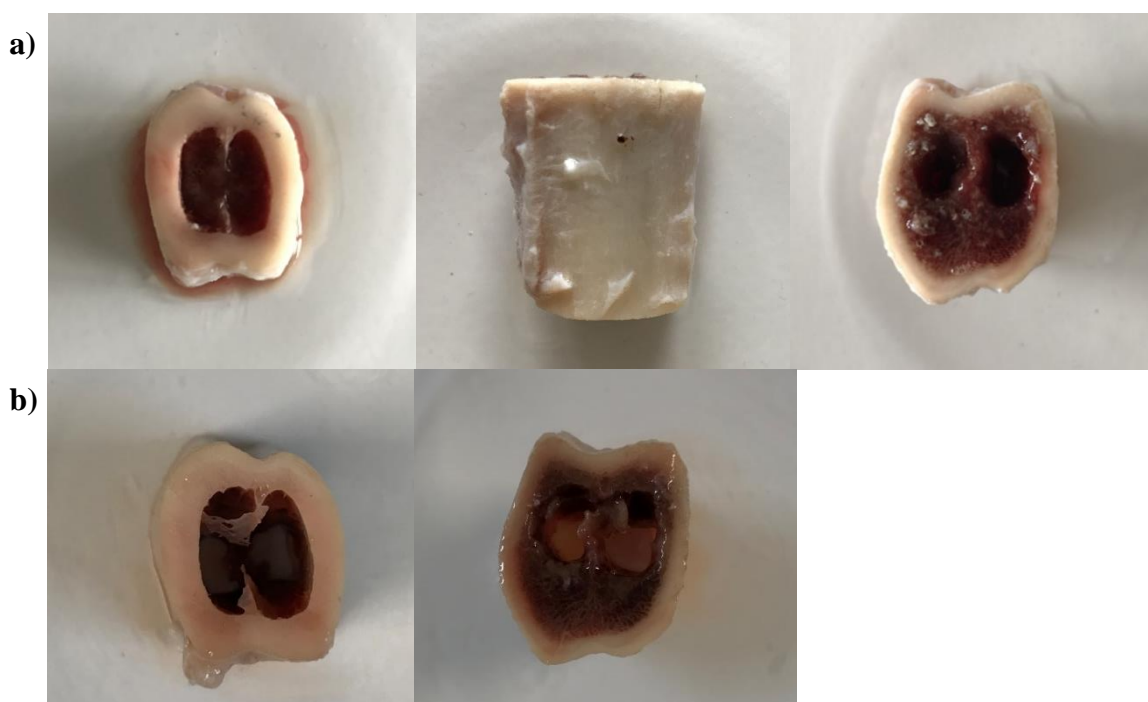
Obr. 17: Vzorek S3_1 po maceraci ve vodném roztoku tablety do myčky.

Vodný roztok kapsle do myčky se zdál jako efektivní způsob, a proto byl použit i pro očištění dalšího vzorku. Tentokrát byly rozpuštěny 4 lžičky prášku v 60 ml deionizované vody s předpokladem rychlejšího průběhu. Roztok v nádobce byl zahříván na topné desce opět na 45 °C, jelikož v minulém případě byla tato teplota dostačující. Vzorek S4_1 byl předem rozmražen při laboratorní teplotě, a poté vložen do nádoby s roztokem. Macerace byla kontrolována každých 30 minut a její průběh je uveden v *tabulce 5*.

Tabulka 5: Průběh macerace vzorku S4_1 (kapsle do myčky)

S4_1 – kapsle do myčky	
čas [min]	stav
0	začátek macerace
30	tkáň zbělala
60	počátek uvolnění kostní dřeně, roztok zbarven červeně od krve
90	beze změny
120	část tkáň oddělena pinzetou, kost vložena zpět do roztoku
150–240	beze změny
270	konec macerace, část kostní dřeně odstraněna, většina tkáň odstraněna pomocí pinzety

Část krvavé kostní dřeně byla z kosti odstraněna, ale tentokrát ani 4,5 hodiny nestačily k rozmáčení tkáň natolik, aby se dala dokonale odstranit pinzetou (*obr. 18*). Macerace byla ukončena a kost uskladněna v mrazáku.



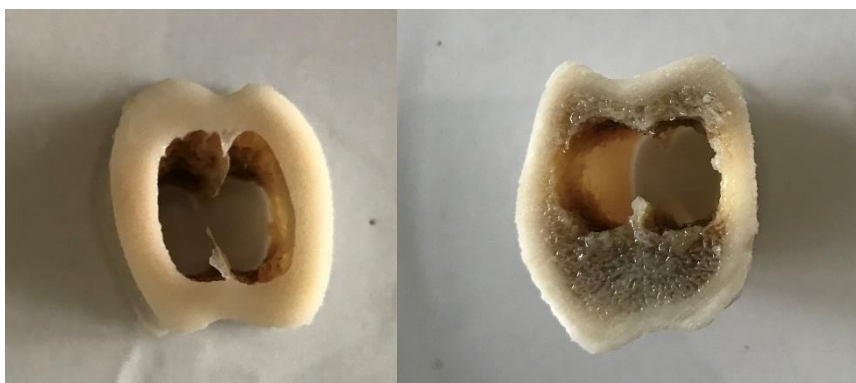
Obr. 18: Vzorek S4_1, a) po 30ti minutách macerace ve vodném roztoku tablety do myčky, b) po skončení macerace.

Vzorek byl jiný den podroben dalšímu pokusu o dočištění za stejných podmínek. Průběh dodatečné macerace je popsán v *tabulce 6*. Tentokrát se až po hodině projevila změna stavu, krvavá kostní dřevina zhnědla, nakonec i zešedla. Po 2 hodinách byl roztok vyměněn za nový, o stejné koncentraci jako původní. Až po 4 hodinách byla zbytková měkká tkáň na povrchu rozmočena natolik, že bylo možné ji odstranit.

Tabulka 6: Průběh dodatečné macerace vzorku S4_1 (kapsle do myčky)

S4_1 – kapsle do myčky – dodatečná macerace	
čas [min]	stav
0	začátek macerace
30	beze změny
60	krvavé části kosti zhnědly
90	beze změny
120	výměna roztoku
150–240	beze změny
270	konec macerace, tkáň odstraněna pomocí pinzety, spongiózní část zešedla

Celý macerační proces tentokrát tedy trval 9 hodin. Po skončení byl vzorek omyt deionizovanou vodou a vysušen při laboratorní teplotě (*obr. 19*). Ani tentokrát nebyl zaznamenán žádný zápach či porušení kosti.



Obr. 19: Vzorek S4_1 po dodatečné maceraci.

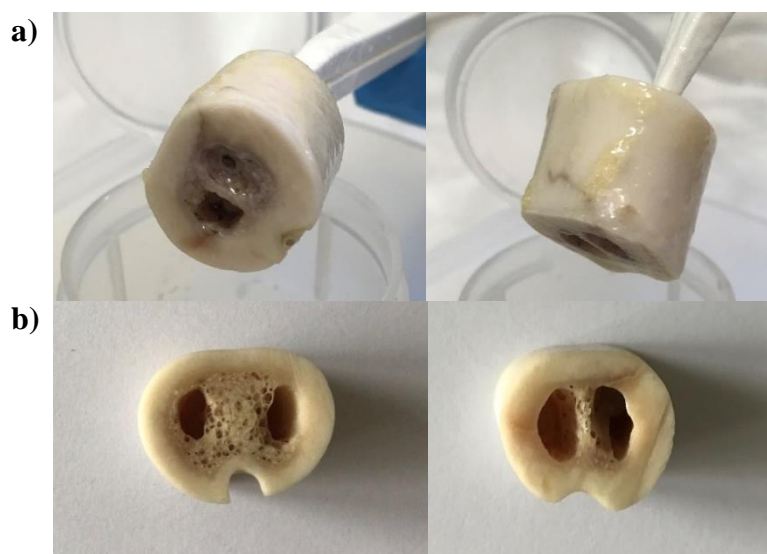
4.1.3 Savo

Byla také testována macerace v sava, které byl podroben vzorek S3_2. Ve studii [48] byly v bělidle macerovány lidské ostatky – hrudní kost spolu s žebry. Bylo použito nezředěné bělidlo a roztok byl vyměněn každých 20 minut, nebo v případě tvorby mastného filtru na hladině. Bylo uvedeno, že po vložení kostí do bělidla došlo k okamžitému zahřátí roztoku. Z důvodu diametrálně menších rozměrů vzorků v této práci byla jako pilotní pokus zvolena macerace ve zředěném sava (Savo Prim Svěží vůně) při laboratorní teplotě, aby nedošlo k příliš bouřlivé interakci a poškození kosti. Roztok sava byl zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:1, 30 ml sava a 30 ml deionizované vody. Po vložení kosti do roztoku se neprojevila žádná bouřlivá reakce, jen došlo k částečné degradaci měkkých tkání, vzniku mastné skvrny na hladině a vyprázdnění dřevnaté dutiny. Díky této skutečnosti byl po necelých 2 hodinách macerace

vyměněn roztok za koncentrovanější (40 ml sava a 20 ml deionizované vody) s cílem urychlení průběhu. V koncentrovanějším roztoku byla po čase pozorována změna spongiózní kosti (šednutí) spolu s úplným vyprázdněním dřeňových dutin a rozkladem měkkých tkání na povrchu kosti. Za účelem dokonalého očištění kosti byl roztok znovu vyměněn, tentokrát však za čisté savo. Detailní průběh macerace je zaznamenán v *tabulce 7*. Macerace v savu u vzorku S3_2 (*obr. 20*) trvala 5 hodin a 30 minut, očištění bylo účinné, a navíc nebyl zaznamenán žádný nepříjemný odér či narušení kosti.

Tabulka 7: Průběh macerace vzorku S3_2 (savo)

S3_2 – savo	
čas [min]	stav
0	začátek macerace
30	na některých místech měkká tkáň zežloutla, někde se odchlípla
60	vytvoření vrstvy bublin na hladině roztoku
90	roztok se zakalil, vznik mastného filtru na hladině, jedna dřeňová dutina se vyprázdnila
100	výměna roztoku (40 ml sava:20 ml vody)
120	druhá dřeňová dutina se vyprázdnila
150	vznik mastného filtru na hladině, část tkáně oddělena pomocí pinzety, kost vložena zpět do roztoku
180	povrch kosti čistý, spongiózní část kosti začala šednout
210	beze změny, výměna roztoku za čisté savo
240	beze změny
270	spongiózní kost více pórovitá a zašedlá
300	beze změny, vytvoření vrstvy bublin na hladině
330	konec macerace, kost zcela očištěna



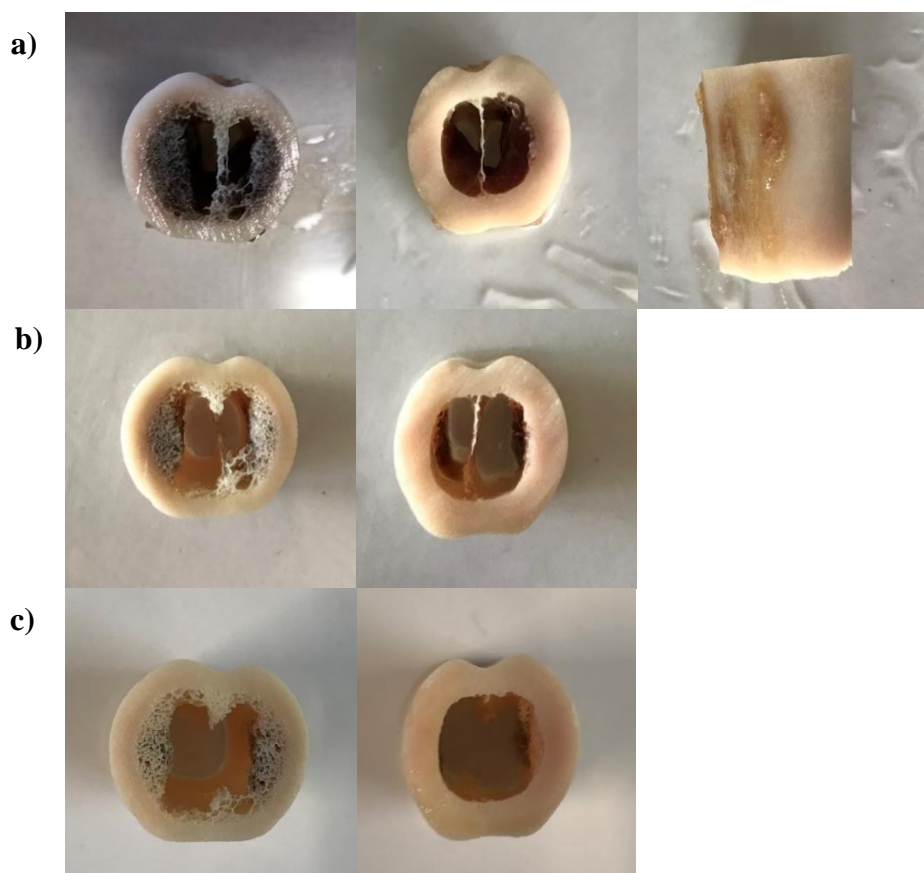
Obr. 20: Vzorek S3_2, a) po 30ti minutách macerace ve zředěném savu, b) po skončení macerace.

Po předchozí zkušenosti se u dalšího vzorku (S4_4) začínalo s macerací rovnou v koncentrovanějším roztoku (20 ml deionizované vody a 40 ml sava). Proces probíhal za laboratorní teploty, při které byla kost také před začátkem procesu rozmražená. Na hladině se téměř ihned objevil mastný filtr, ale jelikož se i tak stav kosti nadále měnil, nebyla potřeba roztok vyměnit za nový. Po 3 hodinách průběh stagnoval a roztok byl vyměněn za čisté savo za účelem konečného dočištění, k čemuž také pak došlo. *Tabulka 8* uvádí průběh macerace.

Tabulka 8: Průběh macerace vzorku S4_4 (savo)

S4_4 – savo	
čas [min]	stav
0	začátek macerace, ihned se objevil mastný filtr a bublinky na hladině
30	beze změny
60	dřeňové dutiny se začaly vyprazdňovat, měkká tkáň zežloutla a začala se odchlípnout
90	dřeňové dutiny skoro prázdné
120	část měkké tkáně oddělena pomocí pinzety, kost vložena zpět do roztoku
180	beze změny, výměna roztoku za čisté savo
300	konec macerace, kost zcela očištěna

Macerací proces u vzorku S4_4 (*obr. 21*) probíhal 5 hodin, bez zápachu či porušení struktury kosti.



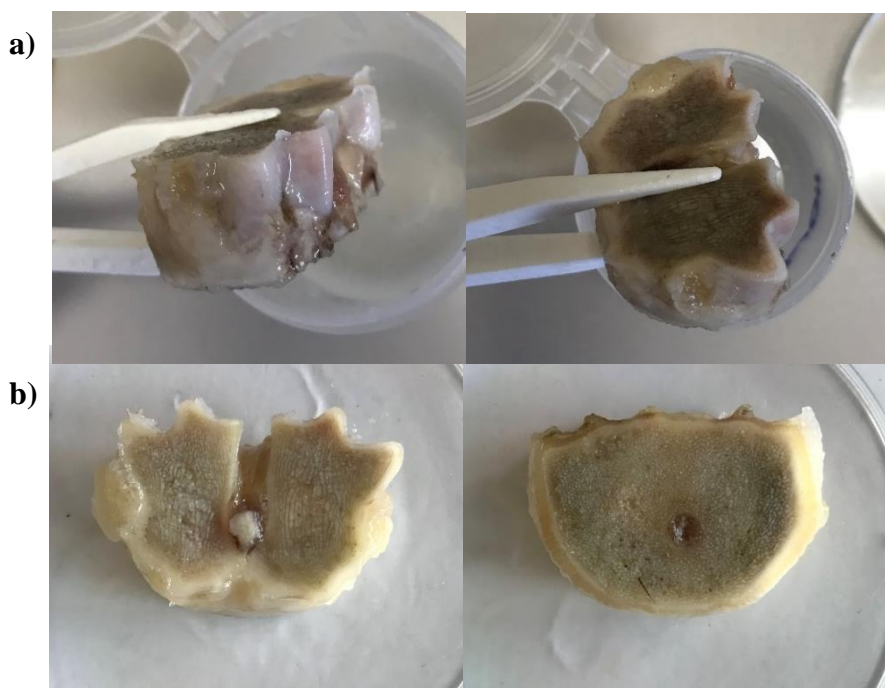
Obr. 21: Vzorek S4_4, a) po 60ti minutách macerace ve zředěném savu, b) po 180ti minutách, c) po skončení macerace.

4.1.4 3% NaOH

Jako poslední z chemické macerace přišla na řadu macerace v 3% roztoku NaOH. Z článku [43] bylo patrné, že použití 5% roztoku NaOH bylo příliš agresivní a kosti praskaly. Macerace ve slabším 3% roztoku NaOH sice způsobila praskliny také, ale v mnohem menší míře, a proto byla pro mou práci vybrána právě tato koncentrace. Ve studii navíc probíhala macerace kostí krys, které jsou méně robustní a mnohem křehčí než kosti srnce. Předpokládalo se tedy, že kosti srnce budou odolnější a k prasklinám bude docházet minimálně. Podle článku probíhala macerace v roztoku na přímém slunci, které roztok zahřálo minimálně na 35 °C. Začátek prvního pokusu macerace v 3% roztoku NaOH u vzorku S3_4 probíhal při laboratorní teplotě k eliminaci případného popraskání. Jelikož byl průběh macerace pozvolný, byl roztok spolu se vzorkem po půl hodině vložen na topnou desku a zahříván na 30 °C. Měkká tkáň sice povolila, ale nešla ani pomocí pinzety oddělit od kosti (*obr. 22*). Kvůli časovým důvodům byla macerace po 2 a půl hodinách ukončena. Průběh je zaznamenán v *tabulce 9*.

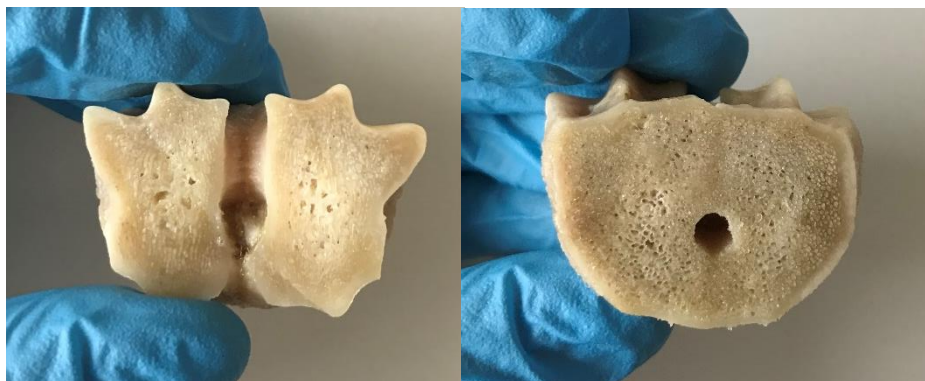
Tabulka 9: Průběh macerace vzorku S3_4 (3% roztok NaOH)

S3_4 – 3% NaOH	
čas [min]	stav
0	začátek macerace
30	roztok zežloutl, mastné skvrny a kousky tkáně na hladině, spongióza zešedla
60	vloženo na topnou desku
90	beze změny
120	měkká tkáň povolena, ale nešla mechanicky odstranit
150	konec macerace, barva roztoku žlutozelená



Obr. 22: Vzorek S3_4, a) po 30 minutách macerace v 3% roztoku NaOH, b) po skončení macerace

Po dokončení této macerace byla kost za týden podrobena další maceraci, tentokrát od začátku za teploty 35 °C. Druhá macerace probíhala 7 hodin (celkově tedy 9 a půl hodiny) a kromě zezelenání kosti spongiózní a zežloutnutí roztoku se stav kosti nezměnil. Vzorek byl na noc vložen do mrazáku o teplotě -80 °C za účelem hloubkového zmrazení měkkých tkání za účelem snadnějšího odpreparování. Jednalo se především pravděpodobně o zbytky okostice a ani po zmrazení nešla zcela dobře odstranit. Pinzetou šla pouze odstranit bílá tkáň ze dřevné dutiny. Vzorek byl vysušen při laboratorní teplotě. Po vysušení se zbytek okostice jevil jako degradovaný a kost už poté nebyla podrobena žádné další maceraci (*obr. 23*).



Obr. 23: Finální stav vzorku S3_4.

Jako poslední proběhla macerace vzorku S4_5 v 3% roztoku NaOH, který byl tentokrát po celou dobu udržován při 35 °C. Po hodině se vyprázdnila dřevná dutina a měkká tkáň začala zřetelně degradovat. Po dalších 30 minutách bylo možné tkáň odstranit mechanicky pinzetou (*obr. 24*). Macerace trvala 2 hodiny a její detailní průběh popisuje *tabulka 10*.

Tabulka 10: Průběh macerace vzorku S4_5 (3% roztok NaOH)

S4_5 – 3% NaOH	
čas [min]	stav
0	začátek macerace
30	roztok zežloutl, měkká tkáň povoluje
60	dřevná dutina se vyprázdnila a měkká tkáň zezelenala
90	měkká tkáň odstraněna pomocí pinzety, kost vložena zpět do roztoku
120	konec macerace, kost zcela očištěna, roztok zelenožlutý



Obr. 24: Vzorek S4_5 po maceraci v 3% roztoku NaOH.

Časové trvání všech metod je shrnuto v *tabulce 11*. Časově nejnáročnější bylo definitivně využití kožojedů, za to ale nebyla použita žádná chemikálie, a tím bylo sníženo riziko inkorporace nežádoucích prvků chemikálií do struktury kosti. Z výsledků chemických macerací lze těžko určit, jaká metoda byla nejvíce efektivní. U žádné z těchto metod nebylo zřetelné poškození kosti a výsledek očištění kostí je u všech metod srovnatelný.

Tabulka 11: Seznam vzorků, použitých metod a jejich trvání

vzorek	metoda	čas [hod]
S3_1	kapsle	2
S3_2	savo	5,5
S3_3	kožojedi	12 dní
S3_4	3% NaOH	9,5
S4_1	kapsle	9
S4_3	kožojedi	12 dní
S4_4	savo	5
S4_5	3% NaOH	2

Časové trvání macerace se vzorek od vzorku výrazně lišilo. Souviselo především se stavem vzorku – množstvím a kondicí měkké tkáně. U srnce obecného z Příbramska (S3) se jednalo o vzorek velmi vysušený, prášivý, bez přítomnosti živého masa. Téměř všechna suchá měkká tkáň byla odstraněna mechanicky před macerací a její pozůstatky byly odstraněny macerací v roztoku kapsle do myčky za pouhé 2 hodiny. Napomohlo tomu nejspíše i to, že byl vzorek S3_1 rozlomený a roztok se do póru kosti dostal snadněji. U srnce obecného z Liptovské Lúžně (S4) tomu bylo naopak. Jednalo se o vzorek kosti s červenou kostní dřeví, na povrchu obklopený čerstvým masem. V tomto případě macerace ve vodném roztoku kapsle trvala oproti ostatním metodám nejdéle, a to 9 hodin.

Při využití 3% roztoku NaOH byla situace opačná. Macerace vzorku ze srnce S3 trvala 9 a půl hodiny, vzorku ze srnce S4 pouze hodiny 2. Použití sava se ukázalo jako časově středně náročná metoda u obou vzorků, trvající cca 5 hodin. Navíc probíhala při laboratorní teplotě. Pokud se tedy jedná o vzorek ve zcela čerstvém stavu, je pravděpodobně nejefektivnější využití máčení v 3% roztoku NaOH za zvýšené teploty. Když jde naopak o vzorek starší, vyschlejší, prokázala se jako účinná macerace v roztoku kapsle do myčky.

U vzorku S4_1 a S4_4 došlo k porušení přepážky v dřevěné dutině, ne však kvůli působení chemikálií, nýbrž manipulací s pinzetou. Macerace s využitými chemikáliemi tedy nezapříčinily porušení kosti a ani nebyly doprovázeny zápachem.

Efektivita výše uvedených metod by mohla být zvýšena například využitím vyšší teploty, alespoň 60 °C. Při vyšší teplotě v kombinaci s chemikáliemi by mohly měkké tkáně rychleji povolít a degradovat. Macerace za vyšší teploty nebyla realizována z důvodu stavu topné desky, která nehrála po celém povrchu stejně a nastavená teplota neodpovídala skutečné. Zlepšit celý proces by také mohlo použití větších nádobek na maceraci nebo častější výměna roztoku.

4.2 Sledování prvkové distribuce

Cílem mapování prvkového složení kostí pomocí metody LA-ICP-MS bylo jak sledování samotné prvkové distribuce v kostech, tak i ověření případného vlivu maceračních technik na přirozenou distribuci. Na základě rešerše bylo vybráno 8 prvků, které se v kosti přirozeně vyskytují (P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Ba, Cr) a 4 prvky, které se do kosti mohly dostat alterací z okolního kontaminovaného prostředí (Pb, Ni, As, U) a u zvířat především skrze potravu vyrůstající na kontaminované půdě.

4.2.1 Analýza vzorků kostí z nekontaminované oblasti

Vzorek S4_3 očištěný kožojedy

První sada vzorků pochází ze srnce z Liptovské Lúžně, oblasti bez známé kontaminace. Vzorek srnce S4_3 z této sady byl očištěn od měkkých tkání kožojedy, a nepřišel tedy do styku s žádným maceračním činidlem, které by mohlo prvkovou distribuci ovlivnit. Díky svému původu a způsobu přípravy je v práci považován za vzorek referenční.

Vápník a fosfor představují matriční prvky HAP, což potvrzují i jejich distribuční mapy zobrazené na *obr. 25*. Distribuce těchto prvků je homogenní v celém řezu kosti, avšak po vnějším okraji kosti je pozorovatelný pokles jejich výskytu (označeno bílými šipkami). Tato linie pravděpodobně odpovídá okostici a zbytkům tkáně či se může jednat o artefakt měření daný rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi pryskyřice a kosterního materiálu. Distribuční mapy železa a mědi naopak vykazují nabohacení v těchto oblastech (označeno bílými šipkami). Měď je součástí koenzymu regulující transport železa, a proto by mohl být jejich výskyt vzájemně spjat. Železo je součástí hemoglobinu v krvi, která se může nacházet ve zbytkové tkáni, která nebyla z povrchu kosti kožojedy dokonale odstraněna, což lze vidět na *obr. 16*. Tento fakt může souviset s přítomností linie obohacené železem nejen ve vnějším, ale i na vnitřním okraji kosti (označeno bílými šipkami), kde se vyskytuje dřevný kanál. Obecně přítomnost železa a mědi v kosterním materiálu souvisí s biologickou funkcí kolagenu, a proto jsou taktéž distribuovány po celém řezu vzorku. Stejnou distribuci vykazuje i mangan skrze celou analyzovanou oblast. Výskyt manganu může též souviset s neúplným odstraněním organické části kosti, protože je součástí enzymů proteoglykanů organické části kostní matrix.

Dalšími sledovanými prvky vyskytujícími se v kosti přirozeně byly zinek, stroncium a baryum. Na mapě zobrazující distribuci zinku lze pozorovat přechod mezi kostí kompaktní a kostí spongiózní (na *obr. 25* vyznačeno bílým oválem). Role zinku je úzce spjata s procesem osifikace, tedy výskytem osteoblastů, které jsou uloženy v kompaktní kosti. Distribuční mapy stroncia a barya vykazují pozitivní korelaci a oba prvky jsou ve vzorku distribuovány v pásích. Směrem od kompaktní kosti ke kosti spongiózní je zřetelný systematický pokles intenzit, který je pravděpodobně zapříčiněn její remodelací a růstem. Stejně jako u matričních prvků jejich výskyt klesá na vnějším okraji kosti. Do kosti se výše zmíněné prvky dostávají skrze přijímanou potravu.

Podářilo se také detekovat vybrané kontaminanty s výjimkou chromu. Za předpokladu nižšího obsahu chromu v kosterním materiálu bylo z hlediska detekčních schopností ICP-MS vhodné zvolit jeho izotop $^{52}\text{Cr}^+$ z důvodu vyššího výskytu odpovídajícího 83,8 %. Ovšem pravděpodobnost výskytu interference byla díky tvorbě molekulárního iotu $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ příliš vysoká, jelikož je $^{12}\text{C}^+$ zastoupen z 98,9 %. Izotop $^{53}\text{Cr}^+$ byl sice zatížen z hlediska interferencí iontem $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ menší měrou (výskyt $^{13}\text{C}^+$ odpovídá 1,1 %), avšak díky nízkému zastoupení

(výskyt $^{53}\text{Cr}^+$ odpovídá 9,5 %) nebyl izotop v kosti detekován. Tento problém byl pozorován u všech vzorků, které byly podrobené mapování, a proto distribuční mapy $^{52}\text{Cr}^+$ a $^{53}\text{Cr}^+$ nejsou v práci uváděny. Druhým těžce detekovatelným prvkem byl arsen, kdy byl odstup signálu od pozadí velmi nízký a na mapě je detekovatelná pouze silueta kosti, což bylo též problémem u všech mapovaných vzorků, a proto nejsou distribuční mapy arsenu dále v práci komentovány. Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě mapování distribuce niklu, avšak přítomnost kosterního materiálu je v tomto případě zřetelně vizualizovaná a distribuce niklu se skrze analyzovanou oblast jeví homogenně. Naproti tomu distribuce olova a uranu vykazuje nabohacení těchto prvků ve středové části kosti, korespondující s vyšším výskytem železa a manganu (vyznačeno bílými ovály). Lze tedy konstatovat, že inkorporace kontaminujících prvků je především do kompaktní části kosti a jejich distribuce bude stejně jako u předchozích prvků dána stářím zvířete, remodelací a typem kosti. Metoda tedy umožňuje detekci některých kontaminantů a lokalizaci jejich přítomnost v kosterním materiálu. Z distribuce prvků typických pro organickou fázi je patrné, že kožojedi nebyli schopni dokonale očistit celou kost a ponechali na ní zbytky tkání.

Vzorek S4_1 macerovaný v roztoku kapsle do myčky

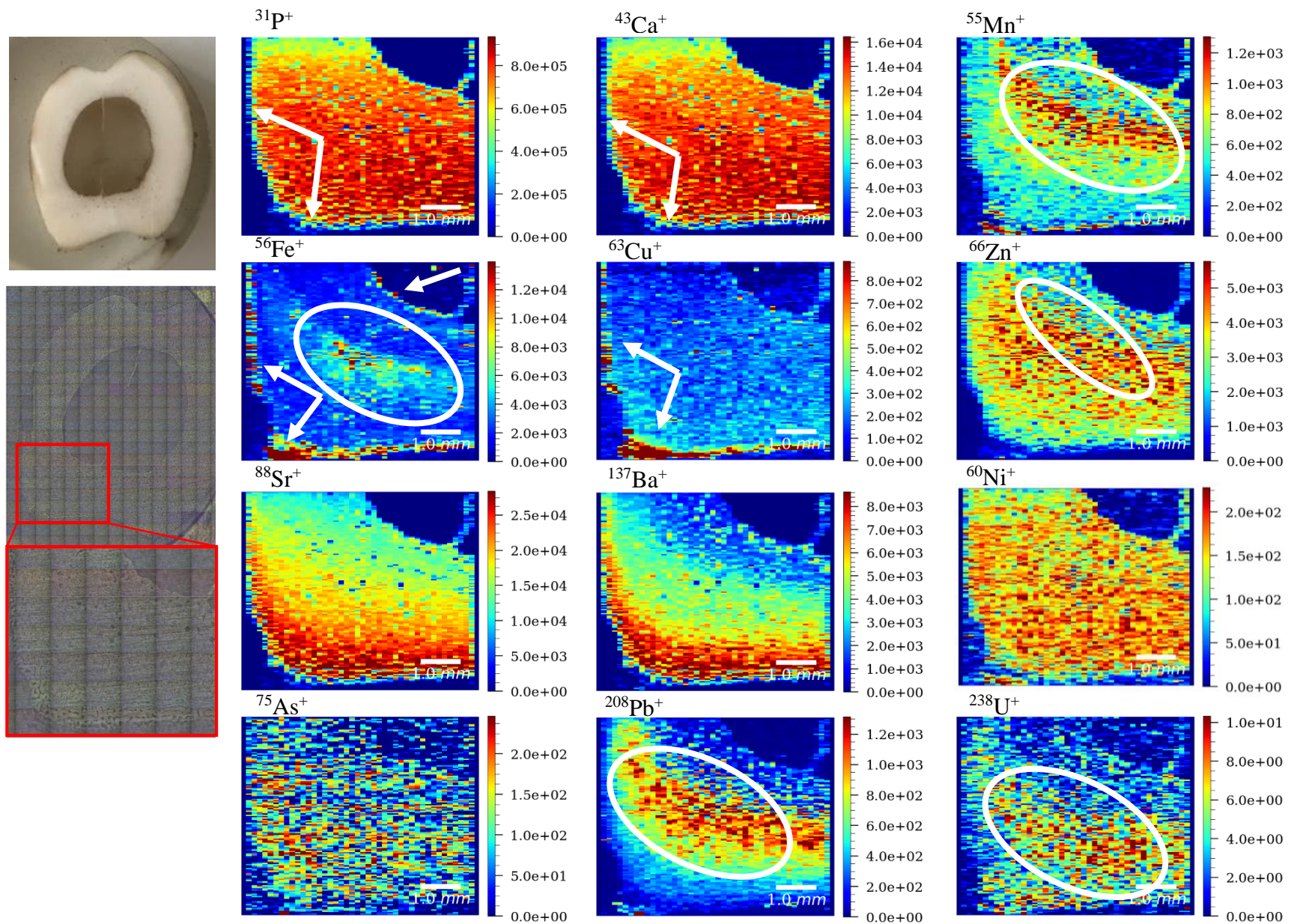
Na distribučních mapách vzorku S4_1 (*obr. 26*), macerovaného v roztoku kapsle do myčky, je vizualizována kompaktní kost a viditelné póry kosti spongiózní v dřevném kanálu. Distribuce fosforu, vápníku, zinku, stroncia, barya, manganu, olova a uranu identická jako u výše zmíněného vzorku S4_3. Rozdílnou distribuci vykazuje železo a měď, které vyplňují póry spongiózní kosti a oblast dřevného kanálu (označeno bílými ovály), ve kterém se nevyskytuje apatitová fáze. Podobně se chová i mangan, nikl a uran, jejichž výskyt může souviset i s čistotou samotné pryskyřice. Červené oblasti na levém spodním okraji distribučních map železa, mědi a olova (označeno bílými šipkami) budou pravděpodobně nečistoty, které byly do pryskyřice zaneseny při řezání nábrusu lupénkovou pilkou. V případě ostatních prvků je distribuce stejná jako u prvku S4_3. Z porovnání s referenčním vzorkem se dá říci, že macerace v tabletě nemá na přirozenou distribuci prvků v kosti žádný vliv.

Vzorek S4_4 macerovaný v savu

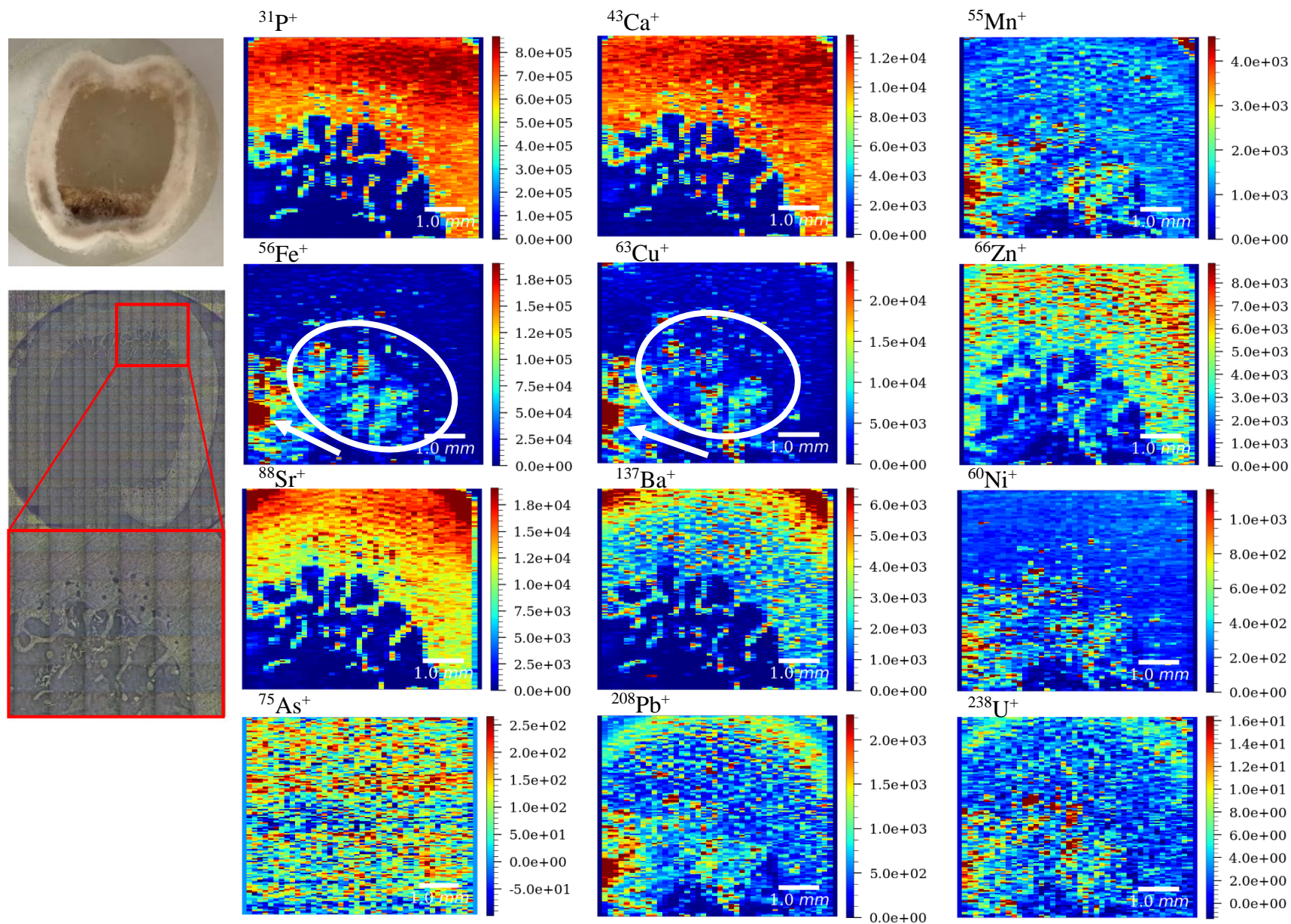
U vzorku S4_4 (*obr. 27*), který byl podroben maceraci v savu, je zřetelný stejný trend v distribuci matričních prvků, železa, mědi, zinku a niklu po celém řezu, a dokonce i okrajích vzorku jako u referenčního vzorku S4_3. V případě přítomnosti železa ve spongiózní části kosti (značeno bílými šipkami) se bude nejspíše jednat o zbytky kostní dřevě a tkání, jelikož byl vzorek místo nařezání pilkou přímo zbroušen na brusce. Projevila se změna v distribuci stroncia, barya, olova, uranu a manganu, které u předchozích vzorků tvořily po sobě jdoucí pásy. I tak je ale zachován výskyt olova, uranu a manganu nejvíce v místech mírně ochuzených o stroncium a baryum (značeno bílými ovály), jejichž výskyt spolu pozitivně koreluje, stejně jako u referenčního vzorku. Tento rozdílný typ distribuce pravděpodobně souvisí s komplexním kostním metabolismem, který se v rámci kosti může na různých místech lišit, a tím způsobovat jinou distribuci prvků. Rozdíly v distribuci oproti vzorku S4_3 tedy nejsou přikládány vlivu macerační techniky.

Vzorek S4_5 macerovaný v 3% roztoku NaOH

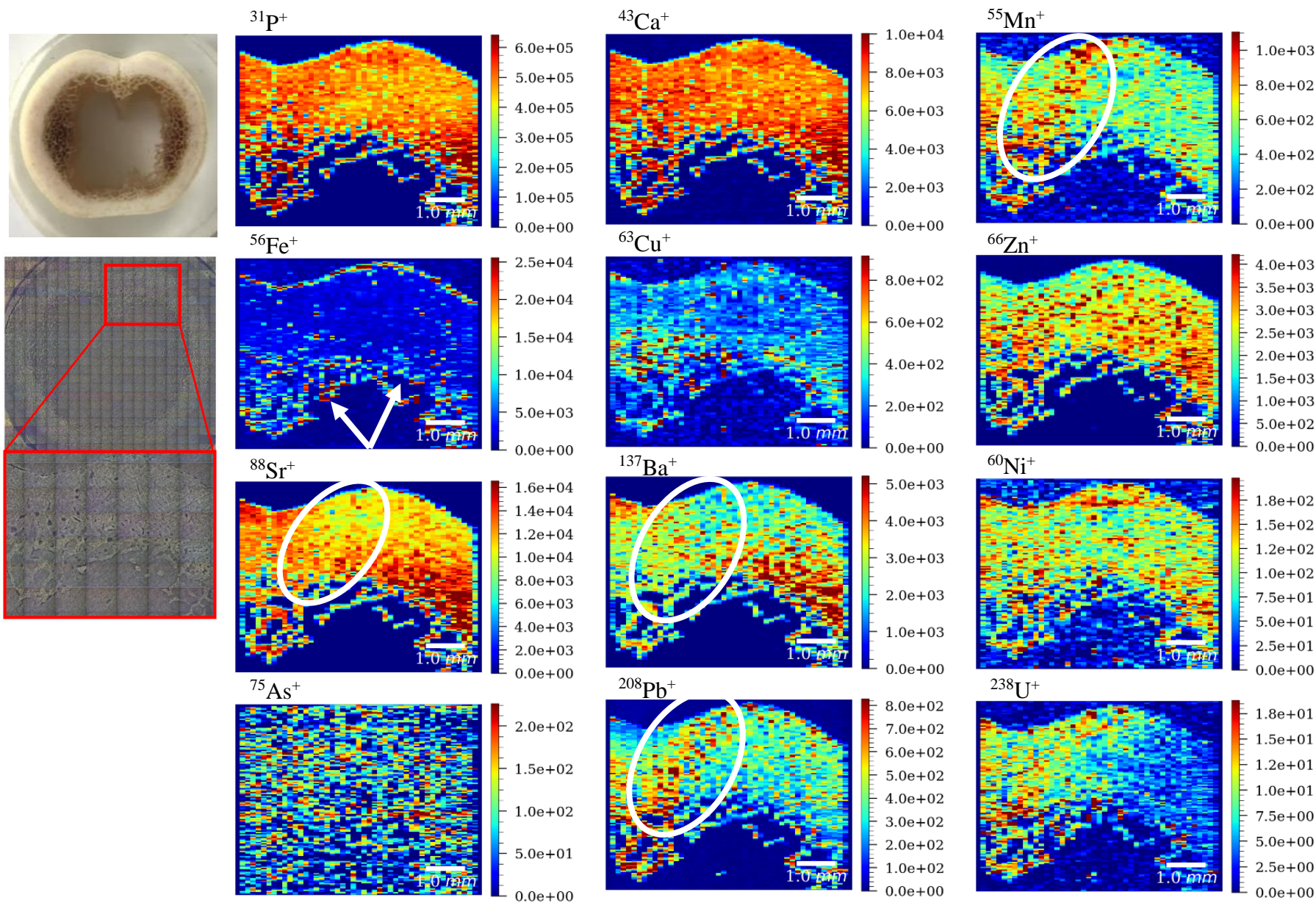
Distribuční mapy všech sledovaných prvků u vzorku S4_5 (*obr. 28*), macerovaného v 3% roztoku NaOH, zcela kopírují trend pozorovatelný u referenčního vzorku S4_3. Pozornost by měla být věnována opětovné korelaci ve výskytu olova, uranu, manganu a železa (pásky označeny bílými šipkami). Díky podobnosti distribucí není předpokládán vliv 3% roztoku NaOH na přirozenou distribuci sledovaných prvků.



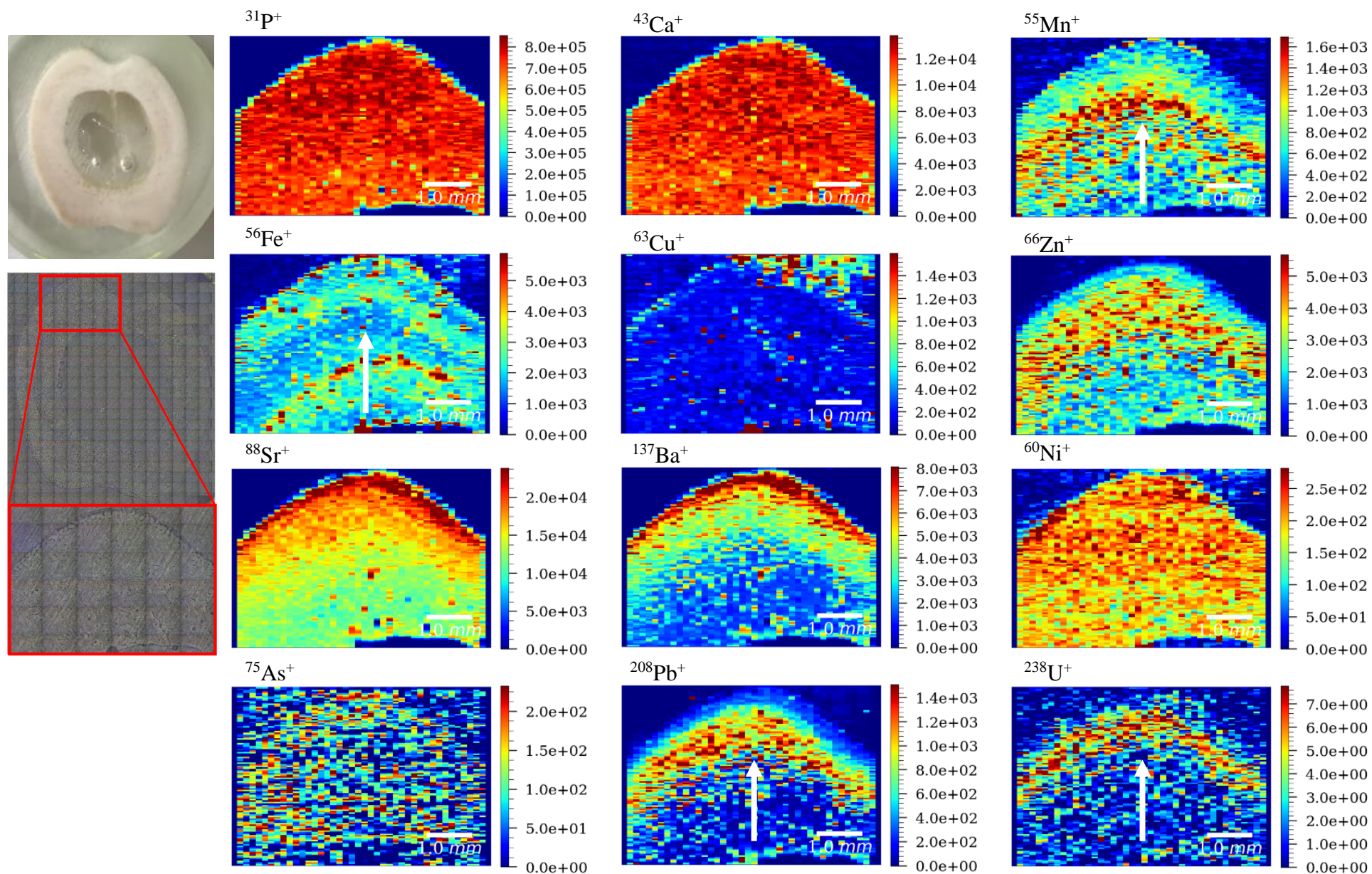
Obr. 25: Distribuce vybraných izotopů prvků získané pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S4_3 očištěného kožojedy. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.



Obr. 26: Distribuce vybraných izotopů prvků získané pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S4_1 podrobeného maceraci v roztoku kapsle do myčky. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.



Obr. 27: Distribúcie vybraných izotopů prvků získaná pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S4_4 podrobeného maceraci v savu. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.



Obr. 28: Distribuce vybraných izotopů prvků získaná pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S4_5 podrobeného maceraci v 3% roztoku NaOH. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.

4.2.2 Analýza vzorků kostí z kontaminované oblasti

Vzorek S3_3 očištěný kožojedy

Vzorek S3_3 (obr. 29) z kontaminovaného Příbramska, zbavený měkkých tkání využitím kožojedy, vykazuje podobné homogenní distribuce matričních prvků, zinku a niklu po celém povrchu řezu kostí jako referenční vzorek S4_3 z Liptovské Lúžně. Další analogie nastává i v distribuci železa a mědi, které se vyskytují ve vnějším lemu kosti (označeno bílými šipkami). Jejich přítomnost lze vidět i v pórech kosti spongiózní (zaznačeno bílými ovály), avšak v tomto případě se bude nejspíše opět jednat o nečistoty z pilky, které jsou po detailním zkoumání viditelné i na povrchu nábrusu. Výskyt stroncia a barya spolu sice souvisí, ale svou distribucí se liší od vzorků z Liptovské Lúžně. Distribuční mapy zobrazují jejich homogenitu po celé kompaktní části kosti, za což pravděpodobně zodpovídá přestavba kostí a případné stáří jedince. Rozdíl nastává i v lokalizaci výskytu olova a uranu, které se v tomto případě vyskytují po celém řezu. Ovšem nejvíce se olovo inkorporuje spolu s manganem do vnějšího okraje kosti (označeno bílými šipkami), který je stejně jako u referenčního vzorku S4_3 ochuzen o matriční prvky, stroncium a baryum kvůli možnému výskytu zbytků organické fáze.

Vzorek S3_1 macerovaný v roztoku kapsle do myčky

Distribuční mapy sledovaných prvků u vzorku S3_1 (obr. 30), macerovaného v roztoku kapsle do myčky, vykazují stejné trendy jako předchozí vzorek S3_3. Matriční prvky, stroncium a baryum vykazují homogenitu po celém řezu s výjimkou jejich absence na okraji vzorku. Rozdíl je pozorovatelný u distribuce olova, které se akumuluje v místech s nižšími intenzitami stroncia a barya (vyznačeno bílými ovály). Uranem je doprovázeno pouze ve spodní části vzorku (označeno bílými šipkami). Ani v tomto případě není zřetelný vliv macerace v roztoku kapsle na přirozenou distribuci prvků.

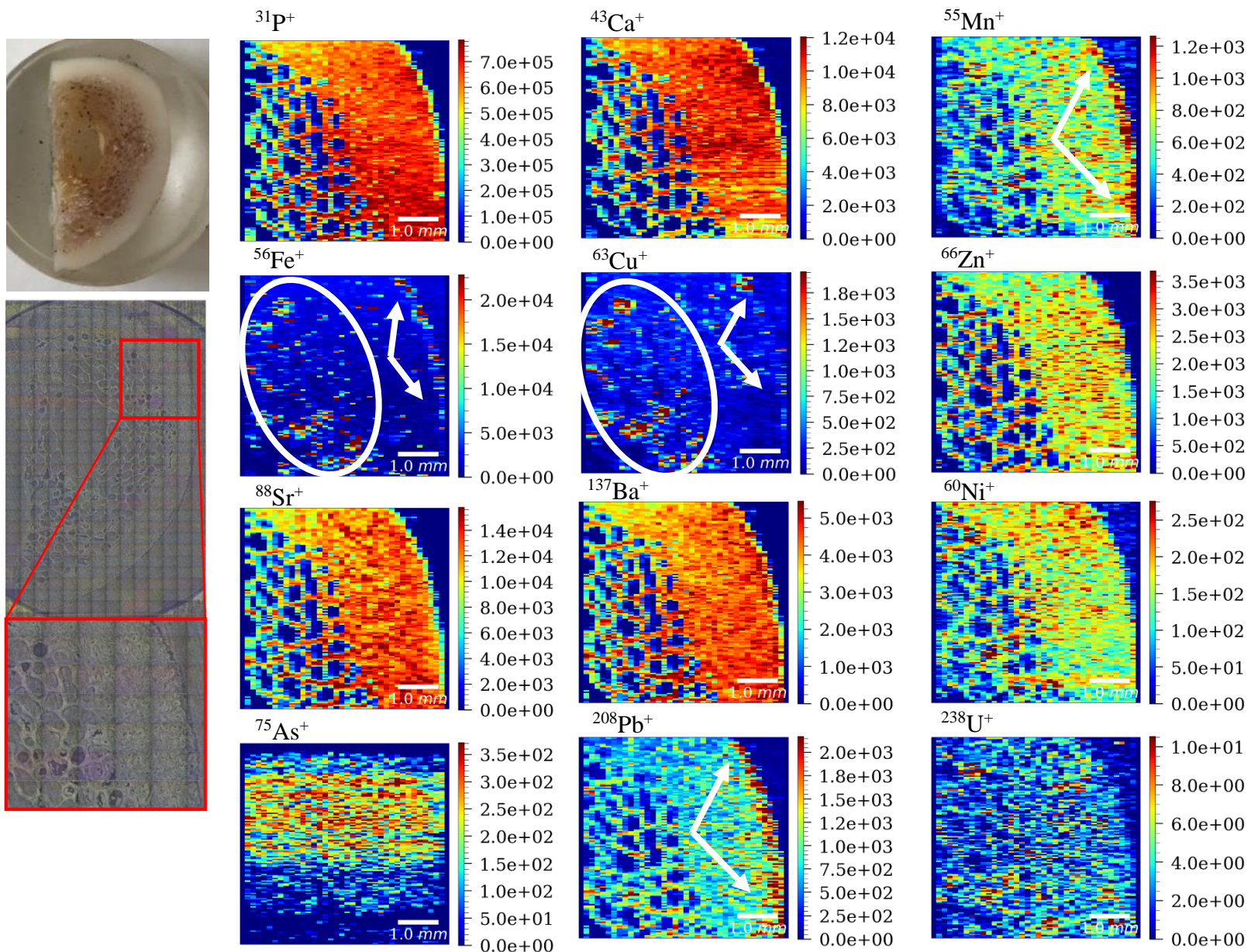
Vzorek S3_2 macerovaný v savu

K podobné distribuci olova jako u předchozího vzorku dochází i u vzorku S3_2 (obr. 31), macerovaného v savu. Uprostřed kosti je pozorovatelný pás olova a uranu, který koreluje s pásem o nižší intenzitě stroncia a barya (vyznačeno bílými ovály). Výjimku z trendu distribuce ostatních prvků sledovaného u vzorku S3_3 tvoří i nikl, který je kromě celého vzorku kumulován více i na vnějším okraji kosti (vyznačeno bílými šipkami). U tohoto vzorku jsou opět pozorovatelné nečistoty v dutinách spongiózní kosti, pravděpodobně způsobené pilkou. Obdoba distribuce prvků s distribucí pozorovanou u kosti S3_3 vede k závěru, že použitá macerační technika neovlivňuje přirozený výskyt prvků.

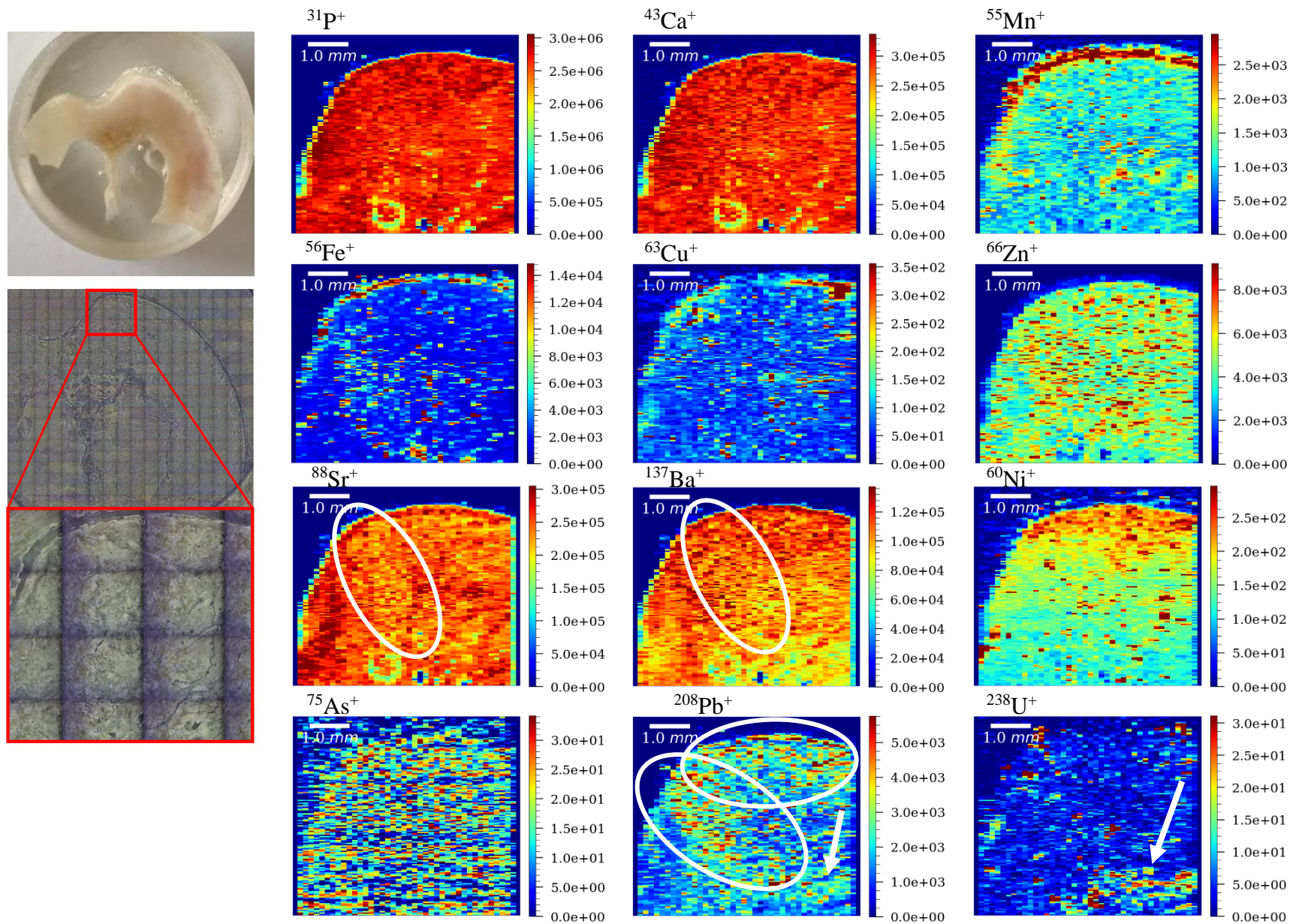
Vzorek S3_4 macerovaný v 3% roztoku NaOH

U posledního vzorku S3_4 (obr. 32), očištěného v 3% roztoku NaOH, je distribuce vybraných prvků téměř totožná s distribucí u vzorku S3_3, očištěného kožojedy, a tudíž lze konstatovat, že macerační technika nemá na distribuci přímý vliv. Výjimku tvoří pouze obohacený okraj kosti niklem a uranem (vyznačeno bílými šipkami).

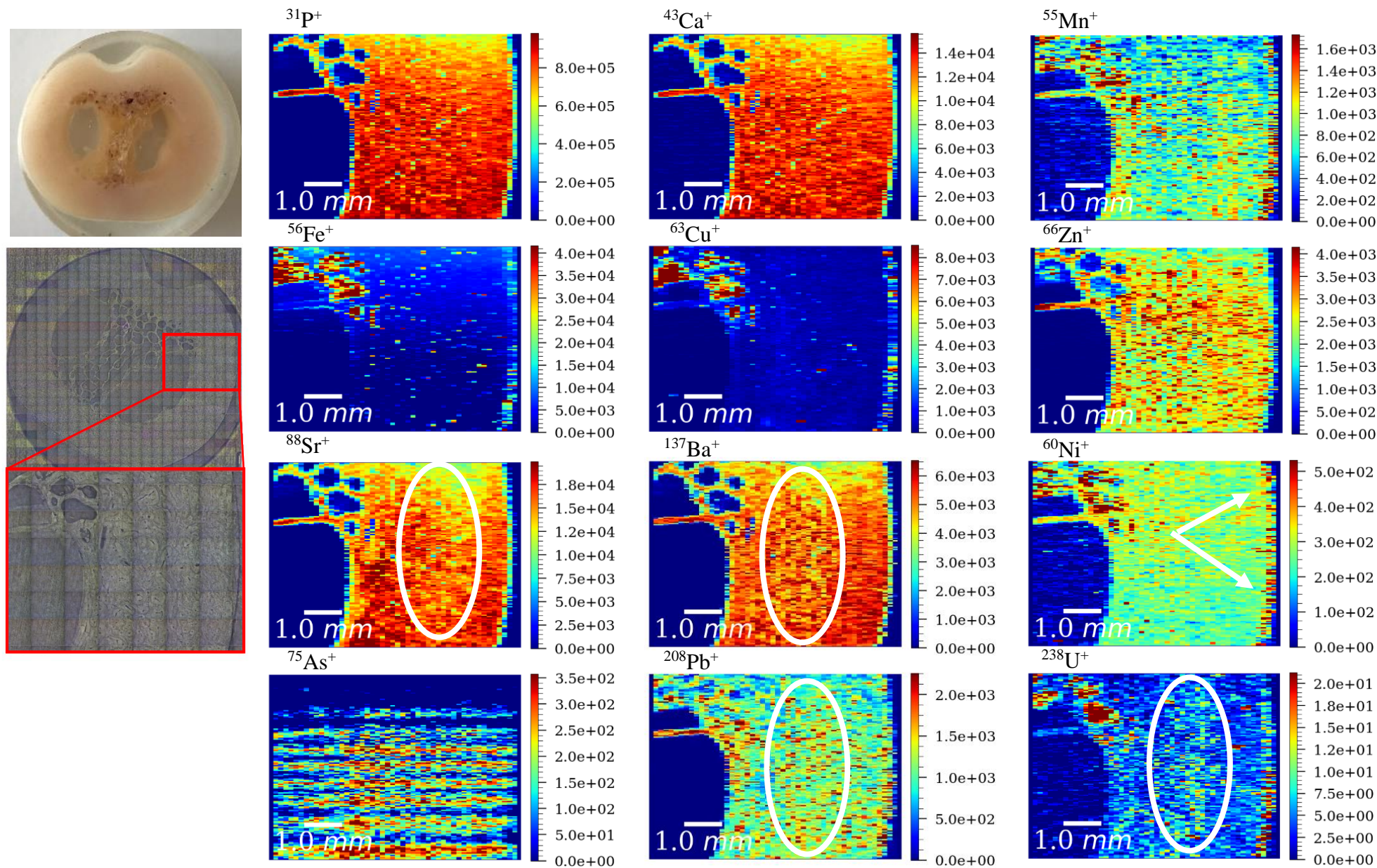
Pomocí metody LA-ICP-MS je tedy možné detekovat v kosterním materiálu kontaminanty životního prostředí a dokonce i zobrazovat jejich distribuci spolu s dalšími prvky po celém vzorku. Distribuce kontaminantů a prvků přirozeně se v kosti vyskytujících silně závisí na typu a části kosti. Důležitou roli hraje také komplexní kostní metabolismus a neustálá přestavba kosti, což způsobuje odchylky v pozorovaných trendech distribuce. Odchylky ve výsledcích tedy nebyly spojovány s použitými maceračními technikami, a tudíž lze konstatovat, že nemají na přirozenou prvkovou distribuci vliv. Avšak kvůli detekci prvků přirozeně vyskytujících se v organických fázích (pravděpodobně okostice, měkká tkáň či kolagen) lze říci, že macerační techniky ani využití kožojedů nebyly 100 % efektivní. Kost se sice jevila jako zcela očištěná, ale ultrastopová analýza potvrdila opak. Projevily se i nedostatky způsobené při přípravě nábrusů, kdy do pórovité spongiózní části kosti byly při řezání pilkou zaneseny detekovatelné nečistoty. Díky této skutečnosti byla v práci věnována pozornost především čisté kompaktní části kosti. Proto by bylo lepší lupénkovou pilku vůbec nevyužívat nebo znečištěný podíl povrchu řádně zbrousit a analyzovat vnitřní čistou část kosti.



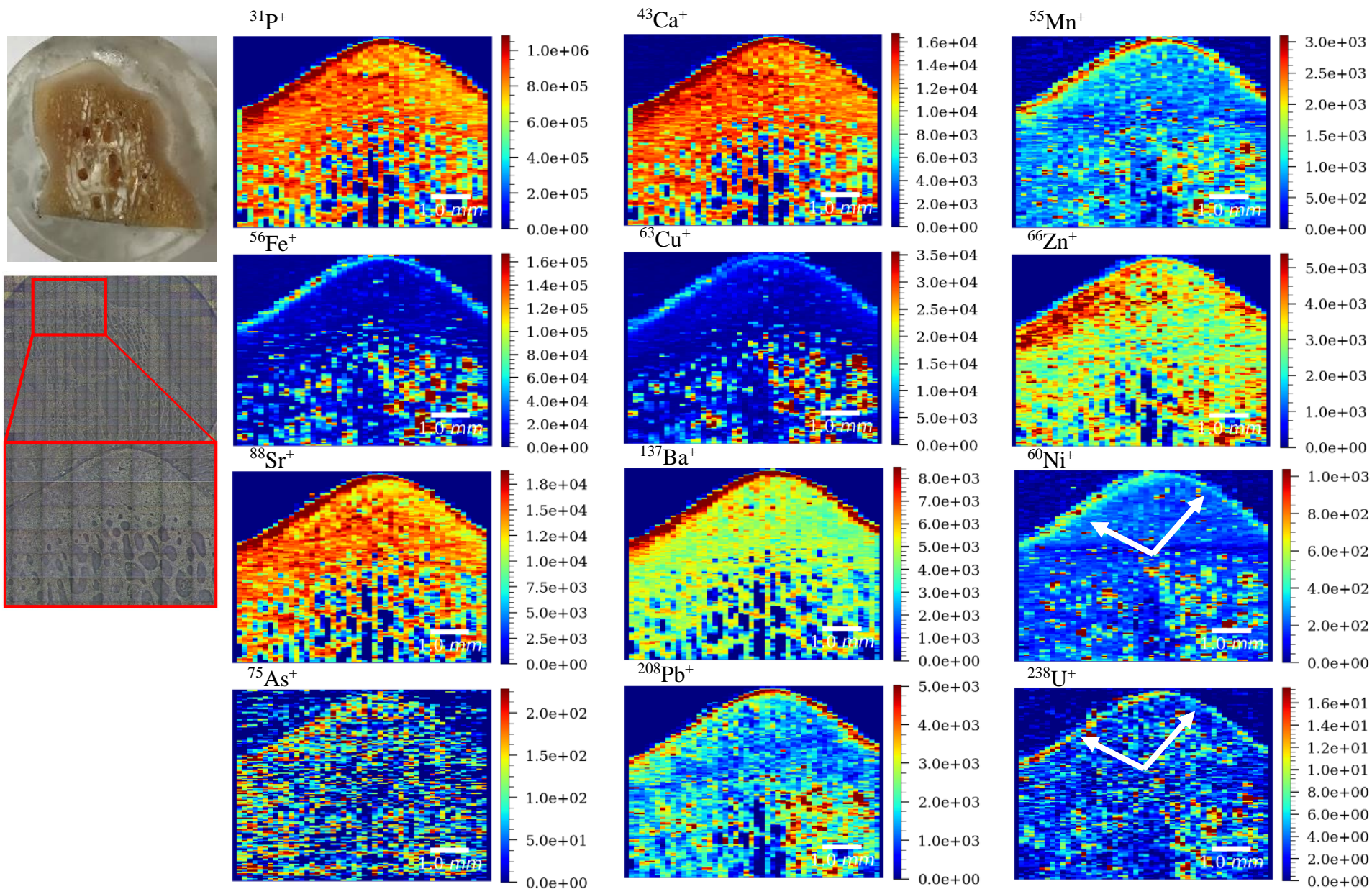
Obr. 29: Distribuce vybraných izotopů prvků získané pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S3_3 očištěného kožojedy. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.



Obr. 30: Distribuce vybraných izotopů prvků získané pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S3_1 podrobeného maceraci v roztoku kapsle do myčky. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.



Obr. 31: Distribuce vybraných izotopů prvků získaná pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S3_2 podrobeného maceraci v savu. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.



Obr. 32: Distribuce vybraných izotopů prvků získaná pomocí LA-ICP-MS ve vzorku S3_4 podrobeného maceraci v 3% roztoku NaOH. Barevná škála odpovídá vzrůstajícím hodnotám intenzit (cps) korespondující s rostoucím obsahem prvků.

4.2.3 Bodová analýza

V předchozí fázi experimentu se povedlo vizualizovat prvkovou distribuci v kostech na základě výsledných intenzit jednotlivých izotopů prvků. Cílem bodové analýzy byla snaha dosáhnout nižších limitů detekce s použitím širšího laserového svazku a následně provést kvantifikaci, tedy výpočet obsahů jednotlivých prvků. Linie bodů byla vedena přes vzorek kosti tak, aby procházela kompaktní i spongiózní kostí, tedy celým profilem kosti. Z distribučních map je zřetelné, že macerační techniky neovlivnily prvkové složení kosti, jehož odchylky spíše souvisí s komplexním kostním metabolismem. Z tohoto důvodu budou v práci komentovány výsledky bodové analýzy pouze u dvou vzorků jakožto zástupců z vybraných lokalit. Grafické znázornění výsledků bodových analýz ostatních vzorků lze nalézt v příloze (*příloha 1–6*). Ze sady vzorků z nekontaminované Liptovské Lúžně byl vybrán vzorek S4_3 očištěný kožojedy. Ze skupiny vzorků z kontaminovaného Příbramska byl vybrán vzorek S3_3, u kterého též došlo k odstranění měkkých tkání kožojedy. Hodnoty obsahů prvků ve SRM NIST 1486 potřebné pro kvantifikaci byly převzaty z databáze GeoReM [77]. Obsahy prvků v profilu kosti jsou znázorněny grafickou závislostí obsahu prvků v mg/kg na vzdálenosti mezi jednotlivými body v mm (*obr. 34, obr. 36*). Do grafů jsou též zaneseny limity detekce jednotlivých prvků, značené přerušovanou čarou. V některých případech nejsou přerušované čáry v grafu zcela viditelné, jelikož jsou limity detekce v porovnání s obsahy prvků velmi nízké, a proto jsou jejich hodnoty uvedené i v *tabulce 12*.

Tabulka 12: Limity detekce

prvek	limit detekce (mg/kg)
P	40
Ca	3561
Cr	0,004
Mn	0,04
Fe	0,4
Ni	0,003
Cu	0,03
Zn	0,9
As	0,002
Sr	0,06
Ba	0,09
Pb	0,03
U	0,006

Vzorek S4_3 očištěný kožojedy

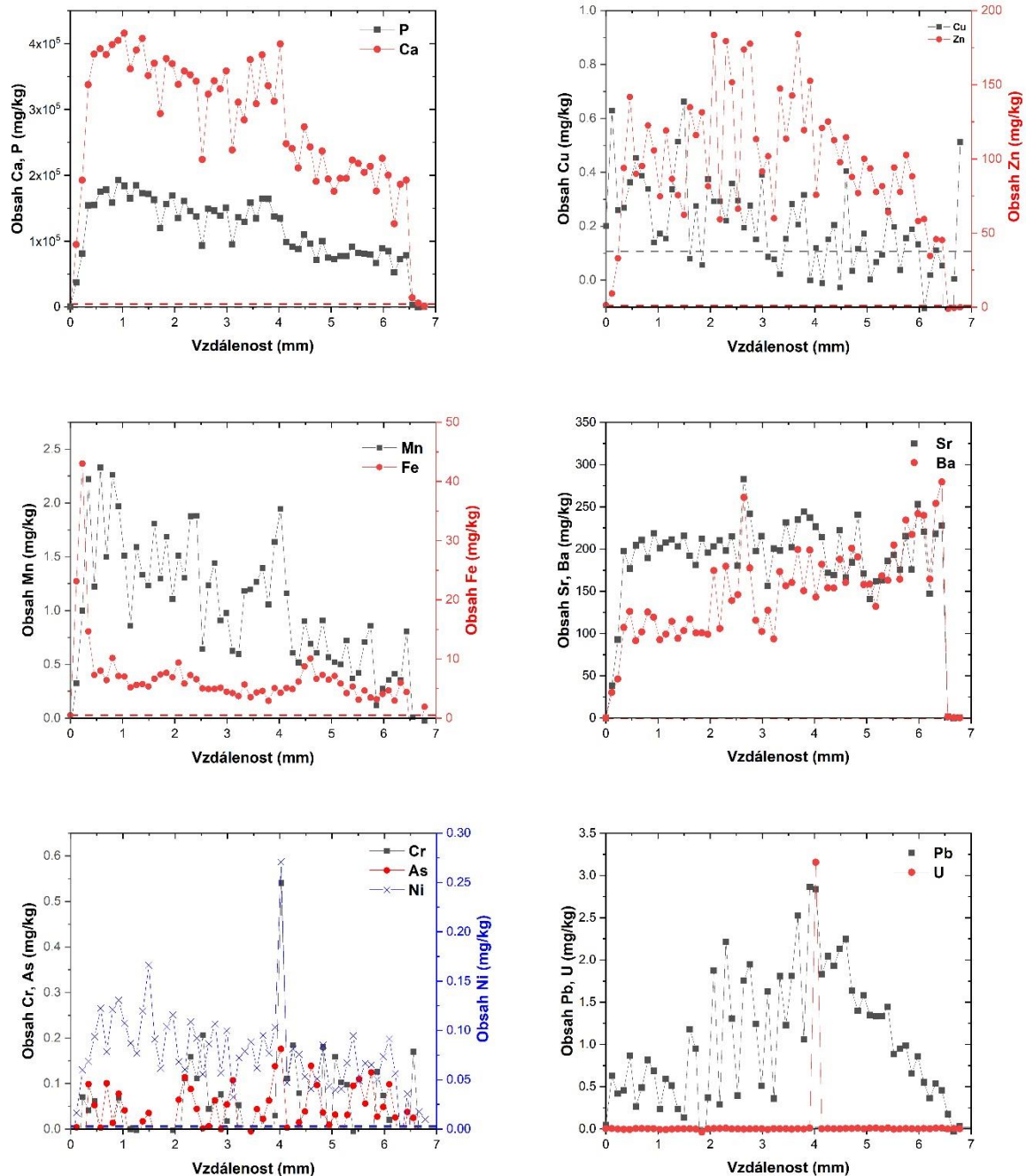
Body na vzorku S3_4 z Liptovské Lužné, který je považován za referenční, tvoří profil pravé dolní části kosti. Na *obr. 33* lze vidět detailní zobrazení linie a její lokalizaci. V tomto případě je velmi těžko rozlišitelný přechod mezi kostí kompaktní a spongiózní, protože není viditelná hustá síť pórů, která je pro spongiózní kost charakteristická. Ablace u vzorku S4_3 probíhala od dutiny kosti směrem k vnějšímu okraji (značeno bílou šipkou).



Obr. 33: Linie bodů umístěná na vzorku S4_3 z Liptovské Lužně.

Procentuální obsah fosforu odpovídá přibližně $16,8 \pm 2,5$ %, vápník se svým obsahem pohybuje okolo $37,8 \pm 3,4$ %. Poměr Ca/P odpovídá 2,2, což je v souladu s hodnotami zmíněnými v teoretické části. Obsah matričních prvků Ca a P se směrem k povrchu kosti snižuje (*obr. 34*). Na *obr. 33* lze pozorovat u okraje necelistvost kosti a větší prostory mezi lamelami, což může odpovídat nižšímu obsahu těchto prvků, jelikož ablatované body zabírají jak prázdné prostory, tak i kost. U vzorků S4_1 a S4_4 (*příloha 1, příloha 2*) ze stejné sady je naopak pozorovatelný pokles obsahu matričních prvků směrem dovnitř kosti, jasně oddělující kompaktní kost a póry kosti spongiózní. Obsah barya (105 ± 10 mg/kg) a stroncia (203 ± 11 mg/kg) narůstá směrem k vnějšímu okraji kosti, stejně jako hodnoty intenzit na distribučních mapách (*obr. 25*). Obsah zinku (99 ± 23 mg/kg), manganu ($1,57 \pm 0,42$ mg/kg) a olova ($0,45 \pm 0,44$ mg/kg) je v celém profilu kosti velmi proměnný, ovšem je pozorovatelný jejich vyšší výskyt ve střední části

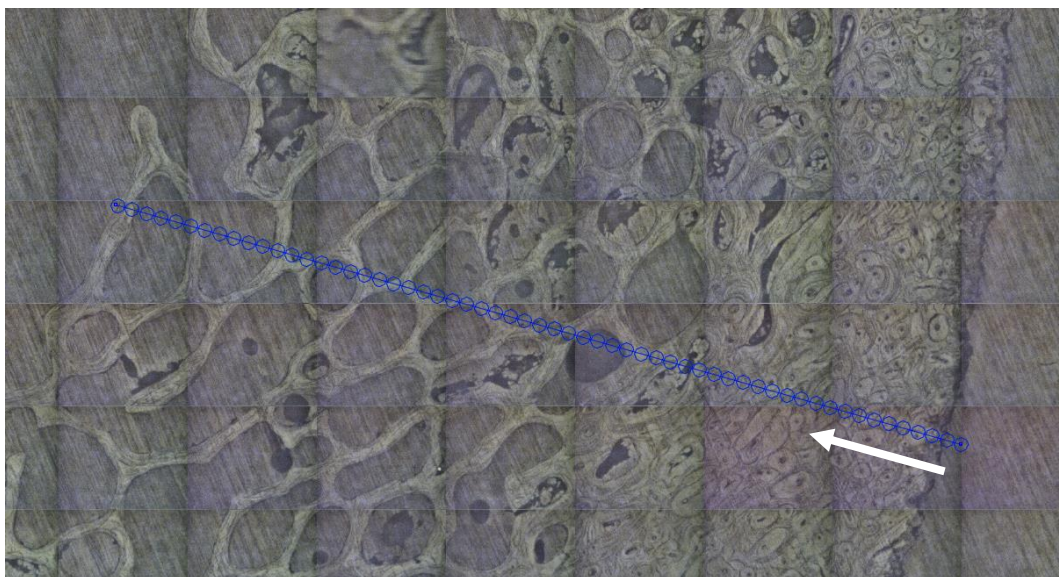
kosti, což koreluje s jejich distribučními mapami (obr. 25). Obsah železa v celém profilu kosti fluktuuje okolo hodnoty $6,8 \pm 1,2$ mg/kg a obsah niklu okolo hodnot $0,11 \pm 0,03$ mg/kg. Obsah mědi ($0,2 \pm 0,2$ mg/kg) se pohybuje těsně kolem limitu detekce, stejně tak obsah uranu, který je v kosti přítomný v tisícinách mg/kg. Bodovou analýzou se ale povedlo detekovat chrom, jehož obsah v kosti činí $0,05 \pm 0,07$ mg/kg. Sledovaným kontaminantem byl také arsen, který vykazuje obsah ($0,01 \pm 0,05$ mg/kg) v blízkosti a pod limitem detekce.



Obr. 34: Grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) ve vzorku S4_3 z Liptovské Lúžně na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

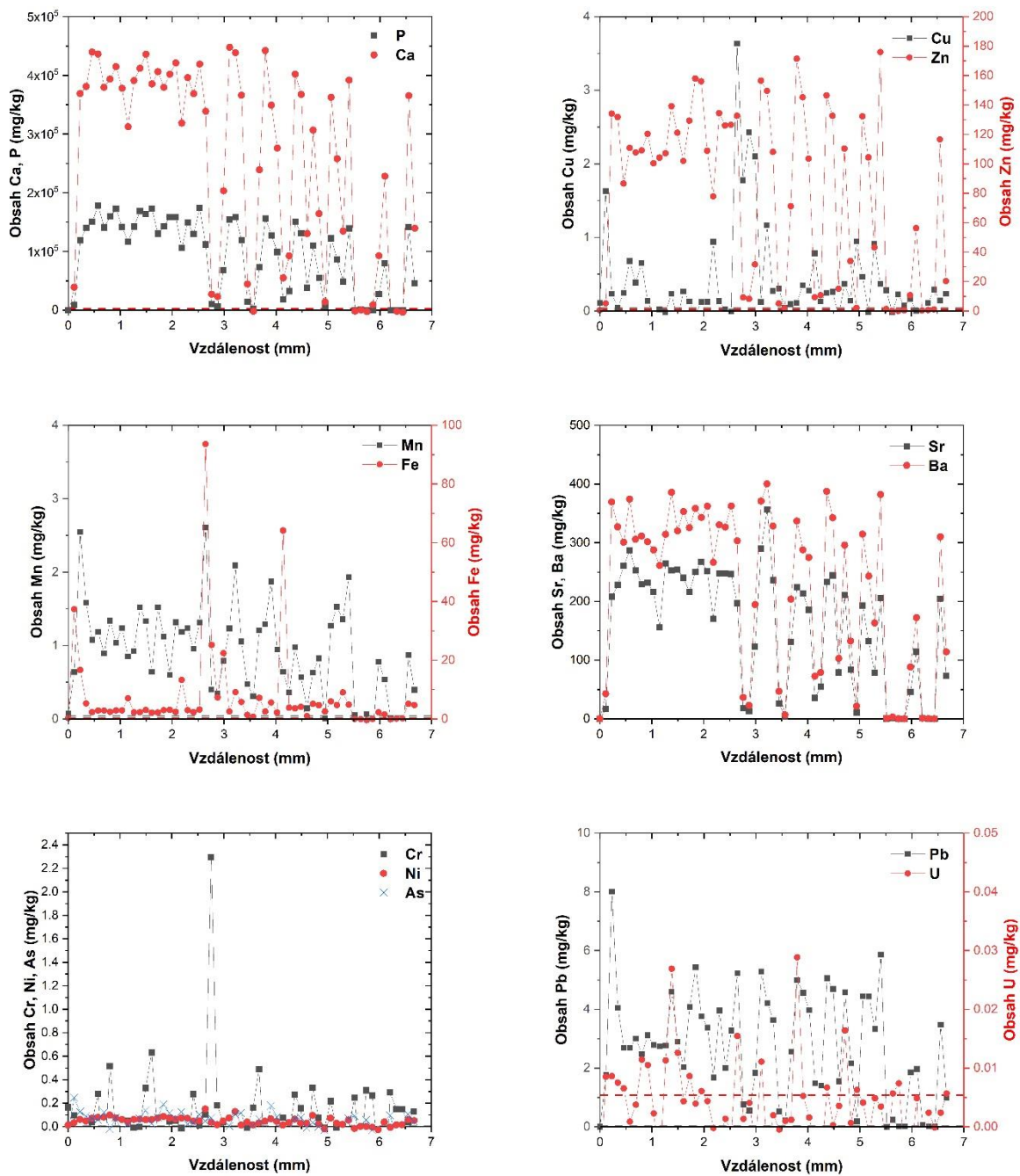
Vzorek S3_3 očištěný kožojedy

Linie bodů směřující z vnější části kosti do vnitřní (označeno bílou šipkou) na vzorku S3_3 pocházejícího z kontaminovaného Příbramska je zobrazena na obr. 35.



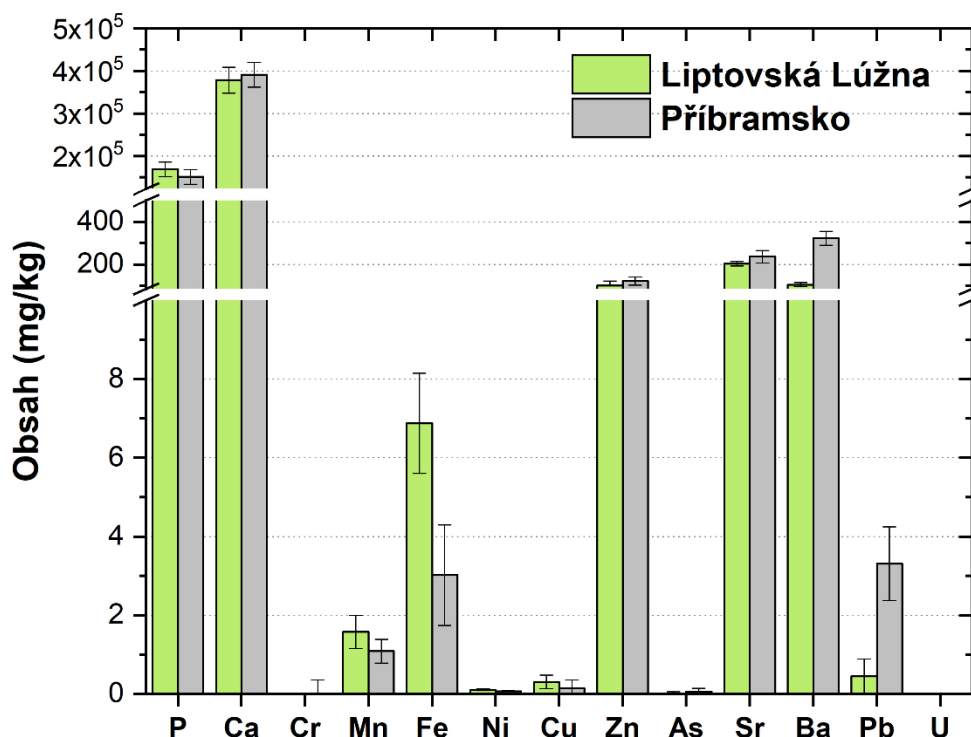
Obr. 35: Linie bodů umístěná na vzorku S3_3 z Příbramska.

Na kosti je tentokrát lehce rozlišitelná kost kompaktní a póry kosti spongiózní. Na grafu s vyznačenými obsahy matričních prvků (obr. 36) lze tento rozdíl vidět na první pohled. Od počátku linie až do cca 3 mm vypovídají hodnoty procentuálního obsahu prvků (fosfor $5,2 \pm 2,1$ %, vápník $39,1 \pm 3,2$ %, poměr Ca/P odpovídá 2,6) o výskytu homogenního kosterního materiálu. Část grafu, na které jsou pozorovány výrazné odchylky v hodnotách obsahu matričních prvků, odpovídá právě pórům, ve kterých se nachází pouze pryskyřice bez apatitové fáze, a proto se uváděné obsahy prvků týkají především kompaktní části kosti. Tento trend lze pozorovat i u obsahů stroncia (236 ± 29 mg/kg), barya (322 ± 32 mg/kg), zinku (121 ± 20 mg/kg) a manganu ($1,09 \pm 0,34$ mg/kg). U mapování vzorku S3_3 byl problém s nečistotami zanesenými do pórů spongiózní kosti při přípravě nábrusu. Avšak z obr. 35 je patrné, že póry, kterými procházejí body, nejsou kontaminované. To potvrzuje i téměř nulový obsah železa a olova okolo 6. mm linie, který pozitivně koreluje s nulovým obsahem matričních prvků, odpovídající pouze ablaci pryskyřice. V kompaktní části kosti je obsah železa $3,0 \pm 1,3$ mg/kg, u olova jsou to hodnoty $3,31 \pm 0,94$ mg/kg a obsah mědi odpovídá $0,14 \pm 0,21$ mg/kg. Byl detekován i uran, jehož obsah ($0,008 \pm 0,008$ mg/kg) fluktuuje okolo hodnot detekčního limitu. Stejně je tomu i u chromu, jehož obsah činí $0,012 \pm 0,342$ mg/kg. V blízkosti detekčního limitu se nachází i nikl s obsahem $0,069 \pm 0,15$ mg/kg se kterým koreluje obsah arsenu $0,05 \pm 0,09$ mg/kg,



Obr. 36: Grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) ve vzorku S3_3 z Příbramska na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

Graf na obr. 37 shrnuje obsah prvků ve vzorcích kostí srnce S4_3 z nekontaminované Liptovské Lúžně a srnce S3_3 z kontaminovaného Příbramska.



Obr. 37: Graf znázorňující obsah jednotlivých prvků ve vzorku S4_3 z Liptovské Lúžně a vzorku S4_3 z Příbramska.

Pokud se vezmou v potaz i směrodatné odchylky, obsahy některých prvků (fosfor, vápník, mangan, nikl, měď, zinek, stroncium a nikl) v kostech z obou zmíněných lokalit vykazují stejné hodnoty. Baryum vykazuje téměř dvakrát vyšší hodnoty u vzorku z Příbramska. Jak už bylo zmíněno u popisu distribučních map vzorku S3_3 z Liptovské Lúžně, vyšší obsah železa bude pravděpodobně souviset s přítomností většího množství zbytků krvavých tkání po okraji kosti, které jsou viditelné na obr. 15. Obsah chromu, arsenu, uranu se u obou vzorků pohyboval v těsné blízkosti limitů detekce. Jejich obsah je ve vzorku kosti S3_3 z Příbramska sice vyšší, avšak se jedná o tisíce až setiny (u chromu i desetiny) mg/kg. Výraznější rozdíl je pozorovatelný u obsahů olova, kdy je jeho obsah v kosti pocházející z Příbramska téměř 4krát vyšší než u vzorku S3_4 z Liptovské Lúžně. Ovšem stále se jedná pouze o jednotky mg/kg.

Obsahy maticních prvků a zinku odpovídají hodnotám uvedeným v teoretické části. U barya, stroncia, železa a mědi nastává rozdíl od uváděných hodnot, jelikož obsahy těchto prvků jsou silně spjaty s přijímanou stravou, která je u zvířat výrazně jiná než u lidí, pro jejichž kosti jsou hodnoty obsahů prvků v teoretické části uváděny. Obsahy stroncia a barya v kostech zkoumaných srn jsou cca 2x vyšší než norma pro lidské kosti, u mědi a zinku jsou obsahy naopak nižší. Dalším sledovaným prvkem, který se do kosti může ve stopovém množství inkorporovat skrze potravu je chrom, jehož obsah u zkoumaných vzorků nepřesahuje normu. U niklu, arsenu a olova se hovoří jen o negativním vlivu na kostní tkáň, a proto by měl být výskyt těchto prvků v kosti alarmující.

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly analyzovány řezy kostí srnce z Liptovské Lúžně, jakožto oblasti bez známé kontaminace, a Příbramska, lokality kontaminované především kovy z těžebního průmyslu. Cílem práce bylo studium **maceračních technik** využívaných pro odstranění měkkých tkání z kosti, následné posouzení jejich vlivu na přirozenou prvkovou distribuci v kostech a zhodnocení **míry inkorporace kontaminantů** do struktury bioapatitu. Pomocí metody **LA-ICP-MS** byla liniovým mapováním sledována prvková distribuce v kosterním materiálu, která byla doplněna bodovou analýzou profilu vzorků za účelem kvantifikace.

Kosti končetin byly poskytnuty ve svém původním stavu, tudíž bylo nejdříve potřeba je od srsti a měkkých tkání očistit. K odstranění měkkých tkání byly vybrány různé techniky – **macerace** ve vodném roztoku **kapsle do myčky**, v **savu** a v **3% NaOH**. Cílem bylo určit, která technika využívaná k odstranění měkkých tkání je nejefektivnější a zároveň posoudit případný vliv macerací na přirozenou prvkovou distribuci v kosti. Za účelem porovnávání bylo tedy nutné vybrat rovněž metodu, při které nedochází ke styku kosti s chemikálií. Tento požadavek splňovalo využití kolonie **kožojedů šedých** na AV ČR v Brně. Pomocí všech výše uvedených technik došlo k dostatečnému očištění kostí, ovšem průběh metod byl rozdílný a časová náročnost procesů se odvíjela především od kondice tkání přítomných na kosti.

Zobrazení prvkové distribuce jednotlivých vzorků a následné srovnání macerovaných kostí s kontrolou, kterou představovalo očištění kožojedy, prokázalo, že žádná z **testovaných macerací nemá** na přirozenou prvkovou distribuci zřetelný **vliv**. Avšak každé metodě byly podrobeny pouze 2 vzorky, což nemusí přinášet prokazatelně jednostranné závěry.

Sledováním prvkové distribuce pomocí liniových skenů se podařilo detekovat jak prvky přirozeně se vyskytující v kosterním materiálu, tak prvky kosti cizí, alterované ze znečištěného životního prostředí. Byla pozorována **rozdílná prvková distribuce** mezi vzorky z Liptovské Lúžně a vzorky z Příbramska, stejně tak i v rámci každé sady. Odlišnosti byly v práci konstatovány, avšak je velmi těžké určit jejich přesný důvod, jelikož změny může zapříčinit mnoho faktorů jako neustálá remodelace kosti, typ kosti a například i stáří jedince.

Předmětem zájmu bylo především posouzení inkorporace vybraných kontaminantů do kosti, která díky schopnosti **akumulace kovů v bioapatitu** může sloužit jako jejich archiv. Z **distribučních map** je zjevná pozitivní korelace mezi výskytem olova a uranu v kompaktní kosti na místech ochuzených o stroncium a baryum. U niklu se jednalo spíše o rovnoměrnou distribuci o nízkých intenzitách v celém řezu kosti. Výskyt zmíněných prvků v pórech kosti spongiózní souvisel především se zanesenými nečistotami při řezání kostí. Arsen se u mapování nepovedlo dostatečně detekovat, a proto byla provedena i bodová analýza zajišťující upravenými parametry nižší limity detekce.

Bodová analýza prokázala **vyšší obsah** sledovaných **kontaminantů** v kosti srnce z **Příbramska**, přičemž nejvýraznější rozdíl se projevil v téměř **4krát vyšším obsahu olova**, pro jehož výskyt je tato lokalita známá.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HAP	hydroxyapatit
DECT	výpočetní tomografie s duální energií záření
AES	atomová emisní spektroskopie
ICP	indukčně vázané plazma
OES	optická emisní spektrometrie
LA-ICP-MS	laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu
LIBS	spektrometrie laserem buzeného plazmatu
XRF	rentgenová fluorescenční spektrometrie
RS	Ramanova spektroskopie
EMPA	elektronová mikrosonda
IR	infračervená spektroskopie
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
CRC	kolizně-reakční cela
SRM	standardní referenční materiál
AV ČR	Akademie věd České republiky

7 ZDROJE

- [1] GRIM, Miloš a Rastislav DRUGA. *Základy anatomie. 1., Obecná anatomie a pohybový systém*. Druhé, přepracované a rozšířené vydání. Praha: Galén, 2019. ISBN 978-80-7492-418-7.
- [2] NAJBRT, Radim. *Veterinární anatomie: učebnice pro vysoké školy veterinární*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1980.
- [3] GASSER, Jürg Andreas a Michaela KNEISSEL. Bone Physiology and Biology. In: Susan Y. SMITH, Aurore VARELA a Rana SAMADFAM, ed. *Bone Toxicology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [vid. 2023-01-24], *Molecular and Integrative Toxicology*, s. 27–94. ISBN 978-3-319-56190-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-56192-9_2
- [4] SVOBODA, Štěpán. *Náhrada části lidských kostí umělými materiály s využitím 3D tisku*. Brno, 2017. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství.
- [5] TICHÝ, František. *Histologie: cytologie a obecná histologie*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinárního lékařství, 2000. ISBN 978-80-85114-86-7.
- [6] MARIEB, Elaine Nicpon a Jon MALLATT. *Anatomie lidského těla*. Vyd. 1. Brno: CP Books, 2005. ISBN 978-80-251-0066-0.
- [7] HORKÝ, Drahomír, František TICHÝ a Emil MIKYSKA. *Veterinární histologie: Cytologie a obecná histologie*. 1. vyd. Praha: SPN, 1991. ISBN 978-80-85114-38-6.
- [8] VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. *Lékařská histologie I: cytologie a obecná histologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1860-9.
- [9] ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. *Přehled obecné histologie*. 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-80-210-5543-8.
- [10] JUNQUEIRA, L. Carlos, Robert O. KELLEY, Richard JELÍNEK a José. CARNEIRO. *Základy histologie*. 7. vyd., v ČR 1. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 978-80-85787-37-5.
- [11] WOPENKA, Brigitte a Jill D. PASTERIS. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2005, **25**(2), 131–143. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2005.01.008
- [12] KONO, Tetsuro, Toshiro SAKAE, Hiroshi NAKADA, Takashi KANEDA a Hiroyuki OKADA. Confusion between Carbonate Apatite and Biological Apatite (Carbonated Hydroxyapatite) in Bone and Teeth. *Minerals* [online]. 2022, **12**(2), 170. ISSN 2075-163X. Dostupné z: doi:10.3390/min12020170
- [13] ARAS, N. K., G. YILMAZ, S. ALKAN a F. KORKUSUZ. Trace elements in human bone determined by neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [online]. 1999, **239**(1), 79–86. ISSN 0236-5731, 1588-2780. Dostupné z: doi:10.1007/BF02349535

- [14] SMRČKA, Václav. *Trace elements in bone tissue*. Prague: Charles University in Prague, Karolinum Press, 2005. ISBN 978-80-246-1033-7.
- [15] HARKNESS, Jennifer S. a Thomas H. DARRAH. From the crust to the cortical: The geochemistry of trace elements in human bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta* [online]. 2019, **249**, 76–94. ISSN 00167037. Dostupné z: doi:10.1016/j.gca.2019.01.019
- [16] KOVAČIKOVÁ, Lenka a Jaroslav BRŮŽEK. Stabilní izotopy a bioarcheologie – výživa a sledování migrací v populacích minulosti (1). *Živa 1/2008*. nedatováno, 42–45.
- [17] CORRIERI, Brigida a Nicholas MÁRQUEZ-GRANT. What do Bones Tell us? The Study of Human Skeletons from the Perspective of Forensic Anthropology. *Science Progress* [online]. 2015, **98**(4), 391–402. ISSN 0036-8504, 2047-7163. Dostupné z: doi:10.3184/003685015X14470674934021
- [18] KATABA, Andrew, Shouta M. M. NAKAYAMA, Hokuto NAKATA, Haruya TOYOMAKI, Yared B. YOHANNES, John YABE, Kaampwe MUZANDU, Golden ZYAMBO, Ayano KUBOTA, Takehisa MATSUKAWA, Kazuhito YOKOYAMA, Yoshinori IKENAKA a Mayumi ISHIZUKA. An Investigation of the Wild Rat Crown Incisor as an Indicator of Lead (Pb) Exposure Using Inductively Couple Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Laser Ablation ICP-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2021, **18**(2), 767. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph18020767
- [19] RODRÍGUEZ, Juliana a Patricia Mónica MANDALUNIS. A Review of Metal Exposure and Its Effects on Bone Health. *Journal of Toxicology* [online]. 2018, **2018**, 1–11. ISSN 1687-8191, 1687-8205. Dostupné z: doi:10.1155/2018/4854152
- [20] TÁBORSKÁ, Eva a Jaromír SLÁMA. *Lékařská chemie I: obecná a anorganická chemie. 2.*, přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3790-8.
- [21] SKINNER, H. Catherine W. Mineralogy of Bones. In: Olle SELINUS, ed. *Essentials of Medical Geology* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013 [vid. 2023-04-01], s. 665–687. ISBN 978-94-007-4374-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-4375-5_30
- [22] KOURKOUMELIS, Nikolaos, Ioannis BALATSOUKAS a Margaret TZAPHLIDOU. Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. *Journal of Biological Physics* [online]. 2012, **38**(2), 279–291. ISSN 0092-0606, 1573-0689. Dostupné z: doi:10.1007/s10867-011-9247-3
- [23] HADJIPANTELI, A., N. KOURKOUMELIS, P. FROMME, J. HUANG a R.D. SPELLER. Evaluation of the 3D spatial distribution of the Calcium/Phosphorus ratio in bone using computed-tomography dual-energy analysis. *Physica Medica* [online]. 2016, **32**(1), 162–168. ISSN 11201797. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmp.2015.11.004
- [24] HADJIPANTELI, A, N KOURKOUMELIS, P FROMME, A OLIVO, J HUANG a R SPELLER. A new technique for the assessment of the 3D spatial distribution of the calcium/phosphorus ratio in bone apatite. *Physiological Measurement* [online]. 2013, **34**(11), 1399–1410. ISSN 0967-3334, 1361-6579. Dostupné z: doi:10.1088/0967-3334/34/11/1399

- [25] DERMIENCE, Michael, Georges LOGNAY, Françoise MATHIEU a Philippe GOYENS. Effects of thirty elements on bone metabolism. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2015, **32**, 86–106. ISSN 0946672X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtemb.2015.06.005
- [26] COYTE, Rachel M., Jennifer S. HARKNESS a Thomas H. DARRAH. The Abundance of Trace Elements in Human Bone Relative to Bone Type and Bone Pathology. *GeoHealth* [online]. 2022, **6**(6) [vid. 2023-04-17]. ISSN 2471-1403, 2471-1403. Dostupné z: doi:10.1029/2021GH000556
- [27] IYENGAR, G.V. a L. TANDON. *MINOR AND TRACE ELEMENTS IN HUMAN BONES AND TEETH* [online]. B.m.: International Atomic Energy Agency. 1999. Dostupné z: <https://www.osti.gov/etdweb/servlets/purl/20067517>
- [28] PETRONE, Pierpaolo, Michele GIORDANO, Stefano GIUSTINO a Fabio M. GUARINO. Enduring Fluoride Health Hazard for the Vesuvius Area Population: The Case of AD 79 Herculaneum. *PLoS ONE* [online]. 2011, **6**(6), e21085. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0021085
- [29] EZZO, Joseph A. Putting the „Chemistry" Back into Archaeological Bone Chemistry Analysis: Modeling Potential Paleodietary Indicators. *Journal of Anthropological Archaeology* [online]. 1994, **13**(1), 1–34. ISSN 02784165. Dostupné z: doi:10.1006/jaar.1994.1002
- [30] PANAHIFAR, Arash, L. Dean CHAPMAN, Lynn WEBER, Nazanin SAMADI a David M. L. COOPER. Biodistribution of strontium and barium in the developing and mature skeleton of rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* [online]. 2019, **37**(3), 385–398. ISSN 0914-8779, 1435-5604. Dostupné z: doi:10.1007/s00774-018-0936-x
- [31] CIOSEK, Žaneta, Karolina KOT a Iwona ROTTER. Iron, Zinc, Copper, Cadmium, Mercury, and Bone Tissue. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2023, **20**(3), 2197. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph20032197
- [32] ISHII, Chihiro, Shouta M.M. NAKAYAMA, Andrew KATABA, Yoshinori IKENAKA, Keisuke SAITO, Yukiko WATANABE, Yoshiki MAKINO, Takehisa MATSUKAWA, Ayano KUBOTA, Kazuhito YOKOYAMA, Hazuki MIZUKAWA, Takafumi HIRATA a Mayumi ISHIZUKA. Characterization and imaging of lead distribution in bones of lead-exposed birds by ICP-MS and LA-ICP-MS. *Chemosphere* [online]. 2018, **212**, 994–1001. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.08.149
- [33] WU, Cheng-Tien, Tung-Ying LU, Ding-Cheng CHAN, Keh-Sung TSAI, Rong-Sen YANG a Shing-Hwa LIU. Effects of Arsenic on Osteoblast Differentiation *in Vitro* and on Bone Mineral Density and Microstructure in Rats. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2014, **122**(6), 559–565. ISSN 0091-6765, 1552-9924. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1307832
- [34] ARSEN A JEHO SLOUČENINY (JAKO AS). *IRZ* [online]. 28. duben 2023. Dostupné z: <https://www.irz.cz/latky-v-irz/arsen-a-jeho-slouceniny-jako-as>

- [35] KEENAN, Sarah W. From bone to fossil: A review of the diagenesis of bioapatite. *American Mineralogist* [online]. 2016, **101**(9), 1943–1951. ISSN 0003-004X. Dostupné z: doi:10.2138/am-2016-5737
- [36] PROKEŠ, Lubomír. *Posmrtné změny a jejich význam při interpretaci pohřebního ritu: ke vztahu mezi archeologií a forenzními vědami*. Brno: ÚAM FF MU, 2007. *Archaeologia mediaevalis Moravica et Silesiana Supplementum*, 1. ISBN 978-80-239-9599-2.
- [37] MAIRS, Simon, Benjamin SWIFT a Guy N. RUTTY. Detergent: An Alternative Approach to Traditional Bone Cleaning Methods for Forensic Practice. *American Journal of Forensic Medicine & Pathology* [online]. 2004, **25**(4), 276–284. ISSN 0195-7910. Dostupné z: doi:10.1097/01.paf.0000147320.70639.41
- [38] AJAYI A*, EDJOMARIEGWE O, ISELAIYE O T. A Review of Bone Preparation Techniques for Anatomical Studies [online]. 2016, **2016**, 76–80. Dostupné z: doi:10.26637
- [39] HÁVA, Jiří. *Brouci čeledi kožojedovití (Dermestidae) České a Slovenské republiky =: Beetles of the family Dermestidae of the Czech and Slovak Republics*. Druhé, doplněné vydání = Second updated edition. Praha: Academia, 2021. *Zoologické klíče = Zoological keys*. ISBN 978-80-200-3241-6.
- [40] KREJČÍK, Stanislav. *Dermestes maculatus*. *BioLib.cz* [online]. 29. září 2013. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id221800/>
- [41] LEEPER, Bobbie J. *Evaluation of Current Methods of Soft Tissue Removal From Bone* [online]. B.m., 2016. Doctoral Dissertation. University of Pittsburgh. Dostupné z: <http://d-scholarship.pitt.edu/26725/>
- [42] TARBET HUST, Emily Siobhan a Meradeth H SNOW. The The Effects of Soft Tissue Removal Methods on Porcine Skeletal Remains. *New Florida Journal of Anthropology* [online]. 2021, **1**(2) [vid. 2022-10-30]. ISSN 2691-2260, 2691-2252. Dostupné z: doi:10.32473/nfja.v1i2.124117
- [43] ONWUAMA, Kenekwukwu Tobekwukwu, Sulaiman Olawoye SALAMI, Magdaline ALI a James Oliver NZALAK. Effect of Different Methods of Bone Preparation on the Skeleton of the African Giant Pouched Rat (*Cricetomys gambianus*). *International Journal of Morphology* [online]. 2012, **30**(2), 425–427. ISSN 0717-9502. Dostupné z: doi:10.4067/S0717-95022012000200011
- [44] SILVERMAN, Emily. *THE EFFECTS OF COMMON METHODS OF SOFT TISSUE REMOVAL ON SKELETAL REMAINS: A COMPARATIVE ANALYSIS* [online]. B.m., 2018. Graduate Student Theses, Dissertations, & Professional Papers. University of Montana. Dostupné z: <https://scholarworks.umt.edu/etd/11182>
- [45] A Comparison of Maceration Techniques for Use in Forensic Skeletal Preparations. *Journal of Forensic Investigation* [online]. 2015, **3**(1) [vid. 2022-10-31]. ISSN 23300396. Dostupné z: doi:10.13188/2330-0396.1000021

- [46] UHRE, Marie-Louise, Anne Marie ERIKSEN, Kim Pilkjær SIMONSEN, Arne Redsted RASMUSSEN, Benjamin Benn HJORT a Niels LYNNERUP. Enzymatic maceration of bone: a gentler technique than boiling. *Medicine, Science and the Law* [online]. 2015, **55**(2), 90–96. ISSN 0025-8024, 2042-1818. Dostupné z: doi:10.1177/0025802414532246
- [47] MAHON, Trisha-Jean, Nqobile MABOKE a Jolandie MYBURGH. The use of different detergents in skeletal preparations. *Forensic Science International* [online]. 2021, **327**, 110967. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/j.forsciint.2021.110967
- [48] MANN, Robert W. a Hugh E. BERRYMAN. A Method for Defleshing Human Remains Using Household Bleach: DEFLESHING HUMAN REMAINS USING HOUSEHOLD BLEACH. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2012, **57**(2), 440–442. ISSN 00221198. Dostupné z: doi:10.1111/j.1556-4029.2011.01987.x
- [49] JAROŠOVÁ, Monika, Petr SULOVSÝ a David MILDE. Současný stav a perspektivy spojení laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* [online]. 2016, (110 (11)), 769–778. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/136>
- [50] TAYLOR, Erik A. a Eve DONNELLY. Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties. *Bone* [online]. 2020, **139**, 115490. ISSN 87563282. Dostupné z: doi:10.1016/j.bone.2020.115490
- [51] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [52] WIRNKOR, Verla Andrew, Enyoh Christian EBERE a Verla Evelyn NGOZI. Microplastics, an Emerging Concern: A Review of Analytical Techniques for Detecting and Quantifying Microplastics. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal* [online]. 2019, **2**(2), 13–30. ISSN 2645-5382, 2645-5552. Dostupné z: doi:10.24200/amecj.v2.i2.57
- [53] CHAPPARD, Daniel, Bernard GUILLAUME, Gil TEMAN a Jean-Daniel KÜNDARBOIS. Raman spectroscopic analysis and imaging in two cases of benign cementoma: Comparison with dental and bone tissues. *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2020, **51**(7), 1044–1055. ISSN 0377-0486, 1097-4555. Dostupné z: doi:10.1002/jrs.5880
- [54] PASCHALIS, Eleftherios P., Richard MENDELSON a Adele L. BOSKEY. Infrared Assessment of Bone Quality: A Review. *Clinical Orthopaedics & Related Research* [online]. 2011, **469**(8), 2170–2178. ISSN 0009-921X. Dostupné z: doi:10.1007/s11999-010-1751-4
- [55] GOODGE, John. *Electron probe micro-analyzer (EPMA)* [online]. Dostupné z: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/EPMA.html
- [56] HRADILOVÁ, Janka a David HRADIL. *Neinvazivní průzkum malířských výtvarných děl radiografickými a rentgen-fluorescenčními metodami*. V Praze: Akademie výtvarných umění, 2015. ISBN 978-80-87108-60-4.

- [57] TOMÁŠEK, Vladimír a Viktor KANICKÝ. *Zásady a možnosti analýzy anorganických látek: učební text projektu „Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy“ : modul K01-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. ISBN 978-80-260-7238-6.
- [58] ZHANG, Xinxin, Aaron J. SPECHT, Ellen WELLS, Marc G. WEISSKOPF, Jennifer WEUVE a Linda H. NIE. Evaluation of a portable XRF device for in vivo quantification of lead in bone among a US population. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **753**, 142351. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142351
- [59] NZABANITA, Damien, Jordan O. HAMPTON, Simon D. TOOP, Andrew J. BENGEN, Aaron J. SPECHT, Jason S. FLESCHE, Jasmin HUFSCHEMID a Dayanthi NUGEGODA. Expanding the use of portable XRF to monitor lead exposure in an Australian duck species two decades after a ban on lead shot. *Science of The Total Environment* [online]. 2023, **869**, 161803. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.161803
- [60] VACULOVIČ, T. a K. NOVOTNÝ. *Laser-induced breakdown spectroscopy*. B.m.: Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Komenského náměstí 2, 662 43 Brno
- [61] HRDLIČKA, Aleš. LIBS v analýze archeologických materiálů. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015*. B.m.: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, nedatováno.
- [62] HOLÁ, Michaela. Laserová ablace v ICP spektrometrii. In: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem: Sborník přednášek 2015*. B.m.: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, nedatováno.
- [63] GALIOVÁ, Michaela. LA-ICP-MS a laterální mapování. In: *6. kurz ICP spektrometrie* [online]. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011. ISBN 978-80-904539-1-3. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/C7080/um/SBORNIK11_KOMPLET_1.pdf
- [64] RUSSO, R. Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta* [online]. 2002, **57**(3), 425–451. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(02)00053-X
- [65] OTRUBA, Vítězslav. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. In: *6. kurz ICP spektrometrie* [online]. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011. ISBN 978-80-904539-1-3. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/C7080/um/SBORNIK11_KOMPLET_1.pdf
- [66] JAKUBOWSKI, Norbert. Johanna Sabine Becker: Inorganic mass spectrometry. Principles and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **392**(5), 775–776. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-008-2374-4
- [67] KANICKÝ, Viktor a Vítězslav OTRUBA. Nespektrální interference. In: *6. kurz ICP spektrometrie* [online]. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011. ISBN 978-80-904539-1-3. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/C7080/um/SBORNIK11_KOMPLET_1.pdf

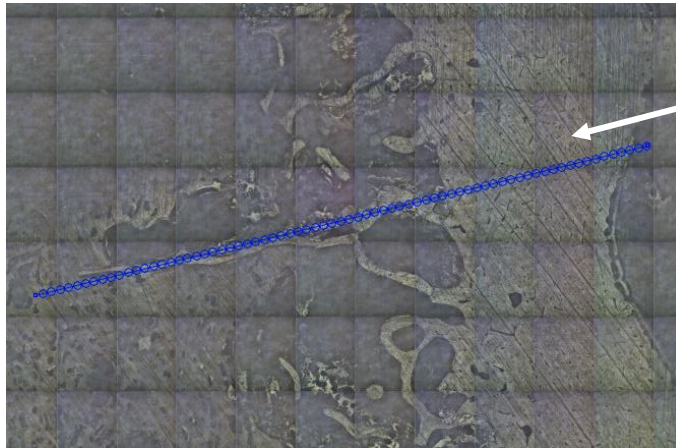
- [68] VACULOVIČ, Tomáš. Spektrální interference v ICP-MS. In: Vítězslav OTRUBA, ed. *6. kurz ICP spektrometrie* [online]. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011. ISBN 978-80-904539-1-3. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/C7080/um/SBORNIK11_KOMPLET_1.pdf
- [69] LOCOSSELLI, Giuliano Maselli, Katherine CHACÓN-MADRID, Marco Aurelio ZEZZI ARRUDA, Evelyn PEREIRA DE CAMARGO, Tiana Carla LOPES MOREIRA, Carmen Diva SALDIVA DE ANDRÉ, Paulo AFONSO DE ANDRÉ, Julio M. SINGER, Paulo Hilário NASCIMENTO SALDIVA a Marcos Silveira BUCKERIDGE. Tree rings reveal the reduction of Cd, Cu, Ni and Pb pollution in the central region of São Paulo, Brazil. *Environmental Pollution* [online]. 2018, **242**, 320–328. ISSN 02697491. Dostupné z: [doi:10.1016/j.envpol.2018.06.098](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.098)
- [70] DEVOS, W., Ch. MOOR a P. LIENEMANN. Determination of impurities in antique silver objects for authentication by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 1999, **14**(4), 621–626. ISSN 02679477, 13645544. Dostupné z: [doi:10.1039/a900073i](https://doi.org/10.1039/a900073i)
- [71] STADLBAUER, Christina, Christian REITER, Beatrix PATZAK, Gerhard STINGEDER a Thomas PROHASKA. History of individuals of the 18th/19th centuries stored in bones, teeth, and hair analyzed by LA-ICP-MS—a step in attempts to confirm the authenticity of Mozart's skull. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **388**(3), 593–602. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: [doi:10.1007/s00216-007-1266-3](https://doi.org/10.1007/s00216-007-1266-3)
- [72] AUSTIN, Christine, Dominic HARE, Andrew L. ROZELLE, William H. ROBINSON, Rudolf GRIMM a Philip DOBLE. Elemental bio-imaging of calcium phosphate crystal deposits in knee samples from arthritic patients. *Metallomics* [online]. 2009, **1**(2), 142. ISSN 1756-5901, 1756-591X. Dostupné z: [doi:10.1039/b901310p](https://doi.org/10.1039/b901310p)
- [73] DE SOUZA, Roseli M., Carlos A.T. TOLOZA a Ricardo Q. AUCÉLIO. Fast determination of trace metals in edible oils and fats by inductively coupled plasma mass spectrometry and ultrasonic acidic extraction. *Journal of Trace Elements and Minerals* [online]. 2022, **1**, 100003. ISSN 27730506. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jtemin.2022.100003](https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2022.100003)
- [74] PECINA, Václav, David JUŘIČKA, Michaela VAŠINOVÁ GALIOVÁ, Jindřich KYNICKÝ, Ludmila BALÁKOVÁ a Martin BRTNICKÝ. Polluted brownfield site converted into a public urban park: A place providing ecosystem services or a hidden health threat? *Journal of Environmental Management* [online]. 2021, **291**, 112669. ISSN 03014797. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jenvman.2021.112669](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112669)
- [75] KEBONYE, Ndiye M., Peter N. EZE, Kingsley JOHN, Prince C. AGYEMAN, Karel NĚMEČEK a Luboš BORŮVKA. An in-depth human health risk assessment of potentially toxic elements in highly polluted riverine soils, Příbram (Czech Republic). *Environmental Geochemistry and Health* [online]. 2022, **44**(2), 369–385. ISSN 0269-4042, 1573-2983. Dostupné z: [doi:10.1007/s10653-021-00877-3](https://doi.org/10.1007/s10653-021-00877-3)

[76] PECINA, Václav. *Soil contamination as one of the influences on afforestation after precious metals mining at selected bearings in central Europe* [online]. Brno, 2018. Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta. Dostupné z: <https://theses.cz/id/q6f3rh/>

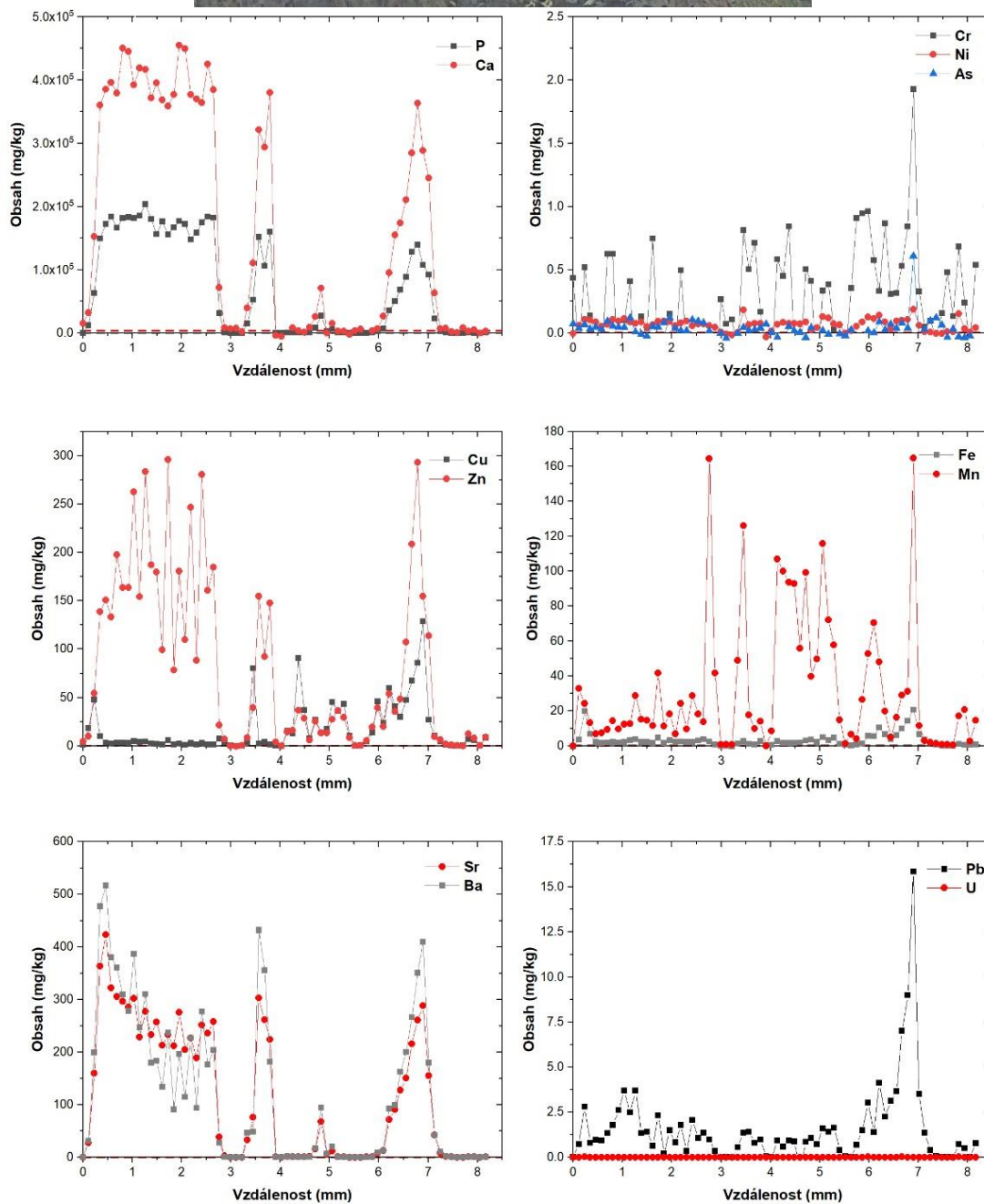
[77] *GeoReM* [online]. 20. květen 2023. Dostupné z: <http://georem.mpch-mainz.gwdg.de/>

8 PŘÍLOHY

a)

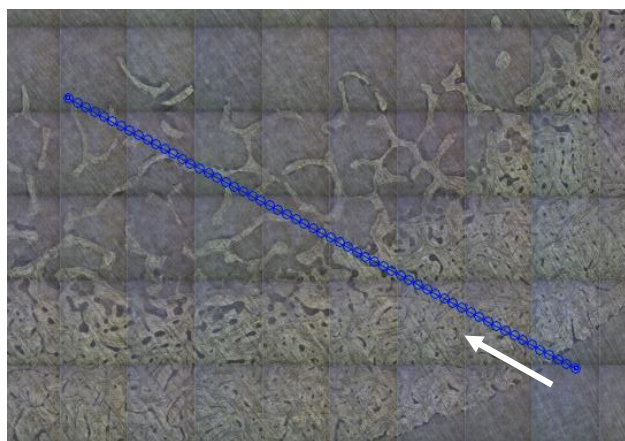


b)

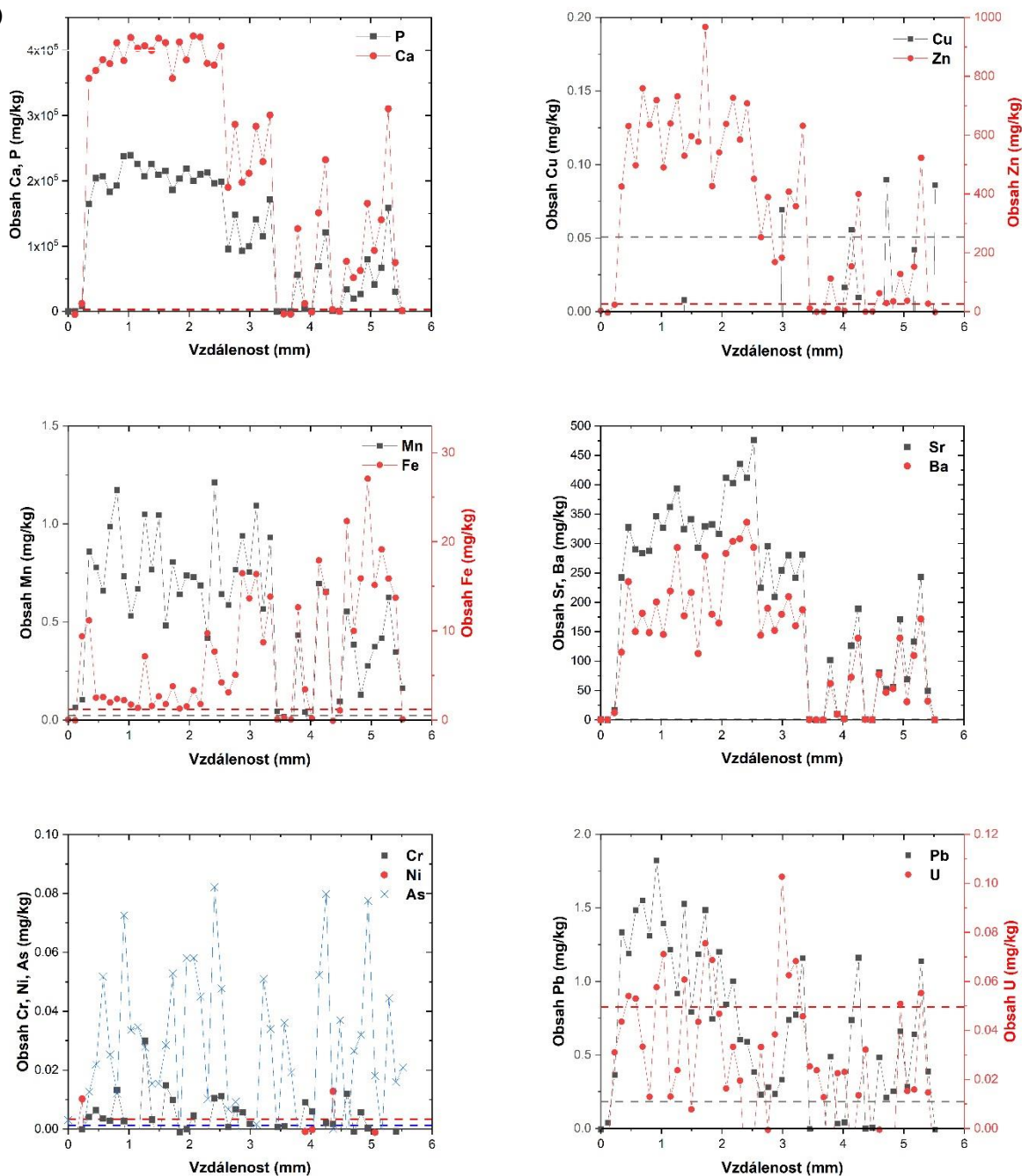


Příloha 1: Vzorek S4_1 z Liptovské Lúžně macerovaný v roztoku kapsle do myčky, a) line bodů umístěná na vzorku, b) grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

a)

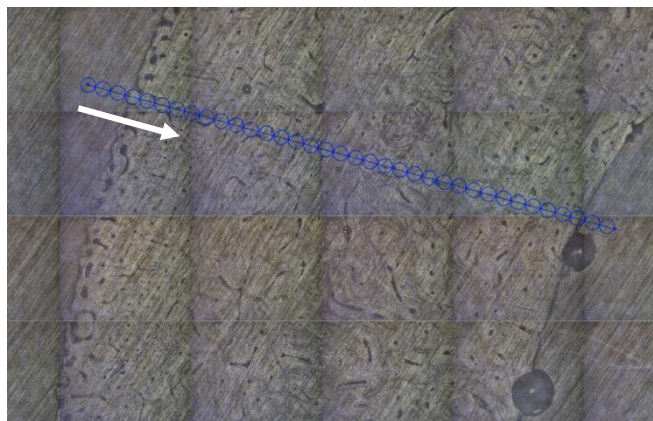


b)

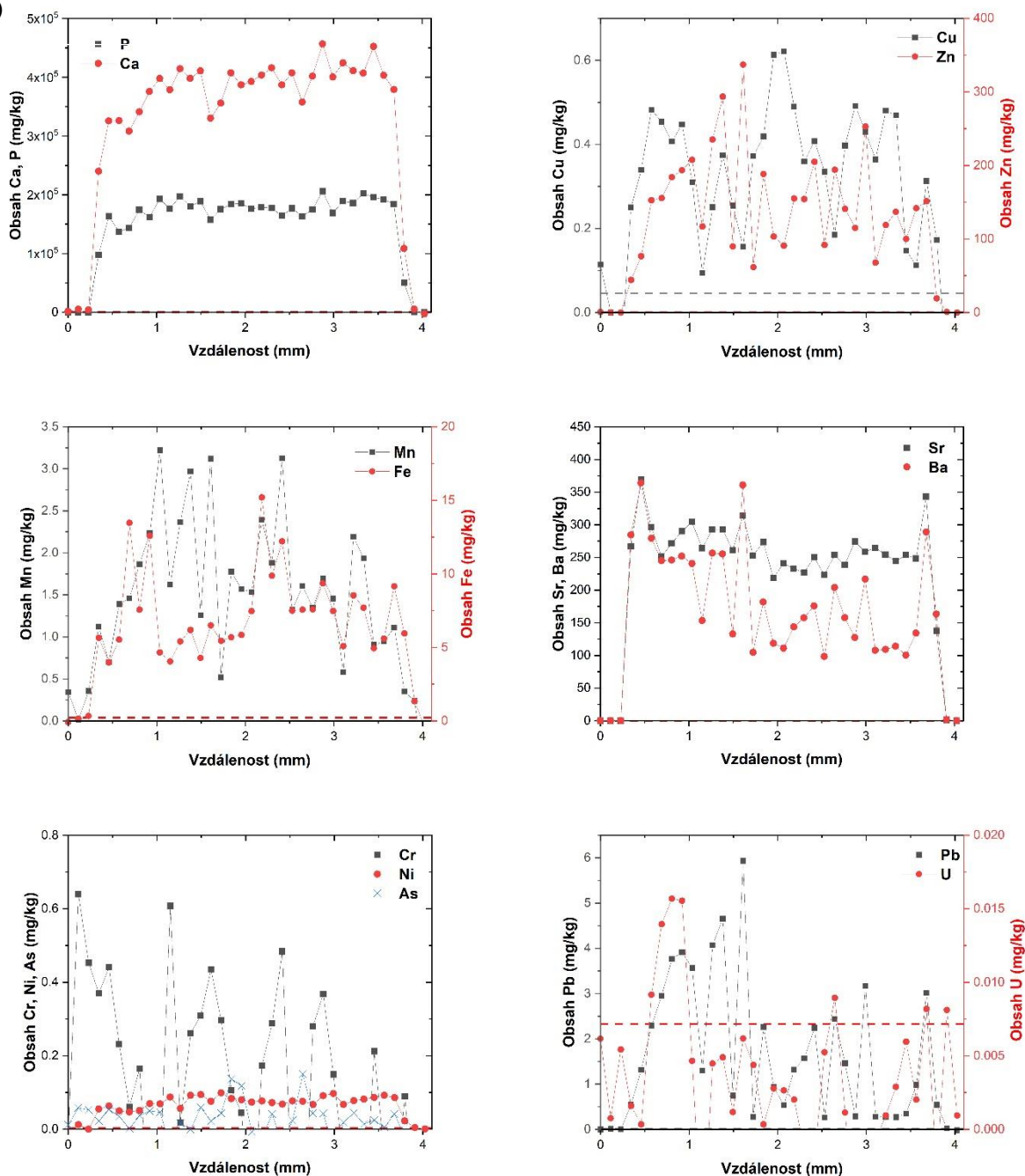


Příloha 2: Vzorek S4_4 z Liptovské Lúžně macerovaný v savu, a) linie bodů umístěná na vzorku, b) grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

a)

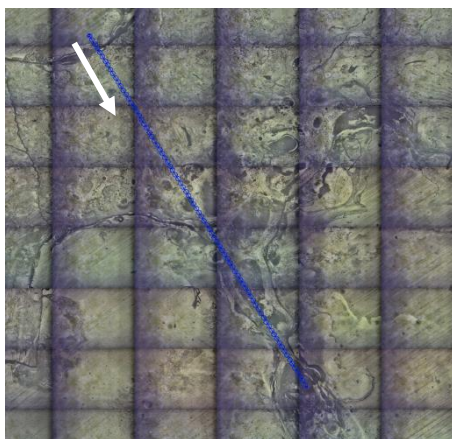


b)

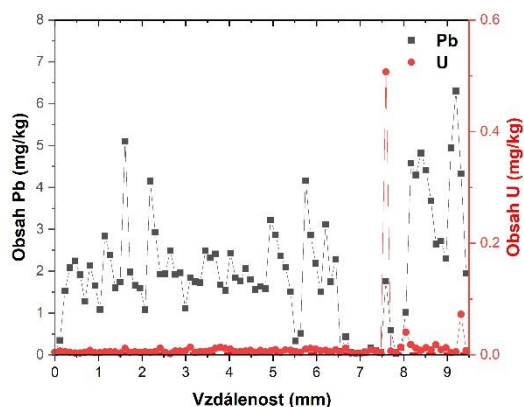
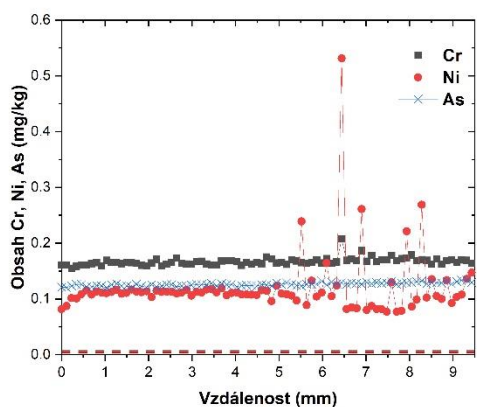
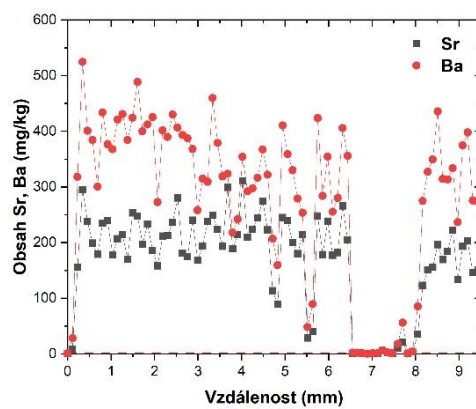
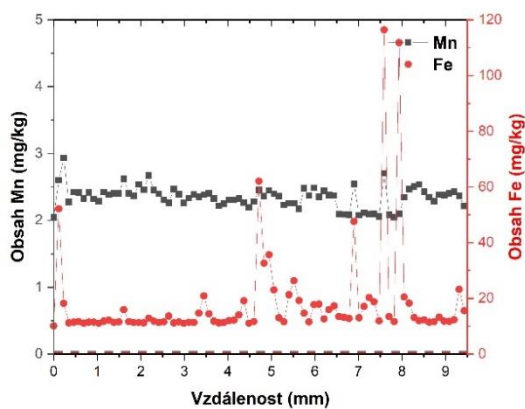
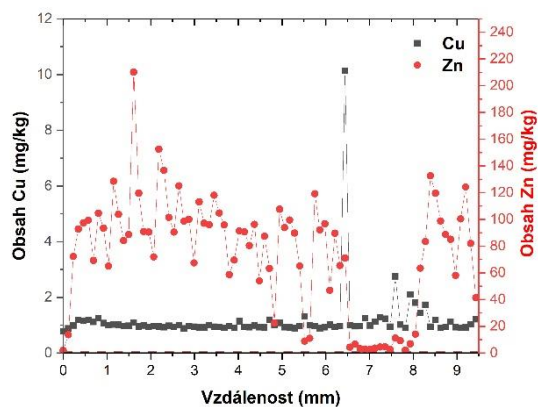
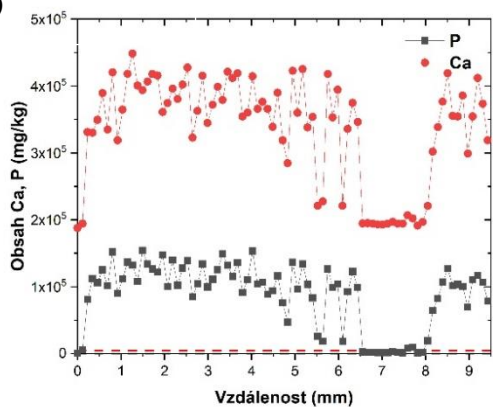


Příloha 3: Vzorek S4_5 z Liptovské Lúžně macerovaný v 3% NaOH, a) line bodů umístěná na vzorku, b) grafická závislost obsahu prvků (mg/kg) na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

a)

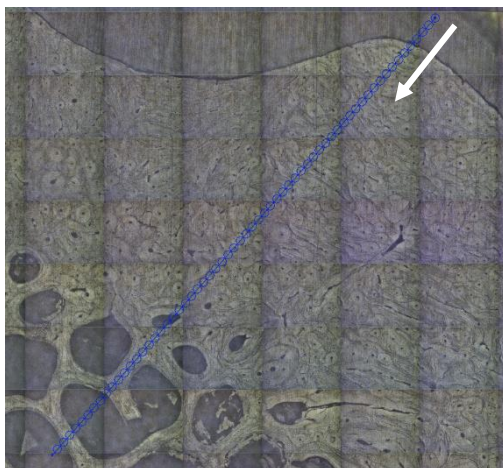


b)

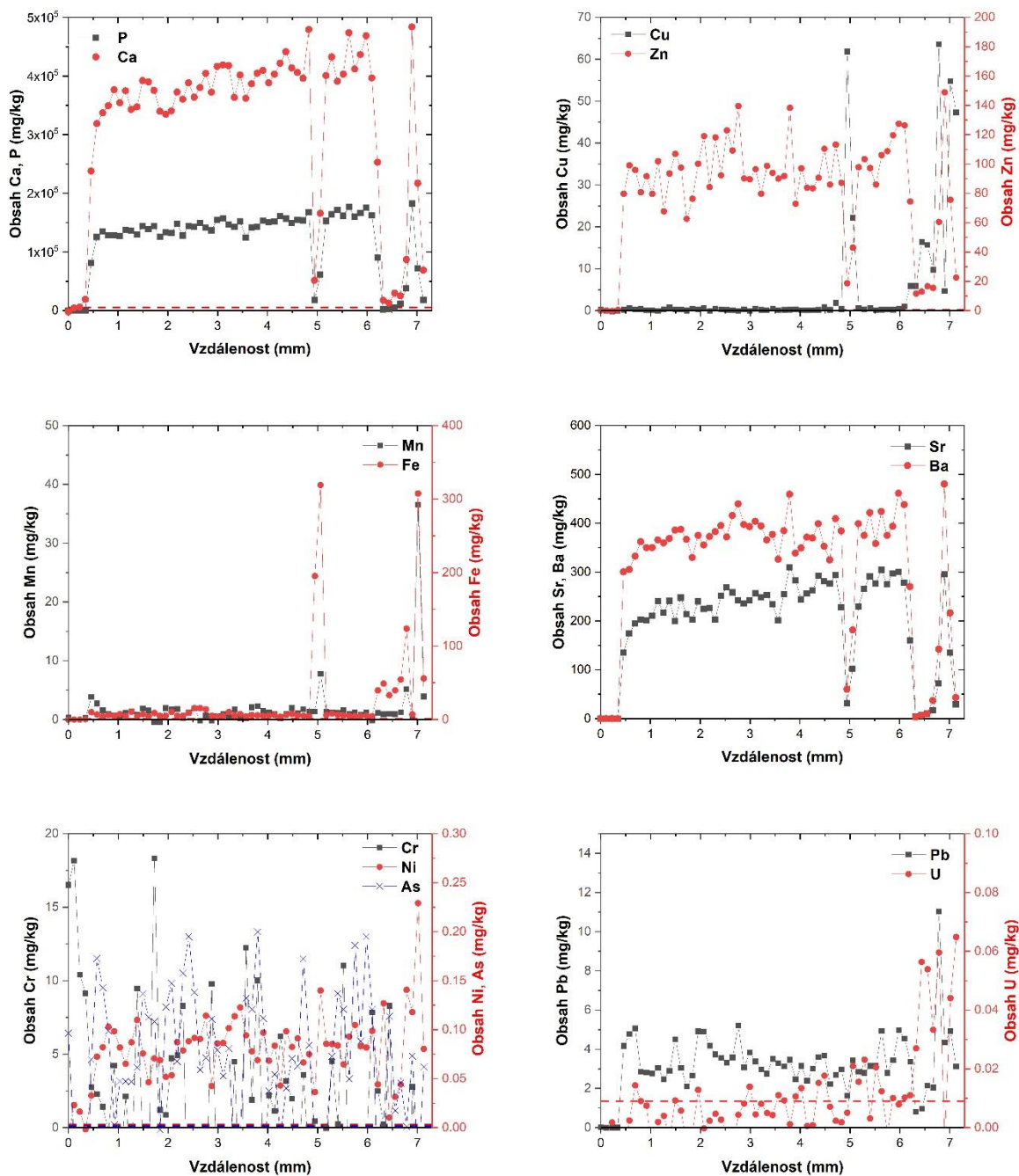


Příloha 4: Vzorek S3_1 z Příbramska macerovaný v roztoku kapsle do myčky, a) linie bodů umístěná na vzorku, b) grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

a)

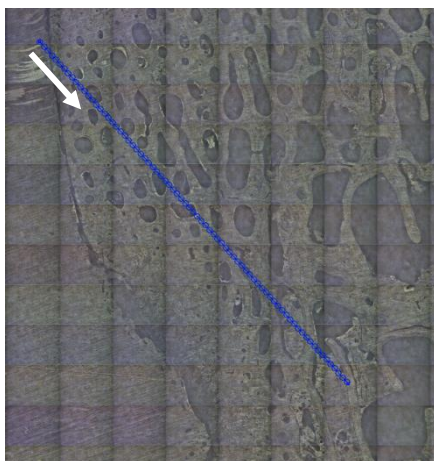


b)

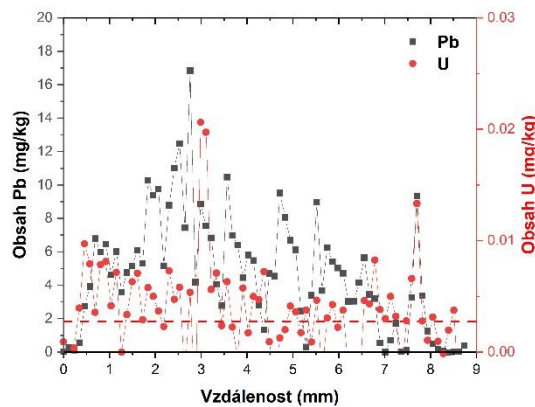
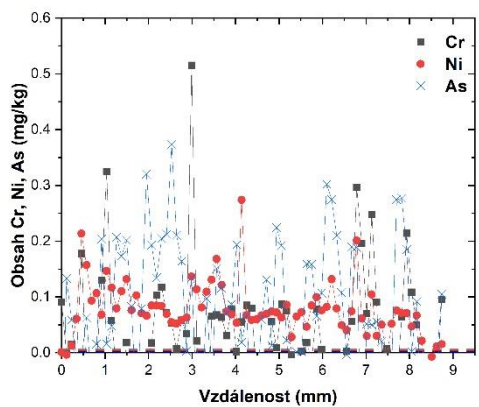
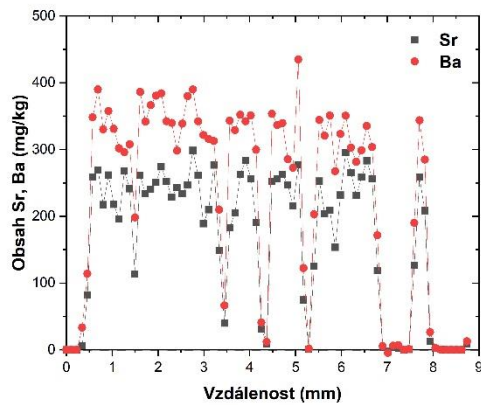
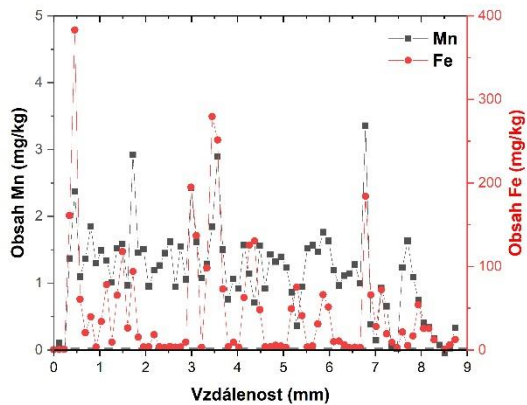
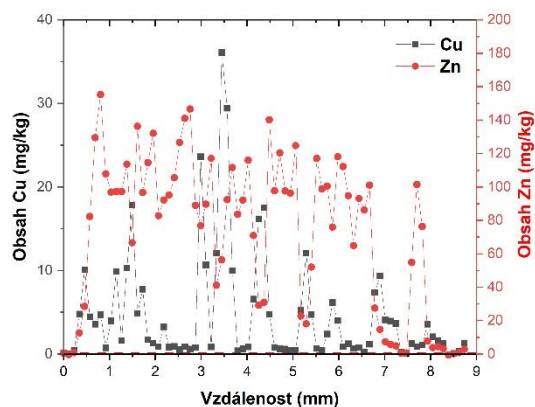
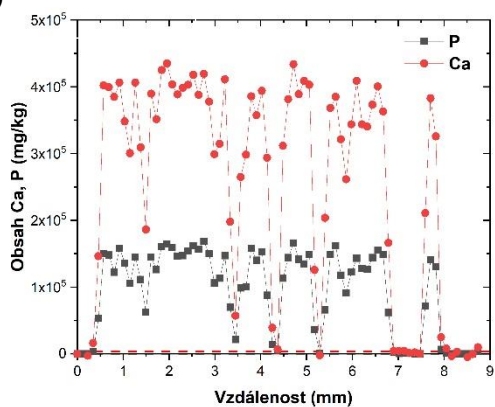


Příloha 5: Vzorek S3_2 z Příbramska macerovaný v savu, a) linie bodů umístěná na vzorku, b) grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).

a)



b)



Příloha 6: Vzorek S3_4 z Příbramska macerovaný v 3% NaOH, a) linie bodů umístěná na vzorku, b) grafická závislost obsahů prvků (mg/kg) na vzdálenosti mezi jednotlivými body (mm).