

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**ANALÝZA ZUBŮ POMOCÍ LASEROVÉ ABLACE A
ICP-MS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Ondřej Valas

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2015

SOUHRN

Práce je zaměřena na studium zubů pocházejících z různých historických období. V zubech je zkoumán především obsah Ba a také poměr Ba/Ca, jelikož Ba může být využito pro rekonstrukci délky doby kojení a odstavování jedince, jemuž zub patřil.

Experimenty byly prováděny pomocí indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní spektrometrií ve spojení s laserovou ablací. Použití laserové ablace umožnilo provést experimenty bez nutnosti rozložení vzorků a zkoumat tak obsah Ba v rozdílných částech a vrstvách zubu.

SUMMARY

This thesis is focused on the study of teeth from different historical eras. The teeth are predominantly tested for the content of Ba and the Ba/Ca ratio, as Ba can be used for the reconstruction of the length of breastfeeding and weaning periods of the individual to whom the tooth belonged.

Experiments were performed using inductively coupled plasma mass spectroscopy and laser ablation. Using of laser ablation allowed to perform experiments without a necessity to decompose the samples and the content of Ba could be examined in different parts and layers of the tooth.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne

.....

Ondřej Valas

Za cenné rady, ochotu, čas a trpělivost bych chtěl poděkovat především vedoucímu své práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. Mé díky dále patří Mgr. Anně Pankowské, Ph.D. ze Západočeské univerzity v Plzni za poskytnutí vzorků k měření a za její podnětné rady a připomínky. Za pomoc se zpracováním vzorků a jejich přebroušením děkuji také RNDr. Petru Sulovskému, Ph.D. Poděkování patří v neposlední řadě také mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	2
2.1.1 Počátky.....	2
2.1.2 Popis.....	2
2.1.3 Systém zavádění vzorků do plazmatu.....	3
2.1.3.1 Kapaln� vzorky	3
2.1.3.2 Pevn� vzorky.....	6
2.1.4 Laserov� ablace.....	6
2.1.4.1 Term�ln� a netermální mechanismus	7
2.1.4.2 �prava vzorku pro LA.....	8
2.1.4.3 Lasery.....	11
2.1.4.4 Transport materiálu z LA do plazmatu	16
2.1.4.5 Nevýhody LA	16
2.1.5 Plazma.....	17
2.1.5.1 Plazmov� hlavice	18
2.1.6 Interface a iontov� optika	19
2.1.6.1 Interface	19
2.1.6.2 Iontov� optika	20
2.1.7 Hmotnostní analyzátor	21
2.1.7.1 Kvadrup�lov� analyzátor.....	21
2.1.7.2 Pr�letov� analyzátor	22
2.1.8 Detekce	23
2.1.8.1 Faradayova klec	23
2.1.8.2 Elektronov� násobič	23
2.2 Zub	24
2.2.1 Ulo�en� zubů v čelisti a jejich zna�en�.....	24
2.2.2 Stavba zubu.....	25
2.2.2.1 Zubní tk�n� a jejich utv�ren�	25

2.2.2.2	Vrstevnatá struktura zubu	28
2.2.3	Doba vývoje jednotlivých zubů	28
2.3	Výživa dětí a její studium	29
2.3.1	Kojení a odstavení potomka	30
2.3.1.1	Věk při odstavení	31
2.3.2	Studium délky kojení a období odstavování	32
2.3.2.1	Analýza stabilních izotopů	33
2.3.2.2	Analýza stopových prvků	34
2.4	Způsoby vzorkování zubních a kostních tkání pro ICP-MS analýzu	38
2.5	Rozložení prvků v zubech	39
2.5.1	Odlišný stupeň mineralizace různých částí skloviny	39
2.5.2	Složení povrchové vrstvy skloviny	40
2.6	Další aplikace analýzy izotopů a stopových prvků v zubech a kostech	40
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
3.1	Přístroje	42
3.2	Experimentální podmínky nastavení LA	42
3.3	Průběh experimentu	43
3.4	Vzorky	43
3.4.1	Úprava vzorků	43
3.4.2	Popis vzorků	44
3.4.2.1	Vzorek č. 1	44
3.4.2.2	Vzorek č. 2	45
3.4.2.3	Vzorek č. 3	45
3.4.2.4	Vzorek č. 4	46
3.4.2.5	Vzorek č. 5	47
3.4.2.6	Vzorek č. 6	48
3.4.2.7	Vzorek č. 7	49
3.4.2.8	Vzorek č. 8	50
3.4.2.9	Vzorek č. 9	51
3.5	Měření izotopů	51
3.6	Volba ablačního místa a typy experimentů	52
3.7	Zpracování signálu	54

4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
4.1	Optimalizace parametrů laserové ablace	55
4.1.1	Výkon laseru (laserový tok).....	56
4.1.2	Pulsní frekvence laseru	57
4.1.3	Průměr laserového paprsku.....	58
4.1.4	Rychlost posunu laserového paprsku.....	59
4.1.5	Průtok nosného plynu	60
4.1.6	Poměr průtoků nosného plynu	61
4.2	ICP-TOF-MS	62
4.2.1	Průměry z jednotlivých sekcí.....	63
4.2.1.1	Zvýšený obsah olova	66
4.2.1.2	Poměry Ba/Ca v jednotlivých sekcích	67
4.2.2	Místní (časový) profil linií v sekcích.....	69
4.2.2.1	Srovnání profilů poměrů Ba/Ca a Sr/Ca	71
4.3	Srovnání výsledků ICP-TOF-MS a ICP-Q-MS	72
4.3.1	Průměrné hodnoty měřených izotopů v sekcích „A“, „B“ a „C“	73
4.3.2	Profily poměru Ba/Ca	75
4.3.3	Závěr srovnání	76
4.4	ICP-Q-MS	77
4.4.1	Linie vedené podél EDJ	77
4.4.1.1	Vzorek č. 1 (M^1)	78
4.4.1.2	Vzorek č. 2 (m^1).....	79
4.4.1.3	Vzorek č. 3 (M^1)	80
4.4.1.4	Vzorek č. 4 (M^1)	81
4.4.1.5	Vzorek č. 5 (m_2).....	82
4.4.1.6	Vzorek č. 6 (m^1).....	84
4.4.1.7	Vzorek č. 7 (M_1)	85
4.4.1.8	Vzorek č. 8 (M^1)	87
4.4.1.9	Vzorek č. 9 (m_1).....	88
4.4.2	Shrnutí získaných výsledků	90
5.	ZÁVĚR	92
6.	LITERATURA	93

1. ÚVOD

Chceme-li porozumět chování a způsobu života současných lidských společností, je nezbytné poznat i naši historii, dějiny a kulturu. O dějinách lidstva se lze mnoho věcí dozvědět ponořením se do dochovaných písemných pramenů. Ne vždy ale mohly být důležité historické události zaznamenány pomocí písma do knih, na hliněné destičky, papyry a jiné. Ať už proto, že písmo ještě nebylo vynalezeno nebo nebyl nikdo, kdo by o události a daném období podal písemné svědectví.

Tam, kde chybí písemné prameny, přichází ke slovu věda zvaná archeologie, která se zabývá studiem minulosti a kultury na základě poznatků získaných analýzou hmotných předmětů, artefaktů či celých krajinných uskupení přetvořených člověkem.

Moderní archeologové si ale ne vždy vystačí sami o sobě a často musí spolupracovat s kolegy, kteří se zabývají jinými vědami, mimo jiné i chemií. Všechny předměty, které archeolog může potenciálně zkoumat a využít k poznávání historie a kultury lidských společností, jsou ve své podstatě chemickými látkami a jejich směsmi. Chemická analýza takovýchto artefaktů může pomoci odhalit původ materiálu, jeho stáří, účel, způsob výroby, zpracování a jiné zajímavé informace.

Tato diplomová práce se zabývá analýzou lidských zubů pomocí spojené techniky laserové ablace a indukčně vázaného plazmatu s hmotnostní spektrometrií. Je to metoda, která se pro archeologické účely dobře hodí, neboť dovoluje analýzu pevných látek (artefaktů), často bez nutnosti jejich destrukce. To může být u hodnotných archeologických nálezů nezbytné.

V zubech je zkoumán především obsah barya, jakožto ukazatele poskytujícího informace o stravování jedince v počátcích jeho života. Lze poté usuzovat na délku období, ve kterém matka své dítě kojí a odstavuje. To je důležitým faktorem, který odráží zdraví společnosti, její chování, způsob obživy, populační růst a jiné, z hlediska studia historie a kultury důležité, aspekty.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

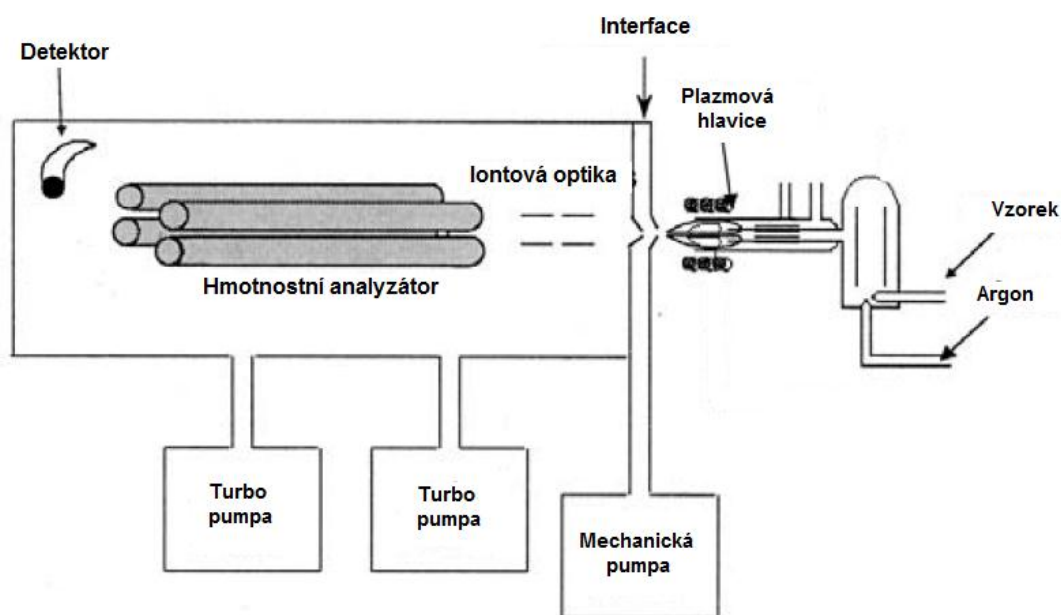
2.1.1 POČÁTKY

Jak již sám název napovídá, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je spojenou analytickou metodou využívající plazmatu jako iontového zdroje a hmotnostního spektrometru jako analyzátoru. První pokusy spojit plazma s hmotnostním analyzátozem proběhly již v roce 1974 (cit.¹). V tomto experimentu bylo ale využito stejnosměrně vázané plazma, které, na rozdíl od indukčně vázaného plazmatu, vykazuje více interferencí a dalších nečistot. Proto existovala snaha využít jako iontový zdroj právě indukčně vázané plazma, které v této době zažívalo poměrně značný rozvoj.

Toto spojení bylo poprvé publikováno v roce 1980 (cit.²) a první komerční přístroj na sebe nenechal dlouho čekat. Na trh byl uveden kanadskou firmou Sciex pod názvem ELAN 250 již v roce 1983 (cit.³). Od té doby se tato technika značně rozvíjela a v dnešní době se již stala standardem anorganické multielementární analýzy, převážně na stopové úrovni koncentrací.

2.1.2 POPIS

Samotný přístroj se skládá z několika hlavních částí. První z nich je systém vnášení vzorků do plazmatu, následuje samotná plazmová hlavice, kde pomocí radiofrekvenčního generátoru dochází ke tvorbě plazmatu a ionizaci vzorku. Skrze interface a iontovou optiku jsou poté ionty vedeny do hmotnostního analyzátoru, který na rozdíl od plazmatu pracuje za vakua. Zde jsou na základě rozdílných poměrů m/z separovány a následně pomocí detektoru detekovány (obrázek 1).



Obrázek 1 Schéma ICP-MS s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem, převzato z literatury⁴ a upraveno

Na rozdíl od techniky ICP-OES, kde rozlišujeme axiální a radiální pozorování plazmatu, ve spojení s MS se využívá téměř výhradně horizontální polohy plazmové hlavice, aby mohly být vznikající ionty zaváděny přímo do analyzátoru⁵.

2.1.3 SYSTÉM ZAVÁDĚNÍ VZORKŮ DO PLAZMATU

V zásadě rozlišujeme dva typy vzorků, se kterými lze v případě ICP-MS přijít do styku. Jsou to vzorky kapalné a pevné. Oba typy musí být převedeny na určitou formu, kterou poté lze proudem plynu zavádět do plazmatu. Systémy zavádění těchto dvou typů vzorků se od sebe zásadně odlišují.

2.1.3.1 KAPALNÉ VZORKY

Nejběžnější metoda zavádění kapalných vzorků do plazmatu využívá spojení zmlžovače a mlžné komory. Kapalina je v tomto uspořádání obvykle nasávána pomocí peristaltické pumpy a vháněna do zmlžovače. Zde dochází pomocí zmlžovacího plynu, proudícího kolmo (úhlový zmlžovač) nebo souběžně (koncentrický zmlžovač) se zaváděným vzorkem, ke tvorbě aerosolu, který je veden do mlžné komory. Její hlavní funkcí je

odstranění velkých kapiček aerosolu, aby mohlo v plazmatu dojít k efektivní desolvataci, atomizaci a následné ionizaci vzorků. Navíc, pokud by byl aerosol zaváděn do plazmatu příliš vlhký (obsahoval by mnoho velkých kapiček), mohlo by docházet k nestabilitě nebo v krajním případě až ke zhašení plazmatu.

Principem, na kterém mlžné komory fungují, může být např. rozbíjení velkých kapiček nárazem o stěnu komory (Scottova mlžná komora), případně využití odstředivých sil (cykolnická mlžná komora).

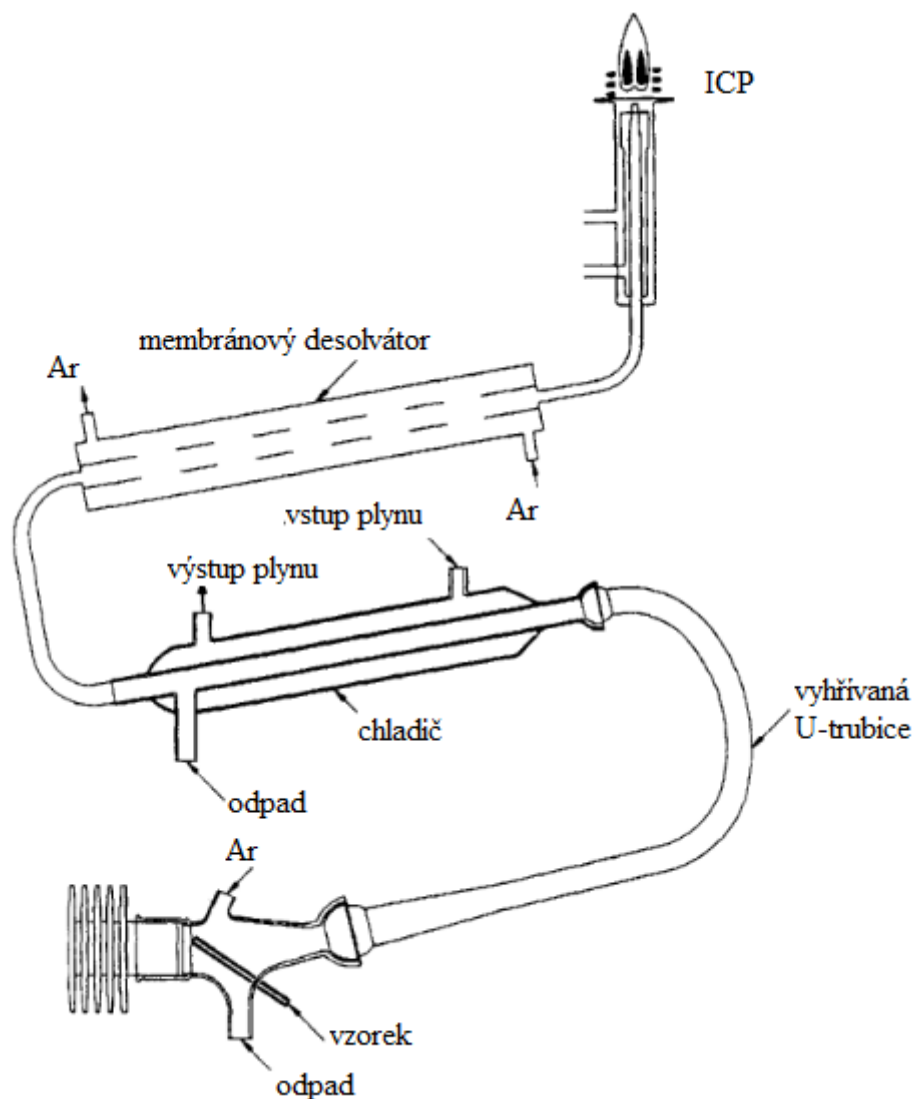
Existuje samozřejmě více řešení procesu zmlžování kapalných vzorků, co se zmlžovačů i mlžných komor týče. Vzhledem k faktu, že se ve své práci nezabývám kapalnými vzorky, jejich úplný výčet a popis vynechám.

Obecnou nevýhodou používání výše uvedeného způsobu zavádění vzorků jsou poměrně velké ztráty, ke kterým v průběhu tohoto procesu dochází. U klasických zmlžovačů, běžně pracujících s průtoky $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, dochází po použití mlžné komory k 10–100-násobnému snížení množství vnášených analytů, což může být problematické v případě malých množství dostupného vzorku⁶. Řešením může být využití různých typů mikrozmlžovačů a také mlžných komor schopných pracovat s velmi malými vstupními objemy vzorku ($< 10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Při využití těchto zařízení dochází ke zvýšení podílu vzorku vnášeného do plazmatu a zmenšení objemu odpadu. Zároveň lze aplikovat spojení ICP s analytickými separačními metodami, které pracují s malými průtoky (CE, HPLC, ...)^{6,7}.

DESOLVATACE

Někdy je třeba objem aerosolu vstupujícího do plazmatu redukovat. K tomu slouží různá desolvatační zařízení. Příkladem budiž např. systém zahřívání a chlazení trubice. V něm dochází v ohřívání části k odpaření solventu a jeho následné kondenzaci na chlazeném povrchu (obrázek 2).

Dnes se také využívá semipermeabilních membrán, v nichž proudí aerosol vzorku. Kolem membrány je v opačném směru, než kterým proudí vzorek, přiváděn zahřátý proud argonu. Dochází k odpařování solventu, páry prostupují skrze membránu a proudem argonu jsou odváděny pryč (obrázek 2). Další variantou je např. kryogenní desolvatace. Systémy lze také vzájemně kombinovat^{6,8}.



Obrázek 2 Schéma zapojení dvou desolvatačních zařízení za sebou, převzato z literatury⁸ a upraveno

DALŠÍ METODY PRO KAPALNÉ VZORKY

K zavádění kapalných vzorků lze také využít např. tvorby těkavých sloučenin, konkrétně hydridů (metody jsou často založené na reakci analytu s NaBH_4 v kyselém prostředí), nebo tvorby studených par rtuti.

U tohoto způsobu zavádění vzorků dochází k oddělení analytů od matrice a tedy potlačení možných interferencí. Analyty jsou zároveň do plazmatu dopravován s téměř 100% účinností (na rozdíl od častěji používané techniky pneumatického zmlžování, u níž se účinnost transportu běžně udává jako cca 2 %). Toto má za následek výrazné zvýšení citlivosti a umožňuje provádění ultrastopových analýz.

Techniku generování hydridů nicméně není možno využít pro mnoho prvků. V úvahu přicházejí prvky schopné tvořit těkavé hydridy při pokojové teplotě – As, Se, Sn, Sb, Pb, a Bi. Při použití této techniky dochází ke zlepšení detekčních limitů pro tyto prvky o jeden až dva řády^{5,9,10}.

Další z technik, která je v jisté modifikaci použitelná i přímo pro pevné vzorky, je elektrotermické vypařování. Vzorek je v tomto případě nadávkován do grafitové kyvety/pícky (někdy se využívá i žhaveného vlákna), která je postupně odporově zahřívána. Nejprve dochází k vysušení vzorku, následně k pyrolýze, jejímž cílem je odstranění složek matrice, a poté následuje zplynění analytů. V některých případech, kdy jsou analyty těkavější než složky matrice, jsou tyto zplyněny při relativně nízkých teplotách a matrice poté zůstává uvnitř pícky¹¹.

2.1.3.2 PEVNÉ VZORKY

Do plazmatu lze zavádět také přímo pevné vzorky bez nutnosti jejich předchozího převedení do roztoku. Jednou z možností je využití výše popsaného elektrotermického vypařování.

Dále se využívá např. obloukového a jiskrového výboje. Metoda využívá elektrického výboje mezi elektrodou a vzorkem, při čemž dochází k odpaření (ablaci) části vzorku, který je následně transportován do plazmatu. Aby mohlo k výboji mezi elektrodou a vzorkem dojít, je nutno, aby byl vzorek vodivý, případně byl smíchán s nějakým vodivým materiálem (grafit). Tato metoda je nicméně ve spojení s ICP-MS využívána poměrně zřídka, snad i díky tomu, že neumožňuje provedení prostorové analýzy povrchu a je tedy vhodná pouze pro homogenní vzorky (slitiny, kovy) nebo vzorky homogenizované (rozemleté horniny)^{10,12}.

V poslední době nabývá na důležitosti také laserová ablace, které bude věnována samostatná kapitola.

2.1.4 LASEROVÁ ABLACE

Technika laserové ablace byla vyvinuta v 60. letech 20. století. V jejich počátcích byl laser využíván nejen ke vzorkování, ale také jako excitační a ionizační zdroj. Dnes už se takto nevyužívá a velice často bývá spojován s ICP. Tato technika je poté označována

LA-ICP¹². Jelikož je při použití laseru vzorkováno jen nepatrné množství materiálu, je třeba pracovat s vysoce citlivými detekčními systémy. Ideálně se poté jeví spojení LA-ICP-MS.

Principem je ablace materiálu, umístěného ve vzduchotěsné ablační cele vyplněné nosným plynem (He, Ar), pomocí laseru, při čemž dochází ke vzniku plazmového oblaku obsahujícího atomy, elektrony a ionty. Celý proces probíhá za atmosférického tlaku, není proto zásadní problém se zaváděním ablatovaného materiálu do plazmatu¹³.

Plazmový oblak vzniká jakožto výsledek interakce mezi fotony, povrchem cílového materiálu a heliovým (argonovým) plazmatem vytvořeném díky interakci laser-nosný plyn, především při použití IR-laseru. Při dopadu fotonů na vzorek jsou tyto absorbovány a jejich energie je převedena na teplo. Dochází k velice rychlému zahřátí vzorku, což vede k roztavení a odpaření jeho částecek a vytvoření malého kráteru na povrchu materiálu.

2.1.4.1 TERMÁLNÍ A NETERMÁLNÍ MECHANISMUS

Za ablaci samotnou jsou v podstatě odpovědné dva mechanismy – termální a netermální. Který z mechanismů převládne, závisí v největší míře na vlnové délce dopadajících fotonů a také délce jednotlivých laserových pulsů.

Při termální ablaci elektrony vzorku přímo absorbují dopadající záření a energie je dodána do jeho atomové mřížky. Dochází k velice rychlému zahřátí vzorku a difuzi tepla skrze materiál, což vede k roztavení a odpaření jeho částecek v relativně širokém okruhu od místa dopadu laserového paprsku a vytvoření kráteru na povrchu materiálu.

Za předpokladu, že energie dopadajících fotonů je vyšší než vazebná energie sousedících atomů cílového materiálu a zároveň je použit laser s dostatečně krátkou dobou pulsu (femtosekundové lasery), dochází k přímému narušení mřížky vzorku a k vytržení atomů (iontů) bez pozorování termálních efektů¹⁴. Díky tomu, že trvání pulsu je velice krátké, není čas na to, aby vzorek podléhal termodynamickým změnám a veškerá energie je využita přímo k ablaci. K té dochází až poté, co laserový puls již odezněl a nedochází tak ani k interakci mezi paprskem laseru a ablatovanými částicemi. Nedochází také v podstatě k žádné difuzi tepla skrze materiál.

Uvádí se, že netermální mechanismus je silně dominantní při použití femtosekundových laserů s dobou trvání pulsu v rozmezí cca 100–200 fs.

Tento netermální mechanismus je preferovaný, mnohem méně se při něm uplatňuje difuze tepla (za použití femtosekundových laserů může tato ovlivnit okolí v okruhu cca 100 nm, nanosekundové lasery ale již mají vliv na okruh o poloměru 1 μm)^{11,15}. Dochází i k menší frakcionaci a měření poskytuje lepší výsledky.

Jak je naznačeno výše, interakce mezi fotony a materiálem je poměrně složitý proces, který je ovlivňován mnoha faktory, především vlnovou délkou a druhem použitého laseru, energií pulsu a dále tepelnou kapacitou, vodivostí a také teplotou vypařování ablatovaného materiálu. Tyto interakce jsou dále komplikovány, pokud dochází k tvorbě výše zmíněného plazmatu nosného plynu, který je poté částečně zodpovědný za odpařování vzorku. Navíc je nutné brát v potaz, že rozdílné prvky se odpařují při rozdílných teplotách (tento rozdíl je zodpovědný za frakcionaci především při termální ablaci). Při tvorbě kráteru také dochází v jeho profilu ke tvorbě teplotního gradientu. Tyto efekty poté mohou vést k tomu, že dochází k určité frakcionaci a ablatovaný materiál nemusí mít složení stoprocentně totožné s materiálem vzorku.

Při dopadu paprsku laseru na povrch analyzovaného předmětu dochází také k jeho částečnému odrazu, kterýžto efekt klesá se zvyšující se teplotou povrchu vzorku. Tento odraz je nechtěný, lze jej ale téměř 100% eliminovat a zanedbat při použití laserů s krátkou dobou pulsu. Použití těchto laserů je výhodné i proto, že nedochází k tak silné interakci mezi paprskem a již vzniklým plazmovým oblakem. Interakci paprsku s plazmatem lze také ovlivňovat frekvencí produkovaných pulsů. Čím je tato vyšší tím je efekt „plazmového stínění vzorku“ (plasma shielding) větší a dochází úbytku množství energie dodaného k povrchu materiálu, což opět může vést k jisté frakcionaci^{11,16}.

Efekt plazmového stínění také klesá s použitím laserů o kratší vlnové délce (UV), které lépe penetrují skrze vzniklý oblak a nejsou jím pohlcovány jako např. IR-lasery¹⁴.

Jak je naznačeno výše, interakce laseru s pevnou látkou je proces závislý na mnoha parametrech. Proto je většinou nutné tyto experimentálně testovat a upravovat v závislosti na povaze studovaného materiálu. Nelze proto jednoznačně specifikovat obecně vhodné podmínky nastavení veličin přístroje.

2.1.4.2 ÚPRAVA VZORKŮ PRO LASEROVOU ABLACI

Laserová ablace je velice zajímavým, a dnes hojně využívaným, prostředkem zavádění pevných vzorků do plazmatu a nabízí řadu výhod. Umožňuje nejen studium homogenních

materiálů, případně analýzu průměrného složení vzorků, ale také náhled na prostorovou distribuci jednotlivých prvků v daném materiálu (někdy spojováno s pojmem mikrosonda). V závislosti na typu analýzy je nutné zvolit vhodný průměr laserového paprsku. Pro analýzu průměrného složení jsou vhodnější lasery s větším průměrem paprsku ($> 100 \mu\text{m}$), pokud nás zajímá rozložení jednotlivých elementů, je výhodné využít menších průměrů ($< 100 \mu\text{m}$).

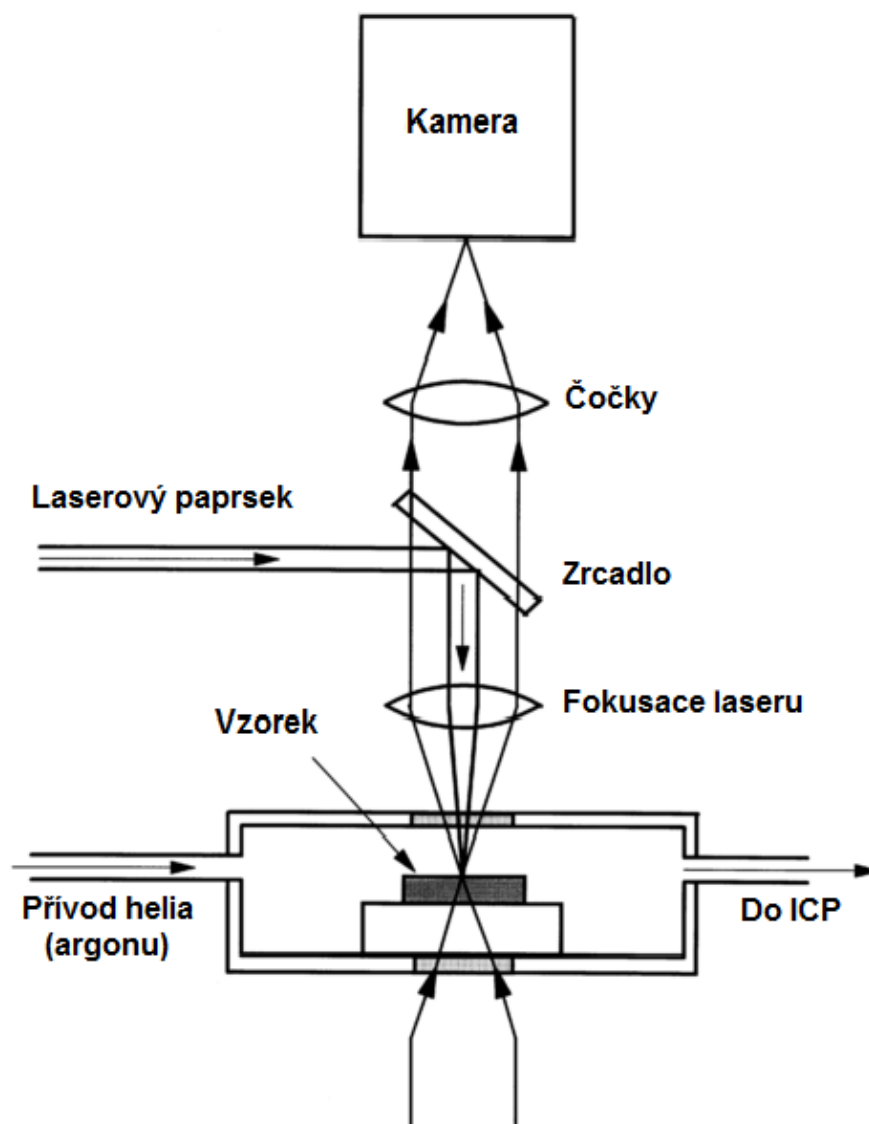
Laserová ablace je v některých případech (slitiny, kovy, ...) použitelná ke vzorkování přímo bez dalších nutných úpravných operací. Lze jí vzorkovat vodivé i nevodivé pevné látky, anorganického i organického původu. V podstatě jediným požadavkem na vzorek je, aby velikostně odpovídal rozměrům cely, ve které k samotné ablaci dochází.

Pokud je k dispozici vzorek ve formě prášku, je většinou nezbytné vylisovat z něj za použití velkých tlaků tabletku, velikostně odpovídající rozměrům ablační cely. Takovéto tabletky mohou být lisovány z čistého materiálu, někdy se také přidávají různá pojiva na bázi pryskyřic nebo alkoholů o vysoké molekulové hmotnosti. Takto mohou být zpracovány jak anorganické materiály (rozdrcené horniny), tak i různé biologické vzorky.

Dalším možným způsobem zpracování vzorku je tavení zkoumaného materiálu, což vede k lepší homogenitě výsledného produktu. Tento způsob úpravy je možno provádět i s přídavkem tavidla (borax, ...), které většinou snižuje teplotu potřebnou pro tavbu a tím snižuje riziko případných ztrát těkavějších analytů. Na druhou stranu, bez použití tavidla nedochází k ředění vzorku a také odpadá problém s nechtěnou kontaminací.

MIKROSONDA

Co se týče analýzy s využitím mikrosondy, většina přístrojů je dnes běžně vybavena kamerou (typické schéma přístroje lze vidět na obrázku 3), což umožňuje laser snadno zaměřit na vybrané místo povrchu a provést vzorkování jediného konkrétního bodu, oblasti, linie apod. Za předpokladu, že necháme laser působit delší dobu na jedno místo, lze studovat i hloubkové profily.



Obrázek 3 Schéma laserové ablace s kamerou, převzato z literatury¹² a upraveno

Toto je jedna ze značných předností LA, neboť nedochází ke ztrátám informací o rozložení analytů na povrchu vzorku (v prostoru), ke kterým nutně dochází při využívání jiných vzorkovacích technik vyžadující předúpravu zkoumaného materiálu (rozpouštění, rozklady, homogenizace, ...). Dále se zamezí nutnosti použít potenciálně nebezpečná reakční činidla a také nedochází k možným ztrátám těkavých analytů nebo případné kontaminaci vzorku. Významné je také množství ušetřeného času, který je jinak nutný k převedení vzorku do roztoku.

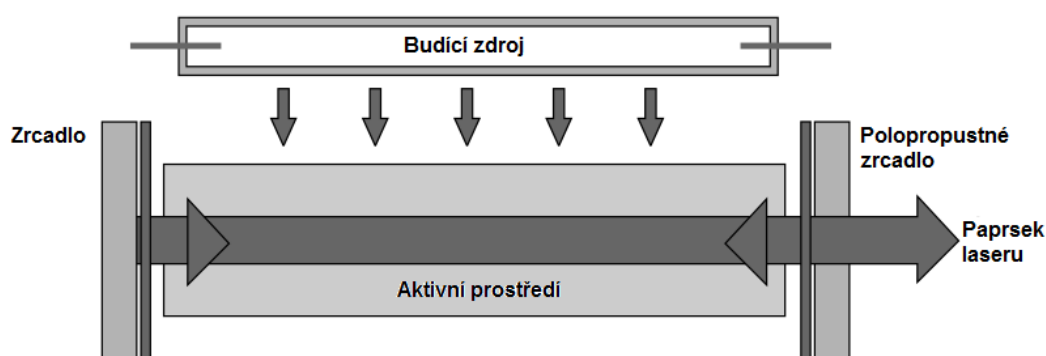
Při povrchové (prostorové) analýze je nicméně většinou nutné dobře najít a identifikovat místa, která jsou z hlediska výzkumu potenciálně zajímavá. Proto je vhodné

zajistit, aby měl vzorek hladký povrch. Lze jej např. vyleštit nebo z něj připravit tenké výbrusy (běžné u geologických vzorků). U křehkých, či jinak náchylných, vzorků je také alternativou jejich zalití do epoxidové pryskyřice a vytvoření tablety (disku). Tím dojde k fixaci a zpevnění materiálu a lze jej pak snadněji řezat nebo s ním jinak nakládat.

2.1.4.3 LASERY

Slovo laser je zkratkou anglických slov „*light amplification by stimulated emission of radiation*“. Jedná se o optické zařízení dovolující koncentrovat energii v čase a produkovat silně monochromatické koherentní energetické pulsy, které jsou zároveň soustředěny do malého bodu^{11,12}.

Laser je tvořen třemi základními částmi – optickým rezonátorem, aktivním prostředím a zdrojem buzení. Budící zdroj dodá energii elektronům aktivního prostředí a tyto přejdou do excitovaného stavu na určité metastabilní hladině. Dochází k takzvané inverzi populace, kdy je počet elektronů na metastabilní hladině vyšší než na základní energetické hladině. Následně dochází ke stimulované emisi. Na excitovaný elektron dopadá foton vyzářený spontánní emisí při přechodu jednoho z elektronů z metastabilní na základní hladinu. Dochází tak ke stimulaci daného elektronu a emisi dalšího fotonu o stejné vlnové délce a následně k lavinovému efektu emise takovýchto fotonů. Díky tomu, že je aktivní prostředí umístěno v optickém rezonátoru (soustava 2 zrcadel, polopropustné a totálně reflexní), dochází k odrazům a dalším průchodům záření aktivním prostředím, čímž je dále podporována stimulovaná emise. Záření prostupující polopropustným zrcadlem poté představuje výstup laseru^{11,17}.



Obrázek 4 Schématické znázornění laseru, převzato z literatury¹¹ a upraveno

DĚLENÍ LASERŮ

Lasery lze rozdělit dle rozličných parametrů. Níže je uvedeno dělení podle vlastností, které mají zásadnější vztah k systému LA-ICP-MS.

V závislosti na typu laseru lze produkovat záření o různých vlnových délkách v rozsahu od ultrafialové, přes viditelnou, až po infračervenou oblast spektra.

Lasery lze dále dělit dle délky trvání energetického pulsu. Rozlišujeme poté lasery mikro-, nano-, piko- a femtosekundové. Obecně je výhodné používat lasery s co nejkratší délkou pulsu, neboť jejich aplikace zajišťuje lepší účinnost ablace, menší plazmové stínění vzorku, menší frakcionaci a obecně vyšší přesnost měření. Díky kratší době působení jednotlivých pulsů nedochází k tak velkému přenosu tepla skrze atomovou mřížku a ablace je poté dána spíše netermálním mechanismem. Laserové krátery také mají lépe definovaný a opakovatelný profil a tvar¹⁴.

Na základě materiálu aktivního prostředí můžeme lasery dělit do několika skupin: pevnolátkové, polovodičové, plynové a barvivové¹¹.

Ve spojení s ICP-MS nacházejí dosud větší uplatnění v podstatě pouze pevnolátkové a plynové (excimerové) lasery. Tyto budou proto nyní velice stručně popsány.

Pevnolátkové lasery

Aktivní prostředí těchto laserů je tvořeno pevnou, opticky propustnou, látkou (matricí), v níž jsou umístěny atomy nebo ionty aktivátory, které se chovají jako luminiscenční centra. Existuje mnoho typů těchto laserů, ve spojení s ICP se ale uplatňují především dva druhy – rubínový a dnes více používaný Nd:YAG laser.

Rubínový laser

Jedná se o první typ zkonstruovaného laseru, poprvé byl vytvořen již v roce 1960. Rubín je krystalický materiál, jehož matrice je tvořena oxidem hlinitým, aktivátorem jsou chromité ionty. Vlnová délka produkovaného záření je 694,3 nm. Laser je schopen produkovat pulsy o vysoké energii, často se proto využívá např. i v průmyslu k vrtání tvrdých materiálů^{11,17}.

Nd:YAG laser

Aktivním prostředím tohoto laseru je krystal yttrium-aluminiového granátu dopovaný neodymem. Tento laser je schopen produkovat záření o mnoha vlnových délkách, pro účely LA se nejčastěji využívá 1064,2 nm. Na konci 20. století se také začalo v LA aplikacích využívat vyšších harmonických frekvencí a začaly být používány i paprsky s poloviční až pětinovou vlnovou délkou (tj. 532, 355, 266 respektive 213 nm).

Většina LA přístrojů, které využívají pevnolátkové lasery, je dnes vybavena právě Nd:YAG laserem, který nahradil původně více aplikovaný rubínový laser^{16,17}.

Plynové lasery

Aktivní prostředí tohoto typu laserů je tvořeno plynnou fází. Inverze populace se děje mezi energetickými hladinami některé ze složek plynu. Na základě toho, o jakou složku se jedná, lze poté plynové lasery dále dělit na atomární (He-Ne laser), iontové (argonový laser) a molekulární (CO laser). Zvláštním typem molekulárních laserů jsou excimerové lasery (někdy uváděné jako samostatná podkategorie v rámci plynových laserů). Právě tento typ plynového laseru se nejvíce uplatňuje v LA a bude o něm pojednáno trochu blíže.

Díky tomu, že plyn je mnohem homogennější než pevná látka, nedochází při průchodu záření laseru aktivním prostředím k tak velké deformaci a rozbíhavosti výstupního paprsku a tento má také vysoce stabilní výstupní vlnovou délku. Nevýhodou, ve srovnání s pevnolátkovými lasery, je nižší výstupní výkon daný nižší objemovou hustotou počtu částic. K buzení plynových laserů se nejčastěji využívá elektrického výboje.

Excimerový laser

Ve své podstatě by šlo excimerové lasery označit za pseudomolekulární. Výraz „excimer“ je odvozen od anglických slov „excited“ a „dimer“. Excimery jsou molekuly, které jsou vytvářeny, a mohou existovat, jen v excitovaném stavu. Jejich vznik je podmíněn vzájemnou interakcí excitovaného atomu (molekuly) s atomem (molekulou) v základním energetickém stavu.

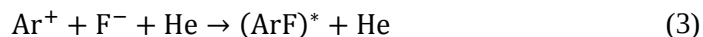
Nutno podotknout, že označení „excimerový laser“ není vždy zcela přesné. Slovo „excimer“ v chemické terminologii označuje pseudomolekulu tvořenou dvěma stejnými

částicemi. Excimerové lasery jsou ale běžně založeny na použití halogenidů (oxidů) vzácných plynů. Jelikož jsou vzniklé pseudomolekuly tvořeny dvěma různými atomy, správné je označení „exciplex“ (z angl. „*excited state complex*“). V běžné praxi se nicméně pojem „exciplexový laser“ nepoužívá^{16,17}.

Existují ale i lasery pracující s excitovanými dimery vzácných plynů (Ar, Kr, Xe), u kterých je výraz „excimer“ použit správně¹⁷.

Aktivní prostředí je většinou tvořeno směsí reaktivních (Cl₂, F₂) a inertních plynů (Ar, Kr, Xe). K buzení je běžně využíváno elektrického výboje. Vzniká excitovaný dimer, který má, na rozdíl od dimeru v základním stavu, minimum na křivce potenciální energie a může dojít k inverzi populace¹¹.

Rovnice¹¹ uvádějí příklad budícího procesu a následného vyzáření energie pro ArF laser (ionizace (1, 2), vytvoření dimeru (3), vyzáření energie (4) a rekombinace (5)).



Výhodou excimerových laserů je jejich vysoký výkon, plochý energetický profil paprsku (na rozdíl od pevnolátkových laserů, u nichž převládá Gaussovský profil rozdělení energie) a také široký výběr vlnových délek emitovaného záření, v závislosti na použitém aktivním prostředí. Poměrně běžný ArF laser (používaný i v souvislosti s ICP-MS) vysílá záření, jehož vlnová délka je 193,3 nm. Vlnová délka produkovaná např. ArO laserem je ale mnohem vyšší a nachází se již ve viditelné oblasti (558 nm).

Nevýhodou jsou vyšší provozní náklady, jelikož je nutné pracovat s plyny o vysoké čistotě a tyto je nutno pravidelně vyměňovat^{11,17}.

DALŠÍ PARAMETRY LASERŮ

Výše již byly zmíněny některé vlastnosti mající vliv ve spojení ICP-MS (vlnová délka laseru, délka trvání pulsu, ...). Pro úplnost následuje ještě výčet některých dalších parametrů, které mají při ablaci vliv.

Energie pulsu

Energie pulsu ovlivňuje mimo jiné hloubku, do které je laserový paprsek schopen pevnou látkou proniknout. Má tudíž vliv i na množství ablatovaného materiálu. Díky různé tvrdosti vzorků je třeba energii pulsů vhodně zvolit a testovat.

Energie laseru je běžně řízena a nastavována pomocí různých optických filtrů, zvolením polohy a natočení zrcadel v laseru a jiných proměnných¹¹.

Laserový tok

Laserový tok je energie laseru vztažená na jednotku plochy.

Pulsní frekvence

Pauza mezi jednotlivými laserovými pulsy je také důležitou proměnou. Jak je zmíněno výše (kapitola 2.1.4.1), při použití vysoké pulsni frekvence může docházet k efektu plazmového stínění vzorku a ovlivnění ablace.

Energetický profil paprsku

Většina používaných laserů (mimo excimerových) vytváří paprsek s Gaussovským profilem rozdělení energie. Intenzita dopadajícího záření je tedy nejvyšší uprostřed paprsku a směrem k okrajům postupně klesá. Toto může být nevýhodou především při studiu hloubkových profilů materiálu. U takovýchto studií je poté vhodné zvolit právě excimerové lasery, které vytváří plochý energetický profil, případně využít speciální „homogenizační optiky“, která je schopna Gaussovský profil do jisté míry zploštit¹¹.

Průměr paprsku

Spolu s výkonem laseru má průměr laserového paprsku vliv na množství ablatovaného materiálu a také na množství částic, které projdou z ablační cely až do plazmatu. Platí pravidlo, že čím větší je poměr hloubky kráteru k jeho poloměru, tím menší část částic z vytvořeného kráteru je dopravena do ICP-MS¹¹.

Průměr paprsku je také samozřejmě důležitý z hlediska rozlišení v ploše. Čím menší je průměr paprsku, tím přesnější informaci o distribuci prvků v materiálu lze získat.

2.1.4.4 TRANSPORT MATERIÁLU Z LA DO PLAZMATU

Obecně se udává, že celkové množství ablatovaného materiálu, které úspěšně projde z ablační cely až do plazmatu, bývá v rozmezí 10 – 20 % (cit.^{11,12}). Transport částic je ovlivňován především rozměry a geometrií použité ablační cely a také použitým nosným plynem (He nebo Ar). Menší vliv mají poté rozměry spojovacích plastových trubiček.

Dále je třeba brát v potaz, že účinnost transportu je značně závislá na velikosti ablací vzniklých částic. Příliš malé (< 5 nm) a také velké (> 3 μ m) částice bývají transportovány s malou účinností (vliv difuze, respektive gravitace)¹⁶.

NOSNÝ PLYN

Volba nosného plynu může mít velký vliv na transportní, a stejně tak i ionizační, účinnost. Dnes nejběžněji využívaným nosným plynem je He, ale někdy se ještě používá i Ar. Jeho nepopíratelnou výhodou je fakt, že při zavedení plynu do plazmatu (tvořeného taktéž argonem) nedochází v tomto k žádným změnám, a tedy ani k ovlivňování podmínek a účinnosti ionizace různých prvků.

Výhodou He je, že obvykle vykazuje lepší poměr signálu ku šumu a výrazně lepší limity detekce. Obecně se soudí, že hlavní příčinou tohoto zlepšení při použití He je menší depozice již jednou ablatovaných částic zpět na povrch pevného vzorku^{11,14}.

2.1.4.5 NEVÝHODY LA

Laserová ablace je metoda, pomocí níž lze přímo vzorkovat pevné látky bez nutnosti převádět tyto do roztoku. Nedochází tedy ke ztrátám informace o distribuci prvků ve vzorku. Možnost zkoumat rozložení prvků v daném předmětu bez složité úpravy a destrukce vzorku je mnohdy klíčová a proto se této technice v posledních letech věnuje zasloužená pozornost.

Nicméně, i LA má své nevýhody. Jsou jimi především problematičtější kalibrace a také elementární frakcionace vznikající při vzorkování.

ELEMENTÁRNÍ FRAKCIONACE

Elementární frakcionace je jev, při kterém dochází k tomu, že změřené intenzity signálů jednotlivých prvků (izotopů) neodpovídají složení daného vzorku. Tyto změny v pozorovaných odezvách jsou obecně problémem spojení LA-ICP-MS a dochází k nim především při procesu samotné ablace, transportu částic do plazmatu a také při vypařování, atomizaci a ionizaci částic v plazmatu.

Co se procesu ablace týče, kritická je především velikost a distribuce velikostí vznikajících částic. Není vhodné, vznikají-li částice příliš velké ani příliš malé, u nichž dochází k neefektivnímu transportu do plazmatu (viz kapitulu 2.1.4.4). Navíc, při tvorbě velkých částic dochází ke vzniku rizika, že tyto nebudou v plazmatu plně odpařeny a atomizovány (ionizovány). Velikost částic a její distribuce závisí do značné míry na parametrech dopadajícího laserového paprsku, použitém nosném plynu apod. Obecně lze říci, že lepších výsledků lze dosáhnout použitím UV-laserů o krátké době trvání pulsu.

K frakcionaci přispívá také rozdílná těkavost jednotlivých prvků. Lehčí prvky a izotopy jsou do plazmatu transportovány s vyšší účinností než těžké prvky.

Lze tedy říci, že k frakcionaci dochází především ve třech výše zmíněných částech přístroje, procesy jsou ale navzájem propojeny. Aby se vliv frakcionace potlačil, je nutno, v závislosti na typu vzorku a sledovaných prvcích, pečlivě nastavit experimentální podmínky a ty pak dodržovat pro veškerá měření. Pokud je to možné, je také vhodné použití vnitřního standardu k potlačení případné nedokonalé atomizace, nestability plazmatu a jiných nechtěných jevů^{6,11,13}.

2.1.5 PLAZMA

Plazma, využívané jako iontový zdroj v ICP, vzniká v části přístroje nazývané plazmová hlavice. Je tvořeno neutrálními atomy inertního plynu (nejčastěji Ar), kladně nabitými ionty téhož plynu a elektrony. Jako celek je elektroneutrální⁵.

Abychom docílili toho, že z plynu vytvoříme plazma, je nutné dodat energii, která je vyšší než ionizační energie plazmového plynu ($\text{Ar} = 15,76 \text{ eV}$)¹¹. Energií je pro udržení plazmatu nutné dodávat po celou dobu jeho existence.

V případě indukčně vázaného plazmatu je energie dodávána pomocí indukční cívky vinuté okolo tří soustředných trubic, kterými je přiváděn plazmový plyn. Cívce je

dodávána radiofrekvenční energie a začne jí procházet střídavý proud oscilující typicky s frekvencí 27,12 nebo 40,68 MHz. Následně je indukováno magnetické pole, které je zdrojem energie pro udržení plazmatu. Pro jeho zažehnutí je nicméně nutno dodat prvotní impuls. Tím je vyrazení elektronů z několika atomů plazmového plynu pomocí Teslova generátoru. Ty jsou magnetickým polem urychleny a při jejich kolizích s neutrálními atomy plazmového plynu dochází k vyrazení dalších elektronů. Tato řetězová reakce má za následek udržování plazmatu po celou dobu, kdy je do cívky dodávána energie^{5,11,13}.

Energie plazmatu je poté použita k ionizaci vnášeného vzorku. Díky vysoké teplotě, která je v plazmatu přítomna, je vzorek nejprve vypařen a desolvatován (v případě, že vnášíme kapalný aerosol), poté atomizován a ionizován, v některých případech dochází i k excitaci.

Teplota v plazmatu ale není všude stejná, jelikož toto není v termodynamické rovnováze. Rozlišujeme teploty různých částic v plazmatu (teplota excitovaných a ionizovaných částic, elektronů a plynu v základním stavu). Tyto teploty se běžně pohybují v rozmezí 7 000–10 000 K (cit.⁵). Teplota se také mění se vzdáleností od indukční cívky, u které je nejvyšší a směrem od ní klesá¹³.

Na ionizaci analytu se podílí (v případě argonu jako plazmového plynu) ionty Ar^+ a také metastabilní excitované atomy Ar^* . Ty mohou svou energii předat částicím vzorku a ionizovat (excitovat) je. Prvky, jejichž první ionizační energie je nižší než 8 eV, jsou ionizovány s takřka 100% výtěžkem, se vzrůstající ionizační energií podíl vytvořených iontů prudce klesá. Nicméně, i u prvků ionizovaných ze 100 % je počet iontů, které jsou v konečném důsledku detekovány, velmi malý. Uvádí se, že běžně detekujeme 1 z 10 000 až 1 000 000 atomů přítomných v původním vzorku. Způsobují to především ztráty při transportu iontů z plazmatu do hmotnostního analyzátoru a iontového detektoru¹³.

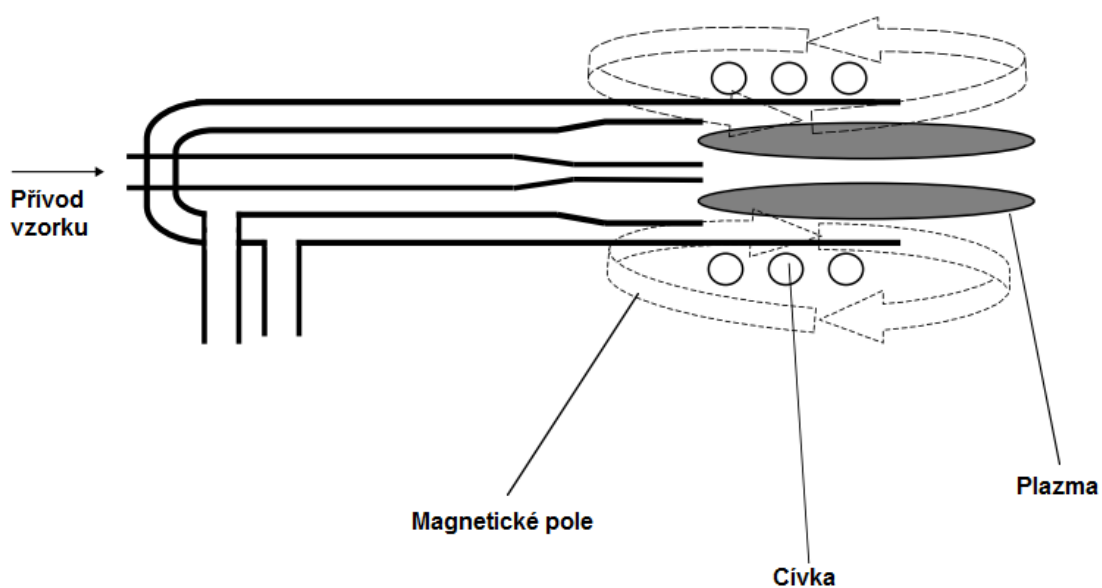
2.1.5.1 PLAZMOVÁ HLAVICE

Co se samotné hlavice týče (obrázek 5), typicky je tvořena třemi křemennými soustřednými trubicemi přivádějícími plazmový plyn. Každý proud plynu má svůj charakteristický účel.

Vnější trubicí (průměr typicky okolo 20 mm) je přiváděn plyn sloužící pro chlazení hlavice. Je zaváděn tangenciálně, což má za následek tlačení plazmatu dále od stěn hlavice (nedochází tedy k nebezpečí roztavení) a také vytváření

charakteristického kapkovitého vzhledu plazmatu. Průtok plynu touto trubicí bývá v rozmezí $12\text{--}20\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ (cit.^{11,18}).

Prostřední trubicí je zaváděn pomocný proud plynu ($1\text{--}2\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$), který má opět především ochranou funkci, tentokrát odtlačuje plazma dále od centrální trubce, kterou je do plazmatu vnášen aerosol vzorku. Průtok plynu prostřední trubicí bývá nejnižší, typicky $1\text{--}1,5\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ (cit.^{11,18}).



Obrázek 5 Nákres plazmové hlavičky, převzato z literatury¹¹ a upraveno

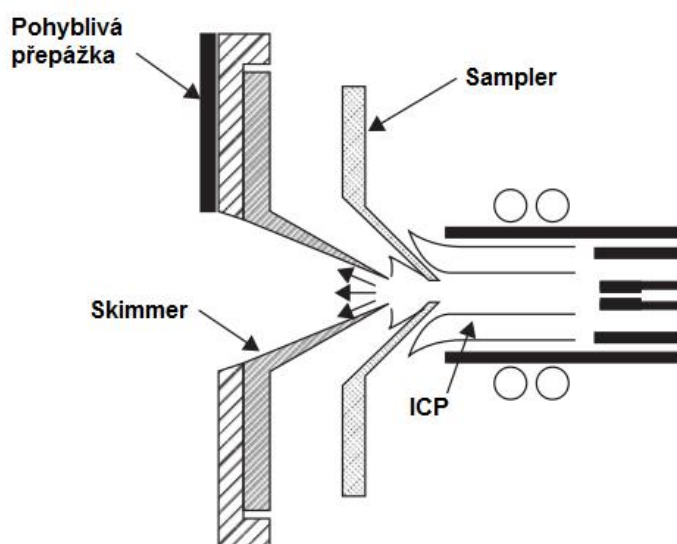
2.1.6 INTERFACE A IONTOVÁ OPTIKA

2.1.6.1 INTERFACE

Interface zajišťuje možnost spojení indukčně vázaného plazmatu pracujícího za vysokých teplot při atmosférickém tlaku a hmotnostního analyzátoru, který ke svému provozu vyžaduje vakuum a výrazně nižší teploty. Obvykle jej tvoří dva kónusy (běžně z niklu, méně často z platiny, mědi nebo hliníku) a pumpy, jež vytvářejí vakuum.

První kónus (sampler) bývá umístěn kousek od plazmatu a nejčastěji je chlazen vodou. Uprostřed mívá otvor, o velikosti přibližně 1 mm, kterým jsou ionty nasávány z plazmatu do prostoru mezi kónusy. V tomto prostoru bývá pomocí mechanické pumpy snížen tlak na cca 100–500 Pa. Takto vzniklý podtlak právě umožňuje snadný transport

iontů z oblasti s atmosférickým tlakem. V těsné blízkosti za prvním kónusem bývá umístěn druhý (skimmer), který mívá otvor o velikosti cca 0,75 mm. Za ním je udržován ještě nižší tlak (cca 10^{-2} – 10^{-3} Pa). Ionty jím procházejí a díky tlakovému spádu a vloženému napětí jsou ještě více urychleny a skrze iontovou optiku jsou směřovány do hmotnostního analyzátoru^{5,11,13}. Interface je schematicky znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6 Znázornění interface, převzato z literatury⁵ a upraveno

2.1.6.2 IONTOVÁ OPTIKA

Iontová optika slouží k transportu iontů vycházejících z interface do hmotnostního analyzátoru. Jejím účelem je také zabránit průchodu fotonů, záporně nabitých a nenabitých částic, aby nedocházelo ke zbytečnému zanášení analyzátoru (např. aplikací „fotonové zarážky“, kterou jsou díky vhodně vloženému napětí kladně nabité ionty schopny obejít).

Iontová optika, stejně jako samotný hmotnostní analyzátor, potřebuje ke své práci ještě nižší tlaky (cca 10^{-5} – 10^{-6} Pa), než jakých je dosahováno za druhým z kónusů. Často tedy bývá oddělena od interface sekce pohyblivou přepážkou, kterou je možno pro analýzu otevřít. Když je tato zavřena, lze v interface sekci vypnout pumpy a nechat nastolit atmosférický tlak¹¹.

2.1.7 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR

Účelem hmotnostního analyzátoru je separovat ionty vytvořené v plazmatu dle rozdílného poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Tyto jsou od sebe děleny pomocí aplikace statického nebo dynamického elektrického či magnetického pole. Výjimkou je průletový hmotnostní analyzátor (TOF, z angl. „*time of flight*“), který se původní definici separace, zavedené v počátcích hmotnostní spektrometrie (1968), vymyká. TOF k separaci vzniklých iontů nevyužívá zmíněná pole, ale k dělení dochází na základě různé rychlosti těmto udělené v závislosti na poměru m/z (cit.¹⁸).

V současnosti existuje mnoho různých přístupů k problému, jak ionty účinně separovat a tím pádem i množství rozličných analyzátorů. Stručně budou popsány dva typy přístrojů, které byly použity při experimentech.

2.1.7.1 KVADRUPÓLOVÝ ANALYZÁTOR

Kvadrupólový analyzátor (též pouze kvadrupól) je jedním ze starších typů hmotnostních analyzátorů. Jeho princip byl popsán již v roce 1953. K dělení iontů využívá kvadrupól stabilitu, respektive nestabilitu, trajektorií letu iontů v oscilujícím elektrickém poli¹⁹.

Analyzátor je tvořen čtyřmi tyčovými elektrodami kruhového nebo hyperbolického průřezu, které musí být vůči sobě umístěny rovnoběžně, a to s velkou přesností. Při čelním pohledu tvoří každá z elektrod jeden roh pomyslného čtverce. Páry úhlopříčně umístěných tyčí jsou vždy udržovány na stejném potenciálu. Ten je tvořen dvěma složkami – stejnosměrnou a střídavou. Jeden pár je vždy nabit kladně, druhý záporně a polarity se během experimentu střídají.

Ionty vstupují do prostoru mezi tyčemi (do středu pomyslného čtverce) a na základě napětí vkládaného na elektrody a změn jeho polarity tyto začnou oscilovat v rovině kolmé na směr svého letu. Vhodně vkládaným napětím je umožněno vždy pouze iontům o určité hodnotě m/z projít celým analyzátozem až do detektoru. Ostatní ionty jsou vychýleny z přímé trajektorie, narazí do jedné z elektrod a na tyčích jsou „vybity“^{18–20}.

Mezi hlavní výhody kvadrupólu patří vysoká průchodnost iontů a poměrně rychlá měření. Kvadrupólové analyzátory také běžně vykazují širší dynamický rozsah než ostatní typy přístrojů, což je činí vhodnými pro aplikace v kvantitativní analýze. Zároveň, pokud je na elektrody aplikována pouze střídavá složka napětí, kvadrupól může sloužit

k transportu iontů z jedné části přístroje do druhé. Všechny ionty budou mít stabilní trajektorii a analyzátozem projdou nezávisle na hodnotě m/z (cit.²⁰).

2.1.7.2 PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR

První průletový analyzátor (TOF) byl zkonstruován, a jeho princip publikován, již těsně po druhé světové válce, roku 1946. Populárním a rozšířeným typem se nicméně stal až v průběhu 90. let^{18,20}.

Princip přístroje je poměrně jednoduchý. Ionty jsou v určitých pulsech po skupinách urychlovány vložem vysokého napětí a všem je udělena stejná kinetická energie (E_{kin}). V závislosti na m/z poměru pak daný ion letí určitou rychlostí (v), viz rovnice 6, respektive rovnice 7, kde U je urychlovací napětí a e elementární náboj.

$$E_{\text{kin}} = \frac{m \cdot v^2}{2} = U \cdot z \cdot e \quad (6)$$

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot U \cdot z \cdot e}{m}} \quad (7)$$

Všechny ionty musí urazit stejnou dráhu a různé ionty jsou tedy detekovány separovaně²⁰.

Běžně se lze setkat se dvěma základními typy konstrukcí průletových analyzátorů, lineární TOF a TOF s reflektorem (iontovým zrcadlem).

Reflektor slouží k fokusaci iontů, které mají stejnou m/z , ale jimž byla na počátku, v závislosti na trochu jiné poloze v prostoru při urychlování, udělena nepatrně odlišná E_{kin} (bylo na ně aplikováno rozdílné urychlovací napětí U). Přispívá tedy ke zlepšení rozlišení přístroje. V zásadě se jedná o sérii několika prstencových elektrod, na něž je postupně vkládán vzrůstající potenciál. Letící ionty pronikají do zrcadla, dokud jejich kinetická energie neklesne na nulu a jsou poté „vystřeleny“ v opačném směru¹⁸.

Pokud tedy máme dva ionty o stejné m/z , ale rozdílných E_{kin} (a tedy letících rozdílnou rychlostí), ten s vyšší E_{kin} pronikne do reflektoru hlouběji a je tedy nucen urazit delší dráhu. Na detektor tedy nakonec dopadne současně s pomalejším iontem, který ale absolvoval kratší dráhu letu.

Mezi hlavní výhody průletových analyzátorů patří v podstatě neomezený rozsah m/z , který je přístroj schopen analyzovat a separovat. Všechny ionty jsou změřeny v jednom nepatrném okamžiku, citlivost měření a prostupnost iontů je také výborná

(všechny ionty teoreticky dopadají na detektor a nedochází k jejich ztrátám jako např. u výše popsaného kvadrupólu)^{18,20}.

2.1.8 DETEKCE

Po úspěšné separaci iontů v hmotnostním analyzátoru zbývá ještě poslední krok k dokončení celého procesu analýzy, a sice detekce těchto částic. K detekci je dnes nutno ionty převést na elektrický signál, se kterým lze dále pracovat. Původní princip detekce byl nicméně založen na použití fotografické desky. Ionty o stejné hodnotě m/z na tuto dopadaly vždy na stejné místo a tvořily na desce tmavou skvrnu. Z intenzity zbarvení skvrny šlo poté usuzovat na četnost dopadajících iontů¹⁹.

Ionty je nutno detekovat s co nejvyšší účinností, jelikož počet iontů, které v konečném důsledku projdou až do detektoru, reprezentuje jen zcela nepatrný zlomek původně vnášeného vzorku.

V dnešní době jsou používány především dva typy detektorů: Faradayova klec a elektronový násobič.

2.1.8.1 FARADAYOVA KLEC

Faradayova klec je zařízení kuželovitého tvaru, do kterého vletí separované ionty a po nárazu do jeho stěn jsou elektricky neutralizovány (kationty přijetím, anionty odevzdáním elektronů). Vzniklý proud je poté zesílen a zaznamenán.

Nevýhodou tohoto typu detektoru je nižší citlivost a pomalejší odezva, na druhé straně je konstrukčně velice jednoduchý a robustní. Vznikající proud je také nezávislý na hmotnosti, energii i rychlosti dopadajících iontů^{18,20}.

2.1.8.2 ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ

Elektronový násobič je v současnosti nejrozšířenějším ze všech detektorů. Jedná se o sérii dynod případně jednu dlouhou dynodu. První v pořadí je tzv. „konverzní dynoda“, na kterou je vložen vysoký potenciál opačné polarity, než mají ionty, jež chceme detekovat. Tyto jsou k ní přitahovány a zároveň urychlovány a vyrazí z ní opačně nabitě sekundární částice. Ty jsou vedeny dále do zařízení a na další dynodě dochází k jejich

konverzi na elektrony. Proud elektronů je poté kaskádovitě zesílen na sérii dalších dynod, na něž je vložen postupně se snižující potenciál (poslední jej má nulový) a vzniklý proud je detekován a zpracováván pomocí počítačů^{19,20}.

2.2 ZUB

Zuby jsou tvrdé orgány bílé až nažloutlé barvy a jsou lokalizovány v dutině ústní. Mají dvě základní funkce. Jejich primárním účelem je mělnění potravy (kousání), druhotně se uplatňují při tvorbě řeči a artikulaci.

Tyto orgány jsou také velice odolné a po dokončení vývoje se jejich struktura ani složení již vůbec nemění (sklovina), případně jsou změny zanedbatelné (dentin). Ve své struktuře tedy uchovávají informace o raných částech života daného jedince. V tomto se zuby liší od kostí, jejichž buňky se v průběhu života postupně obnovují a v konečném důsledku nesou informace o konečných fázích života²¹.

Zuby lze rozdělit dle různých kritérií do odlišných skupin. Dle vývoje lze rozlišit zuby dočasné (mléčné) a zuby stálé. Z hlediska morfologie rozlišujeme čtyři skupiny zubů: řezáky (lat. *incisivi*), špičáky (*canini*), zuby třenové (*praemolares*) a stoličky (*molars*)^{22,23}.

2.2.1 ULOŽENÍ ZUBŮ V ČELISTI A JEJICH ZNAČENÍ

Jednou z možností jak zjednodušit značení jednotlivých zubů, je použití jednopísmenných zkratk vycházejících z jejich latinských názvů. Velkými písmeny se označují zuby stálé, malými dočasné. Jednotlivá písmena jsou indexována čísly k rozlišení více zubů téhož typu (např. první, druhá a třetí stolička). Jedná-li se o index horní, zub pochází z horní čelisti, index dolní koresponduje s dolní čelistí. Polohu zubů lze pro lepší představu graficky znázornit pomocí zubního schématu (zubního kříže), ve kterém se ale používá pouze dolních indexů (obrázky 6 a 7)²².

M ₃	M ₂	M ₁	P ₂	P ₁	C	I ₂	I ₁	I ₁	I ₂	C	P ₁	P ₂	M ₁	M ₂	M ₃
M ₃	M ₂	M ₁	P ₂	P ₁	C	I ₂	I ₁	I ₁	I ₂	C	P ₁	P ₂	M ₁	M ₂	M ₃

Obrázek 7 Schéma stálého chrupu

m_2	m_1	c	i_2	i_1	i_1	i_2	c	m_1	m_2
m_2	m_1	c	i_2	i_1	i_1	i_2	c	m_1	m_2

Obrázek 8 Schéma dočasného chrupu

Někdy je také nutné rozlišovat mezi pravou a levou stranou čelisti. To lze učinit např. označením „dx“ pro pravou a „sin“ pro levou stranu, vycházejícím z latinských výrazů „*dexter*“, respektive „*sinister*“.

2.2.2 STAVBA ZUBU

Zub lze morfologicky rozdělit na tři části: korunku, krček a kořen.

Jako korunku označujeme tu část zubu, jež vystupuje do dutiny ústní a je tedy viditelná. Jedná se o nejobjemnější část zubu a je pokryta bělavou tkání zvanou sklovina.

Kořenem je zub upevněn v čelisti a je pokryt nažloutlým zubním cementem.

Korunka a kořen jsou od sebe odděleny úzkým krčkem, který je také krytý zubním cementem.

Uvnitř zubu je lokalizována dutina zubní, která se směrem do kořenů zužuje v kořenový kanálek ukončený otvorem, kterým do zubu vstupují nervy a cévy. Dutina je vyplněna zubní dřeví²².

2.2.2.1 ZUBNÍ TKÁŇ A JEJICH UTVÁŘENÍ

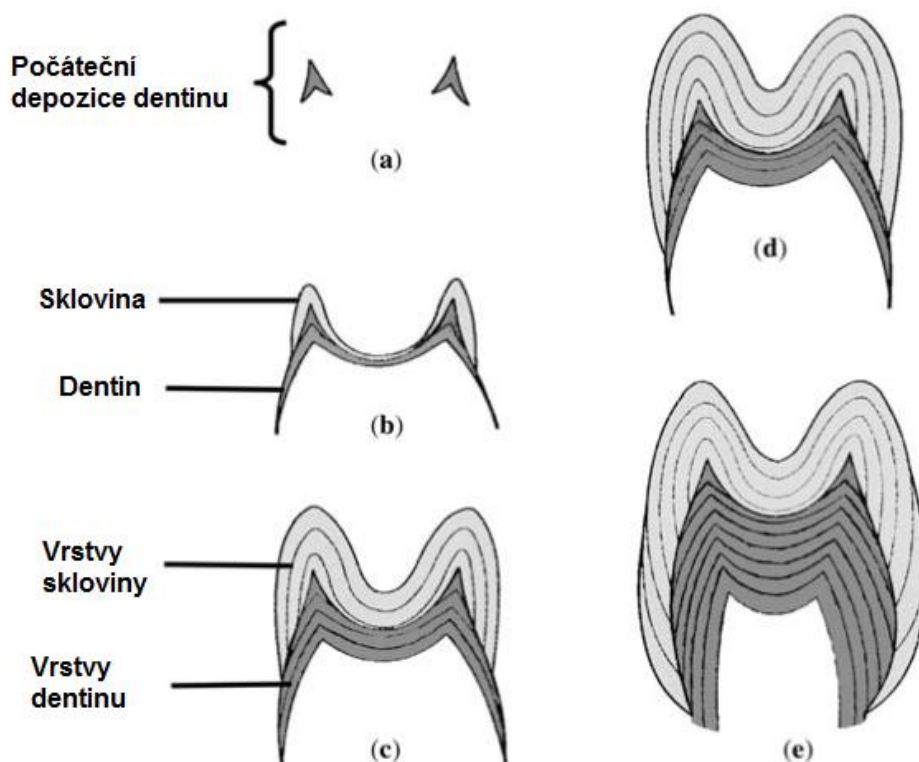
SKLOVINA

Sklovina je křehká bílá tvrdá tkáň, která v oblasti korunky zubu pokrývá dentin. Jedná se o nejtvrďší část lidského těla, dosahuje až tvrdosti křemene²².

Z 96–97 % (w/w) je tvořena anorganickými látkami. Dominantně jsou to podlouhlé krystalky hydroxyapatitu o velikosti přibližně $> 1 \mu\text{m}$. Jeho chemické složení lze popsat následujícím vzorcem: $\text{Ca}_{4,5}[(\text{PO}_4)_{2,7}(\text{HPO}_4)_{0,2}(\text{CO}_3)_{0,3}](\text{OH})_{0,5}$. Organická složka je ve sklovině zastoupena jen zcela nepatrně (cca 1 %), zbytek je tvořen vodou²⁴.

Na počátku vývoje je sklovina produkována ve formě organické matrice, která již do 24 h od své sekrece začíná mineralizovat. Množství hydroxyapatitu se v průběhu vývoje zubu postupně zvyšuje, dokud sklovina nedosáhne finální tvrdosti. Buňky, které jsou za tvorbu skloviny zodpovědné, nazýváme ameloblasty^{21,22}.

Sklovina se začíná utvářet o něco později než dentin. Ameloblasty začínají produkovat sklovinu na již vytvořeném zárodku tvořeném dentinem, respektive predentinem (viz níže), a vytváří se tak spojení skloviny a dentinu často zkracované písmeny EDJ (z angl. „*enamel-dentine junction*“). Sklovina poté postupně narůstá ve dvou směrech: od EDJ směrem k budoucímu povrchu zubu (dochází ke ztlušťování zárodku a tvorbě souvislé vrstvy) a zároveň dochází k tvorbě skloviny od vrcholu zubu směrem níže (postupně se na sobě vytvářejí nové vrstvy skloviny), viz obrázek 9. Sklovina se tedy zároveň zesiluje i prodlužuje. Výsledkem je vrstevnatá struktura skloviny, kdy každá vrstva je tvořena velkým množstvím navzájem propojených krystalů hydroxyapatitu, které mineralizují v průběhu vývoje zubu²¹.



Obrázek 9 Znárodnění postupného narůstání zubu (dentinu i skloviny) a jeho vrstevnaté struktury, převzato z literatury²¹ a upraveno

Poté co ameloblasty vytvoří sklovinu v celé tloušťce a dosáhnou povrchu formujícího se zubu, ztrácejí svou funkci a odumírají. Sklovina proto již po ukončení svého vývoje nemůže být žádným způsobem opravována, ani nemůže docházet k žádným změnám v její struktuře²¹.

DENTIN

Dentin (někdy také nazývaný zubovina) tvoří největší část zubu a dominantně se podílí na určování jeho tvaru. Obklopuje zubní dutinu a na povrchu je pokryt sklovinou a zubním cementem. Jde o pevnou žlutobílou tkáň, která je do jisté míry elastická a méně křehká nežli sklovina.

Ze 70–75 % je tvořen anorganickou složkou, opět především krystalky hydroxyapatitu. Zhruba 20 % tvoří organická složka (hlavně ve formě kolagenu) díky které lze vysvětlit větší pružnost a houževnatost dentinu ve srovnání se sklovinou. Zbýlých 5–10 % tvoří voda.

Dentin je porézní a anorganická složka tvoří menší krystalky, než v případě skloviny (< 100 nm). Spolu s vyšším obsahem organické složky jde o jednu z příčin, proč je dentin náchylnější ke změnám v prvkovém složení (diagenézi).

Při tvorbě dentinu hrají klíčovou roli buňky zvané odontoblasty. Nejprve dochází k tvorbě organického „predentinu“, který následně postupně degraduje a mineralizuje. Ke tvorbě dentinu dochází, stejně jako u skloviny, po vrstvách, které se začínají tvořit směrem od EDJ dovnitř zubu a zároveň jedna na druhé. Dochází tedy opět k růstu zubu jak do šířky, tak i do délky. Na rozdíl od ameloblastů, odontoblasty po vytvoření dentinu neumírají a zůstávají v zubu v aktivní podobě, a to ve vrstvě, kterou utvoří na okrajích dutiny zubní. Proto může v průběhu života jedince docházet k nepatrným přírůstkům dentinu^{21,22}.

ZUBNÍ CEMENT

Zubní cement je nažloutlou tkání, jež pokrývá dentin v oblasti kořene zubu. Svým složením i tvrdostí se velice podobá kostem, zhruba ze 70 % je tvořen anorganickou složkou²².

ZUBNÍ DŘEŇ

Dutina zubní a kořenové kanálky jsou vyplněny růžovou bohatě prokrvenou tkání zvanou zubní dřeň. Na rozdíl od ostatních zubních tkání je tvořena především organickou složkou (řídkým vazivem) a zasahují do ní také nervová zakončení²².

2.2.2.2 VRSTEVNATÁ STRUKTURA ZUBU

Jak již bylo zmíněno výše, zub se vytváří po určitých vrstvách. Tyto vrstvy se formují známou rychlostí, jejich přírůstek je v průběhu vývoje zubu konstantní. Z pozice jednotlivých vrstev tedy lze poměrně dobře usuzovat na dobu jejich vzniku.

Díky tomu, že po vytvoření zubní tkáně již nedochází k její změně (sklovina), případně jsou tyto alternace minimální (dentin), jednotlivé vrstvy svým prvkovým složením odrážejí faktory ovlivňující daného jedince v době vývoje zubu. Různé zuby začínají a končí mineralizaci v rozdílných fázích života jedince, poskytují tedy informace o odlišných úsecích jeho života.

Mezi faktory podílející se na prvkovém složení zubu patří např. vliv klimatických podmínek, stravy i jiných. Tyto se projevují v alternacích ve složení hydroxyapatitu, kdy jeho jednotlivé komponenty mohou být nahrazovány v krystalové mřížce jinými prvky. Vápník bývá nahrazován nejčastěji sodíkem, draslíkem, baryem, stronciem a jinými. Dochází i k nahrazování fosforu (např. křemíkem, hliníkem) nebo celých funkčních skupin (např. hydroxylová skupina může být nahrazena halogenidy)²⁴.

Poměrně zásadním zlomem v průběhu vývoje jedince je porod, při kterém je organismus vystaven značnému stresu. Tento lze vysledovat na mléčných zubech, které se začínají vyvíjet již před narozením. Na zubu je většinou patrná změna v prvkovém složení (ve formě extrému, elevace, ...). Vrstva, která se tvoří právě při porodu, je ale také často odlišná již svým vzhledem a lze ji rozpoznat pod mikroskopem. Nazýváme ji „neonatální linie“²⁵.

2.2.3 DOBA VÝVOJE JEDNOTLIVÝCH TYPŮ ZUBŮ

Pro tuto práci je důležité zmínit i počátek a konec vývoje korunky jednotlivých typů zubů. Každý typ zubu začíná a ukončuje vývoj korunky (tedy v podstatě skloviny) v jiné fázi života člověka. Je proto potenciálním zdrojem informací právě o daném časovém úseku. Doba vývoje korunky jednotlivých typů zubů je shrnuta v tabulkách 1 a 2. Jedná se o průměrné hodnoty a u každého jedince může docházet k individuálním odchylkám.

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

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

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

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

2.3 VÝŽIVA DĚTÍ A JEJÍ STUDIUM

Z hlediska studia lidské historie a vývoje chování společnosti v odlišných historických obdobích je jedním ze zkoumaných jevů výživa nedospělých jedinců. Získané poznatky hrají významnou roli na poli antropologie, archeologie, evoluční biologie a jiných.

2.3.1 KOJENÍ A ODTAVENÍ POTOMKA

U savců je před narozením dítě (mláďě) energeticky zásobováno živinami, které získává skrze placentu. Po narození začíná období kojení, kdy je vyživováno mateřským mlékem, které na počátku jeho života plně pokrývá energetické potřeby a zároveň přispívá k rozvoji imunity. S tím jak dítě roste, stoupají i jeho energetické nároky a matka již není schopna všechny pokrýt pouze pomocí mateřského mléka. Potomek tedy proto nutně musí začít přijímat i jinou, nemléčnou, stravu. V tomto bodě života nastává odstavování potomka, které je ukončeno, když tento zcela přestane konzumovat mateřské mléko²⁸.

Odstavování, respektive odstavení, může dle jiných definic také označovat nikoli celé období, ale pouze bod v životě, kdy potomek přestane být energeticky závislý na mateřském mléku, případně konečný bod odstavování, tedy úplné vynechání mateřského mléka z jídelníčku.

Právě odstavení dítěte hraje jednu z nejvýznamnějších rolí při studiu stravování daného jedince.

Mateřské mléko je pro děti (mláďata) bezpečným, plně vyváženým a snadno stravitelným zdrojem energie. Jeho tvorba a samotné kojení kladou ovšem značně zvýšené energetické a také časové nároky na matku. Doba odstavení je tedy jakýmsi kompromisem mezi nároky na matku a rizikem špatného nebo zhoršeného vývoje potomka. Toto riziko je dáno faktem, že jsou mu postupně, případně nárazově, odebrány benefity, které mu mateřské mléko poskytuje a energii je proto donucen přijímat z jiných, zdaleka ne tak bezpečných a vyvážených, zdrojů potravy, což se na něm může teoreticky negativně podepsat. Na druhou stranu je odstavení dítěte pro matku jistou energetickou úlevou a zároveň je tato připravena na výživu případného dalšího potomka²⁸.

Z hlediska studia lidské historie je doba odstavení (a vyživování dětí obecně), spojena s mnoha faktory v životě společnosti a pomáhá při pochopení jejího vývoje.

Výživa nedospělých jedinců odráží zdraví a kondici nejen daného individua, ale celé společnosti (populace) obecně. Strava v raném období vývoje, společně s růstem dětí, má totiž značný vliv na život jedince v dospělosti. Studium kojení a odstavování zároveň poskytuje informace důležité z hlediska interpretace vývoje společností, jejich sociálních systémů a podmínek života obecně. Odráží také požadavky kladené na rodiče, vývoj dětí, a také napovídá něco o způsobech rozmnožování. Odstavení hraje totiž klíčovou roli

v možnosti, kdy může žena znovu otěhotnět, respektive porodit dalšího potomka. Zkrácení doby kojení umožňuje přivést na svět dalšího potomka dříve, což vede k rychlejšímu populačnímu růstu a zvyšuje plodnost společnosti obecně.

Na dobu odstavení mají rovněž vliv kulturní faktory, jako například sociální struktura společnosti, náboženství nebo způsob její obživy (zda se např. jednalo o společnost kočovnou (lovci) nebo usazenou na jednom místě (zemědělci)).

V dnešní době je studium odstavování spojeno s vývojem pediatrie, gynekologie, epidemiologie a jinými²⁹.

2.3.1.1 VĚK PŘI ODSTAVENÍ

V obecné rovině lze říci, že savci odstavují své potomky průměrně v době, kdy tito dosáhnou jedné třetiny váhy dospělého jedince. Od tohoto trendu se výrazněji odchylují pouze primáty a lidé, kteří své potomky odstavují dříve. Založeno čistě na váze, přirozené by bylo odstavovat děti ve věku zhruba 4–6 let v případě dívek a 5–7 let v případě chlapců²⁸.

Skutečný věk definitivního odstavení lidských potomků v současných neindustriálních (domorodých) společnostech je ale přibližně 2,4–2,7 let s tím, že příjem nemléčné stravy začíná obvykle okolo šestého měsíce života. To je ještě nižší věk, než ve kterém průměrně odstavují mladé naši nejbližší příbuzní ze zvířecí říše – lidoopi. U těch k odstavení dochází přibližně ve věku 3–6 let. Nižší věk odstavení je u lidí poměrně paradoxní, neboť vývoj a růst lidských dětí je charakteristický svou prodlouženou dobou ve srovnání s primáty i jinými savci^{28,29}.

Věk odstavování se ale mezi rozdílnými domorodými společnostmi značně liší, hodnoty je proto třeba brát s rezervou. Sellen³⁰ ve své práci shrnuje věk počátku a konce odstavování ve 113 domorodých společnostech. Z nich některé nahrazují část mléka jinou stravou téměř ihned po porodu, jiné potomky výlučně kojí až přibližně do 1,5 roku života. Také věk definitivního odstavení se značně liší, od necelého 1 roku až do 4–5 let.

Co se moderní „západní“ společnosti týče, převládají tendence potomka odstavovat co nejdříve, i když doporučení Světové zdravotnické organizace (SZO) je započít s odstavováním právě po 6 měsících výlučného kojení. Příjem nemléčné stravy, i přes doporučení SZO, ale obvykle začíná o něco dříve než v neindustriálních společnostech. Tento trend odstavovat děti co nejdříve započal v 19. století, kdy někteří

lékaři doporučovali matkám započít odstavování mezi 9. a 12. měsícem života dítěte. V průběhu 19. století se tento věk ještě více postupně snižoval, což ale mělo za následek zvýšenou úmrtnost dětí v té době³¹.

Obecně lze shrnout, že věk odstavování se v současné době značně zkrátil oproti pravěkým a starověkým společnostem³¹, a že souvisí s vyspělostí dané společnosti.

2.3.2 STUDIUM DÉLKY KOJENÍ A OBDOBÍ ODSAVOVÁNÍ

Období před porodem, kojení a odstavování jsou z hlediska příjmu energie a stravy značně odlišné nejen navzájem mezi sebou ale liší se i od zbytku života, kdy jedinec již přijímá „klasickou“ stravu. Tyto čtyři období se navzájem odlišují způsobem příjmu potravy a transportu a ukládání živin v lidském těle. Každý z těchto úseků života je poté charakterizován specifickým obsahem a poměrem některých přijímaných prvků a izotopů. Ke změnám dochází, neboť existují značné rozdíly v cestách příjmu živin (skrze placentu, mléčné žlázy matky a trávicí ústrojí dítěte a také matky). Odlišné složení je v konečném důsledku dáno celkovým obsahem prvků v konkrétní stravě, způsobem jejího transportu do organismu a také rozdílnou biologickou dostupností živin přijímaných z různých potravních zdrojů.

Tělesné tkáně a orgány obsahují mnoho rozličných prvků, které jsou do těla vnášeny v potravě. Analýzou těchto tkání lze proto studovat trendy a změny ve stravování daného jedince. Pro takovouto studii je poté nutné zvolit jednak vhodný prvek nebo izotop a také vybrat správný orgán nebo tkáň k analýze.

V případě studia stravování v raných fázích života jsou vhodným objektem zájmu například zuby. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2, zuby jsou orgány, které jsou velice odolné a zároveň se v průběhu života v podstatě vůbec nemění. Svou strukturou a složením odrážejí vývoj jedince na počátku jeho růstu. Proto je lze velice dobře použít i pro studium stravování v období dětství.

Co se prvků (izotopů) týče, je dobré volit takový prvek (izotop), jehož obsah, případně biologická dostupnost, jsou co nejvíce rozdílné v rámci různých stádií vyživování potomků (prenatální, kojení, odstavování, zbytek života). Běžně lze stravovací návyky studovat na základě obsahů stabilních izotopů dusíku, uhlíku, kyslíku,

síry a vodíku nebo lze sledovat úrovně některých stopových prvků, především stroncia a barya^{29,32}.

2.3.2.1 ANALÝZA STABILNÍCH IZOTOPŮ

Při studiu stabilních izotopů se vychází z poznatku, že lehčí izotopy daného prvku jsou preferovány v chemických reakcích. Poměry jednotlivých izotopů téhož prvku v daném zdroji potravy jsou tedy závislé právě na počtu a charakteru prodělaných (bio)chemických reakcí²⁹.

DUSÍK

Dusík je, co se stabilních izotopů týče, prvkem, který je pro studium stravovacích návyků nejčastěji využíván. Analyzovaným izotopem je ^{15}N , respektive jeho poměr s izotopem ^{14}N . Obsah těžšího z izotopů se zvyšuje se zvyšující se trofickou úrovní. Živočiškové totiž preferovaně vylučují lehčí izotop ^{14}N a dochází k akumulaci těžšího izotopu v tkáních těla. Rostliny mají tedy obecně nižší obsah ^{15}N než býložravci, nejvyšší obsah je pozorován u masožravců. Také existují rozdíly mezi mořskými a suchozemskými organismy, u nichž je hladina ^{15}N nižší než u prvně jmenovaných.

Na základě analýzy obsahu ^{15}N lze tedy usuzovat na primární zdroje potravy. Úroveň ^{15}N ve vytvářejících se bílkovinách organismu odráží jeho úroveň v bílkovinách přijímaných v potravě, jelikož dusík je převážně asimilován z aminokyselin. Dusík je možné využít i při studiu stravování v raném dětství. Hladina ^{15}N ukládaného v nově vznikajících tkáních potomka totiž po narození a počátku kojení mírně vzroste nad prenatalní úroveň a na tuto opět postupně klesá v období odstavování. Je to způsobeno faktem, že v průběhu kojení se matka v podstatě chová jako producent (vytváří mléko, které má srovnatelný obsah ^{15}N , jako tkáň jejího těla, a tento je vyšší, než odpovídá stravě, kterou matka konzumuje) a dítě jako konzument. Je tedy vlastně o jednu trofickou úroveň výše, než ve zbytku života, kdy již přejde na klasický příjem bílkovin ve stravě^{29,32,33}.

UHLÍK

V přírodě lze najít značné rozdíly mezi hladinami ^{13}C v C_3 a C_4 rostlinách, které se od sebe liší způsobem asimilace CO_2 v průběhu fotosyntézy. C_3 rostliny mají mnohem menší

obsah ^{13}C než C_4 rostliny. To způsobuje i jeho nižší úroveň v suchozemských organismech, které jsou závislé na C_3 ekosystému (většina rostlin je typu C_3), než je tomu u organismů mořských. Množství ^{13}C v organismu opět odráží množství tohoto v konzumované stravě. Na rozdíl od dusíku, který je asimilován dominantně z aminokyselin, uhlík bývá přijímán do značné míry i z tuků. Mechanismus asimilace ^{13}C je tedy o něco složitější.

Při sledování stravování v dětském věku se spíše než rozdílných úrovní ^{13}C v mateřském mléku a klasické stravě využívá rozdílu mezi izotopickým složením potravy přijímané v dospělosti a různými dětskými příkrmy a doplňky stravy. Uhlík tedy není úplně vhodný při studiu historických nálezů^{29,32}.

KYSLÍK

Úroveň izotopu ^{18}O v organismu odráží spíše než konzumovanou stravu klimatické podmínky životního prostředí a jeho obsahy v pitné vodě. To je dáno faktem, že úroveň ^{18}O je velmi závislá na množství srážek a teplotních podmínkách (souvisí s fázovou přeměnou vody – vypařování, ...). Hladiny ^{18}O v tělních tekutinách organismů bývají vyšší než tyto ve vypité vodě, neboť preferovaně dochází k vypařování H_2^{16}O .

Existují teorie, že v průběhu kojení sice dochází k určitému malému navýšení hladin ^{18}O v organismu potomka, toto navýšení je nicméně nepatrné a mnohem menší než jsou přirozené variace způsobené pitným režimem. Ke studiu stravovacích návyků v dětství tedy zatím kyslík nebyl ve větší míře použit²⁹.

SÍRA

Studium izotopů síry (^{34}S) lze využít k rozlišení zdrojů potravy pocházejících z moře a z pevniny, respektive sladkých vod a také k určení geografického původu potraviny. Na složení mateřského mléka nemá větší vliv a je tak využitelná pouze pro studium původu stravy v období odstavování^{29,33}.

2.3.2.2 ANALÝZA STOPOVÝCH PRVKŮ

Studium stravovacích návyků pomocí analýzy stopových prvků má oproti stabilním izotopům jednu značnou výhodu. Poměrně často je k měření využívána metoda ICP-MS,

která je vhodná pro stopovou analýzu, má nízké detekční limity a vyžaduje tedy mnohem menší množství vzorku.

Běžně jsou sledovány obsahy dvou kovů alkalických zemin, které substituují vápník v krystalové struktuře zubních (kostních) tkání – stroncia a v poslední době také barya. V pracích zabývajících se těmito kovy se běžně uvádějí jejich poměry vůči vápníku (Sr/Ca, respektive Ba/Ca), který má obdobné biochemické chování. Zároveň je vápník majoritním komponentem zubů a slouží jako interní standard, který by měl pomoci redukovat přístrojové odchylky²⁹.

Využití právě těchto prvků je dáno faktem, že tyto nemají žádnou metabolickou funkci a jejich úroveň v tkáních tedy nejsou nijak regulovány. Odrážejí tedy své obsahy v konzumované stravě.

Jistou nevýhodou je, že obsah těchto prvků v tkáních je v konečném důsledku mnohem nižší než odpovídá přijímané potravě. To je způsobeno procesem „biopurifikace“. Stroncium, baryum a některé jiné dvojmocné ionty (Pb), se v organismu chovají obdobně jako vápník a v potravě jsou spolu s vápníkem přijímány. Vápník v potravě proto může být považován za „kontaminovaný“ těmito prvky. Nicméně, tělo organismu preferovaně asimiluje vápník a „kontaminanty“ naopak vylučuje. Dochází tedy k diskriminaci, kterou lze vysvětlit rozdílné hladiny těchto stopových prvků v potravě a v tělních tkáních. Biopurifikace také způsobuje, že hladiny stroncia a barya jsou největší v půdě a s rostoucí trofickou úrovní organismu klesají.

Obdobně lze vysvětlit i fakt, že poměry Ba/Ca, Sr/Ca, ... v mateřském mléku jsou nižší než v těle kojící matky²¹.

Stroncium, a v menší míře i baryum, byly využity například k pokusu o rozlišování rostlinné a masité stravy u všežravců, respektive zjišťování jejich poměrů. Předpokládalo se, že se zvyšujícím se obsahem masa v potravě se bude snižovat obsah těchto prvků v kostních (zubních tkáních). Výsledky byly ale nepřesvědčivé, jelikož v průběhu let bylo zjištěno, že kromě obsahu samotných stopových prvků je nutné zohledňovat i obsah vápníku v daném typu potravin. Čím víc potravina obsahuje vápníku, tím více se totiž podílí na celkovém příjmu stopového prvku, který vápník „kontaminuje“. Může tedy dojít i k situaci, kdy jedinec požívající převážně stravu s nižším obsahem Sr (Ba), tedy maso, případně ryby, má vyšší poměr Sr/Ca (Ba/Ca) v kostech, než jedinec konzumující více rostlinné potravy. Tento výsledek je dán faktem, že masitá strava

obsahuje ve srovnání s rostlinnou obecně více vápníku, který ovlivňuje celkový příjem stopového prvku.

Lze tedy říci, že stopové prvky, respektive jejich poměry vůči vápníku, jde například využít k rozlišení býložravce od masožravce (tedy zjištění zdroje vápníku „kontaminovaného“ stopovými prvky v potravě). Pro zjištění poměrů rostlinné a masité stravy u všežravců je nicméně situace komplikovanější a je nutno brát v potaz mnoho faktorů a kvantitativní analýza není rozumně aplikovatelná.

Baryum a stroncium jsou z hlediska chemického chování navzájem velice podobné, proto mají podobné aplikace. Existuje ale jeden výrazný rozdíl, a totiž rozdílná rozpustnost síranů těchto solí – SrSO_4 je ve vodě rozpustný, BaSO_4 nikoli. V oceánech (prostředí bohaté na síranové ionty), je tedy Sr dostupné ve formě roztoku, Ba je ale z prostředí odstraňováno ve formě svého síranu – barytu. Poměr Ba/Ca je proto výrazně nižší u zdrojů potravy pocházejících z moře, než je tomu u potravin suchozemského původu. Pro odhalování stravy pocházející z moře je ale tento poznatek opět jen omezeně aplikovatelný. Narážíme totiž na stejný problém, tedy že poměr Ba/Ca odráží dominantní zdroj vápníku v potravě a ne pouze kvantitativní zastoupení Ba v potravě²¹.

STOPOVÉ PRVKY JAKO INDIKÁTORY DOBY ODSTAVOVÁNÍ

Kromě výše zmíněných aplikací spojených se studiem jídelníčku, lze Ba i Sr využít ke sledování a stanovení délky doby kojení, respektive období odstavování. Studie jsou opět založeny na rozdílných poměrech Ba/Ca (Sr/Ca) v částech zubu vytvářených během jednoho z následujících období: prenatálního, „kojícího“, „odstavovacího“ a příjmu běžné stravy.

Baryum jako indikátor stravovacích návyků je dosud využíváno méně než stroncium, ale skrývá značný potenciál a některé novější práce²⁵ jej považují za vhodnější z obou prvků. Christine Austin a spolupracovníci ve své práci²⁵, zabývající se studiem úrovně Ba a Sr jako indikátorů změn způsobu stravování, tyto porovnávali a zjistili, že poměry Ba/Ca v jednotlivých sekcích zubů vytvořených v odlišných částech života (z hlediska typu přijímané potravy) odpovídají lépe skutečně zaznamenaným změnám jídelníčku (jednalo se o zuby dětí, jejichž jídelníček byl pečlivě zaznamenáván). Zároveň změny poměrů Ba/Ca mezi jednotlivými částmi zubu byly výraznější než v případě poměrů Sr/Ca. Ba je

také z obou prvků tím odolnějším vůči diagenetickým změnám (změny tkání způsobené prvkovou výměnou u kostí ležících v zemi).

Poměr Ba/Ca by měl být nejvyšší v části zubu vytvořené v období kojení, v období odstavování by měl být vidět klesající trend a období prenatální a po odstavení by měly mít podobné a ze všech nejnižší obsahy Ba. To je vysvětlováno poměrně vysokým obsahem Ba v mateřském mléce a zároveň jeho dobrou biodostupností z tohoto zdroje potravy. Ta je, podobně jako u vápníku, podporována fosfopeptidy uvolněnými při trávení kaseinu. Tyto totiž zvyšují stabilitu a rozpustnost dvojmocných kationtů v mléku a jsou tedy snáze asimilovatelné. Zároveň, jak je popsáno výše, kromě samotné úrovně barya, hraje velkou roli i celkový obsah vápníku, který je v mléku vysoký^{25,34}.

Stroncium (Sr/Ca) bylo také využíváno ke stejnému účelu jako Ba (Ba/Ca). Kromě výše zmíněných nevýhod má ale jeho použití další problém. Existují totiž dvě rozdílné teorie, jak by měly poměry Sr/Ca v jednotlivých částech zubu vypadat. První z nich předpokládá podobné chování jako Ba²⁵. Druhá teorie předpokládá chování zcela opačné. Tedy nejnižší poměr Sr/Ca v období kojení a jeho nárůst s nástupem nemléčné stravy (s obecně vyšším poměrem Sr/Ca než má mléko) v období odstavování. To je vysvětlováno diskriminací Sr vůči Ca při transportu těchto prvků dítěti skrze placentu (prenatální období) a skrze mléčné žlázy (období kojení). Druhým faktorem podílejícím se na předpokládaném zvyšování poměru Sr/Ca je fakt, že nemléčná (hlavně rostlinná) strava má obecně vyšší poměry Sr/Ca, což se projeví i na jeho hodnotě v organismu^{29,35,36}.

Zároveň existují i rozpory v očekávané hodnotě Sr/Ca v prenatálním období a období kojení. Práce Tsutayay²⁹ a Dolphina³⁴ zmiňují obdobné poměry Sr/Ca v těchto dvou sekcích (dáno obdobnými mechanismem diskriminace Sr oproti vápníku v obou sekcích). Humphrey a spolupracovníci³⁶ naopak pozorují pokles poměru těsně po narození, v období výlučného kojení, což vysvětlují naopak rozdílným mechanismem transportu a diskriminace Sr v těchto dvou obdobích.

V kostce tedy lze shrnout, že jak Ba, tak Sr byly použity jako indikátory změn ve stravování dětí. Použití obou prvků ale do jisté komplikuje poměrně velké množství faktorů, které se na jejich obsahu v organismu (zubu) podílí. I přes to existuje velký potenciál pro budoucí studie, které snad napomohou osvětlit mechanismus inkorporace těchto prvků do tkání organismu.

Problémem je, že u Sr existují rozpory v teoreticky očekávaných hladinách v odlišných sekcích zubu. Tyto rozpory zatím nebyly publikovány v případě Ba, které zároveň, ve srovnání se Sr, lépe koreluje s faktickými změnami jídelníčku a tyto změny jsou také výraznější.

2.4 ZPŮSOBY VZORKOVÁNÍ ZUBNÍCH A KOSTNÍCH TKÁNÍ PRO ICP-MS ANALÝZU

Při analýze kosterních ostatků pomocí metody ICP-MS se uplatňují především dva rozdílné, výše popsané (viz kapitolu 2.1.3.2), způsoby vzorkování materiálu.

Prvním z nich je segregace určité části vzorku, která je následně rozložena a převedena do roztoku (např. práce Reynarda a spolupracovníků³⁷). V případě, že se nejedná o špatně rozložitelný vzorek, je takováto analýza poměrně jednoduchá a většinou dává požadované výsledky. Její nevýhodou ale je větší spotřeba vzorku a také fakt, že ze získaných výsledků získáváme informace o průměrném složení segregovaného místa vzorku. Takováto informace je nicméně dobře dostačující, nepožadujeme-li zkoumání časově závislých změn, spojených s růstem jedince.

U analýzy zubů také ztrácíme informace o změnách jeho složení v rámci jeho jednotlivých, postupně se vyvíjejících vrstev (viz kapitolu 2.2.2.2). Tento problém lze zmenšit analýzou co nejmenších míst vzorku v co nejhojnějším počtu. To s sebou ale nese velký nárůst počtu analýz a celkového procesu přípravy každého jednotlivého vzorku.

Druhou možností, jak analyzovat daný vzorek, je využití laserové ablace. Tato metoda dovoluje vzorkovat poměrně bezproblémově dané konkrétní místo vzorku, což je výhodné, zajímají-li nás změny složení rozdílných částí zubu či kosti^{25,38}.

Aby bylo takové vzorkování vůbec možné, je ale třeba zub (kost) určitým způsobem upravit. Výhodné je rozřezání vzorku na části (plátové výřezy a segmenty kostí, případně prosté rozpůlení zubu) a jejich zalití do pryskyřice pro jejich zpevnění. Po rozřezání se odhalí vnitřní struktura materiálu, která umožňuje zkoumat místa vzniklá v různých časových obdobích života jedince.

2.5 ROZLOŽENÍ PRVKŮ V ZUBECH

Při analýzách zabývajících se rozložením prvků v zubech a změnami v jejich koncentracích v odlišných vrstvách zubu je důležité i vhodně zvolit místo na zubu, které bude vzorkováno.

Jak je popsáno v kapitole 2.2.2.1, zub postupně narůstá po určitých vrstvách a roste zároveň do délky i do šířky. Chceme-li sledovat koncentrační změny v jednotlivých částech zubu způsobené příjmem rozdílné potravy, nabízí se využití laserové ablace a vzorkování nepřerušené linie (čáry, křivky), která prochází skrze jednotlivé vrstvy. Alternativou je vzorkování řady bodů umístěných na imaginární křivce. V obou případech se tak získají informace o časových změnách v ukládání prvků do zubu, teoreticky odrážejících změny v jídelníčku.

Je také možné analyzovat celý povrch zubu a vytvořit „mapu elementárního složení zubu“.

Dále je třeba zvolit, zda bude ablatovaná linie (řada bodů) protínat jednotlivé vrstvy zubu ve směru jeho růstu do délky (např. linie vedená podél spojení skloviny a dentinu) nebo do šířky, tedy např. od spojení skloviny a dentinu k povrchu zubu.

2.5.1 ODLIŠNÝ STUPEŇ MINERALIZACE RŮZNÝCH ČÁSTÍ SKLOVINY

Existují studie³⁶ ukazující změny v poměru Sr/Ca způsobené nejen změnou stravy, ale také odlišným stupněm mineralizace rozdílných částí skloviny. Poměry Sr/Ca jsou nejvyšší v nejhlubších částech skloviny, tedy u spojení s dentinem, a směrem k povrchu tyto klesají. Hlubší sklovina, která je mineralizována méně než povrchové části, obsahuje i menší množství vápníku (v poměru ku Sr) a poměr Sr/Ca je zde tedy nejvyšší. Směrem k povrchu zubu tento klesá spolu se zvyšujícím se stupněm mineralizace a obsahem vápníku.

Vzhledem k obdobné chemické povaze Sr a Ba lze podobné změny, dané nejen změnami jídelníčku, ale také stupněm mineralizace, předpokládat i u barya. Pro sledování poměrů Ba/Ca, odrážejících čistě změny stravy, je tedy pravděpodobně vhodnější

ablatování linie, protínající vrstvy zubu ve směru, jak tyto rostou do délky, např. vedení této linie podél spojení skloviny s dentinem.

2.5.2 SLOŽENÍ POVRCHOVÉ VRSTVY SKLOVINY

Samostatnou kapitolou co se distribuce prvků v zubech týče je jejich obsah v povrchové části skloviny. Tato se liší od zbytku zubu tím, že je nejvíce náchylná k demineralizačním a remineralizačním procesům.

Bylo zjištěno, že povrchová vrstva skloviny (do cca 150 μm hloubky) se svým složením odlišuje od zbytku zubu. Práce Reitznerové a spolupracovníků³⁹ sledovala obsah některých prvků (Cu, Mn, Pb, Fe, ...) právě v povrchové vrstvě a zbytku skloviny a mezi těmito byly zjištěny značné rozdíly. Povrchová vrstva zubu byla ve většině případů bohatší na obsah studovaného prvku, než zbytek skloviny. K podobným zjištěním dospěli i Lee a spolupracovníci⁴⁰, kteří sledovali koncentrace Pb a Zn v zubech.

Díky výše uvedeným skutečnostem nelze vyloučit, že podobný trend postihuje i Ba. Při interpretaci výsledků je tedy třeba brát tuto možnost v potaz.

2.6 DALŠÍ APLIKACE ANALÝZY IZOTOPŮ A STOPOVÝCH PRVKŮ V ZUBECH A KOSTECH

Kromě informací souvisejících se způsobem stravování v sobě kosti a zuby uchovávají informace i o jiných vlivech, jež na daného jedince během života působí. Lze je proto využít i k jiným zajímavým studiím.

Poměrně významné je studium izotopů Sr, přesněji poměru $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, v kostech a zubech. Tento lze použít ke zjištění oblasti, kterou daný jedinec obýval v úseku života, ve kterém byl vytvořen zkoumaný materiál. Zuby vytvořené na počátku života poskytují informace o místě narození a prožití raného dětství. Kosti se v průběhu života obnovují, staré buňky jsou nahrazovány novými, a poskytují tak informace o konečných stádiích života, případně místě úmrtí⁴¹.

Studie jsou založeny na faktu, že Sr se do organismu dostává především se stravou a v pitné vodě. Rostliny a voda svým obsahem jednotlivých izotopů stroncia odpovídají obsahu izotopů tohoto prvku v geologickém podloží oblasti, ze které pocházejí.

^{87}Sr je produktem radioaktivního rozpadu ^{87}Rb a jeho obsah v horninách a půdě, respektive jeho poměr ku ^{86}Sr , je typický pro danou geografickou oblast.

Díky tomu, že v rámci potravního řetězce nedochází k frakcionaci jednotlivých izotopů, tyto se v potravě dostávají i do těla jedince a na základě srovnání poměrů izotopů $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ v kosti (zubu) jedince a v geologickém podloží dané oblasti lze určit místo života daného živočicha v období, kdy byla kost (zub) nebo její část vytvořena, případně modifikována. Lze také usuzovat na migraci jedince během jeho života^{42–44}.

Izotopy stroncia byly, mimo jiné, využity i při identifikaci míst pobytu známého „ledového muže“ Ötziho⁴⁵. V práci je ale také věnována velká pozornost určování místa pobytu na základě úrovně hladiny izotopu kyslíku ^{18}O , která je spojena s oblastí původu pitné vody.

Jako další příklad využití analýzy izotopů a stopových prvků lze zmínit studium obsahu olova v kosterním materiálu, které odráží množství olova, kterému je člověk během života vystaven. Lze takto teoreticky odlišovat ostatky lidí žijících ve více průmyslově založených oblastech a na venkově. Množství olova v kostech je také závislé na éře, kdy člověk žil, roli hraje i geografický původ. Zkoumány bývají nejen lidské pozůstatky, ale také kosti zvířat. Porovnání úrovně olova bylo např. použito pro zjišťování, zda bylo dané zvíře domestikováno, případně se jednalo o volně žijícího jedince^{46,47}.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJE

Při experimentech byly použity dva typy ICP-MS analyzátorů.

První z nich byl přístroj Agilent 7700x (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), který pro separaci iontů využívá kvadrupolový hmotnostní analyzátor.

Druhým použitým přístrojem byl OptiMass 9500 ICP-TOFMS (GBC Scientific Equipment Pty Ltd, Melbourne, Austrálie) založený na průletovém hmotnostním analyzátoru.

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

3.2 EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY NASTAVENÍ LASEROVÉ ABLACE

Podmínky nastavení laserové ablace byly optimalizovány za použití zubů a standardních referenčních materiálů NIST SRM 610 a NIST SRM 612 (oba National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). Popis optimalizace je popsán níže, v sekci výsledků.

Zvolené experimentální podmínky nastavení jsou shrnuty v tabulce 3.

Parametr	Hodnota
Percentuální výkon laseru	75 %
Laserový tok	7,94 J·cm ⁻²
Pulsní frekvence	20 Hz
Průměr paprsku	30 μm
Rychlost posunu paprsku	30 μm·s ⁻¹
Průtok nosného plynu (He)	0,65 l·min ⁻¹
Tok He 1 (MFC1)	0,30 l·min ⁻¹
Tok He 2 (MFC2)	0,35 l·min ⁻¹

Tabulka 3 Shrnutí parametrů nastavení laserové ablace

3.3 PRŮBĚH EXPERIMENTU

Vzorek byl umístěn do ablační cely přístroje. Při ablaci byl využit čárový ablační mód (dochází k ablaci nepřerušované křivky/čáry). Vhodná ablační místa byla vybírána za pomoci CCD kamery, jež je součástí systému. Ablatovaný materiál byl z ablační cely transportován pomocí nosného plynu (He). Následně došlo ke smísení s plazmovým plynem (Ar) a jeho zavedení do plazmatu.

Tento proces byl stejný pro oba typy ICP-MS (s kvadrupólovým i průletovým analyzátozem).

Před samotným měřením byly ICP-MS systémy vždy kalibrovány. Kvadrupólový ICP-MS byl kalibrován automaticky na ladící roztok dodávaný výrobcem. Průletový ICP-MS byl kalibrován před začátkem samotného měření i během něj, vždy po hodině měření, jelikož systém je citlivý na změny teploty. U něj byla kalibrace prováděna ablatováním standardního referenčního materiálu NIST SRM 612.

3.4 VZORKY

Bylo zkoumáno devět lidských zubů, dočasných i stálých, které byly laskavě poskytnuty Mgr. Annou Pankowskou, Ph.D. z Filozofické fakulty Západočeské univerzity v Plzni.

3.4.1 ÚPRAVA VZORKŮ

Před samotnou analýzou musely být vzorky vhodně upraveny. Mechanicky očištěné vzorky byly zality do pryskyřicové tabletky a následně podélně rozpůleny, čímž došlo k odhalení vnitřní struktury zubu (viz obrázky 10–13 a 16–20). Tyto „tabletky“ již nebyly dále upravovány a byly přímo analyzovány.

Zpracování vzorků bylo provedeno firmou Urga, spol. s r.o. z Olomouce.

3.4.2 POPIS VZORKŮ

3.4.2.1 VZOREK Č. 1

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

Tabulka 4 Informace o vzorku č. 1

Lokalita Slavonín 1 leží na katastrálním území obce Slavonín a v průběhu let 2000 a 2001 na ní probíhaly intenzivní archeologické práce. Bylo zde nalezeno 152 sídlištních objektů, které lze datovat od pravěku až po novověk. Kromě těchto budov byly objeveny i tři pohřebiště odlišného stáří obsahující převážně kosterní hroby. Pohřebiště, z něž pochází zkoumaný vzorek, patřilo lidu kultury se šňůrovou keramikou datované do doby pozdního eneolitu.

Zub byl nalezen v kosterním hrobu obsahujícím ostatky dvou jedinců. Zachovala se z něj pouze korunka a patřil nedospělé osobě. Díky celkově špatnému stavu dochovaného skeletu nebylo možno se stoprocentní jistotou identifikovat pohlaví dítěte, předpokládá se ale, že se jednalo o jedince ženského pohlaví.



Obrázek 10 Vzorek č. 1 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.2 VZOREK Č. 2

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

Tabulka 5 Informace o vzorku č. 2

Vzorek č. 2 pochází ze stejné lokality jako vzorek č. 1, není vyloučeno, že se jedná i o stejného jedince.



Obrázek 11 Vzorek č. 2 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.3 VZOREK Č. 3

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

Tabulka 6 Informace o vzorku č. 3

Lokalita Nemilany 3 leží na katastrálním území obce Nemilany a během roku 2000 zde byly provedeny archeologické výzkumné práce. Kromě velkého množství sídlištních

objektů bylo v lokalitě nalezeno do té doby největší kostrové pohřebiště lidu kultury se šňůrovou keramikou na Moravě.

Vzorek pochází z ostatků dítěte, pravděpodobně mužského pohlaví. Tyto byly nalezeny v hrobě s označením H32, který byl nedlouho po pohřbu druhotně otevřen a vykraden.



Obrázek 12 Vzorek č. 3 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.4 VZOREK Č. 4

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

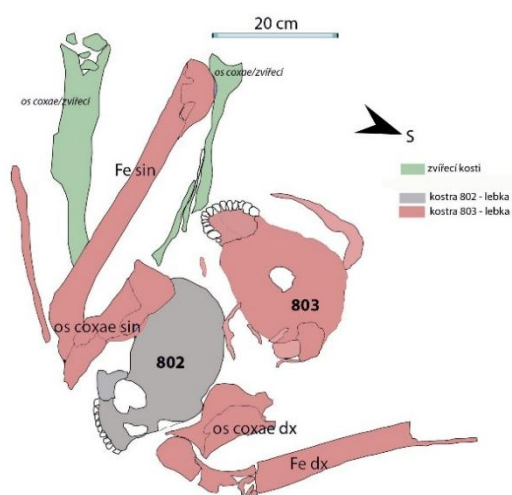
Tabulka 7 Informace o vzorku č. 4

Lokalita Chrást'any se nachází na mírném návrší západně od obce téhož jména, poblíž řeky Mojeny. Oblast byla zkoumána během let 2008–2009 při záchranném archeologickém výzkumu vyvolaném stavbou rychlostní silnice R55. Celkově zde bylo odkryto 406 archeologických objektů různého stáří.

Vzorek pochází z ostatků dospělé ženy, označených číslem 803, která nebyla pohřbena v klasickém hrobě, ale v zásobní jámě. V jámě byl spolu se ženou pohřben další jedinec a obsahovala i zvířecí kosti (viz obrázky 14 a 15)^{48–50}.



Obrázek 13 Vzorek č. 4 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání



Obrázek 14 Rozložení kostí v hrobě



Obrázek 15 Obrázek hrobu

3.4.2.5 VZOREK Č. 5

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

Tabulka 8 Informace o vzorku č. 5

Lokalita Přemýšlení se nachází v okrese Praha-východ. Výzkum lokality byl podnícen výstavbou obytné zóny a byl proveden pod záštitou Oblastního muzea Praha-východ.

Na místě bylo objeveno velké množství archeologických objektů dokládajících kontinuální osídlení území již od pravěku, počínaje mladší dobou kamennou, až do vrcholného středověku⁵¹.

Vzorek byl, dle informací doktorky Anny Pankowské, v lokalitě nalezen izolovaně, nebyl zasazen v čelisti. Zub patřil nedospělému jedinci neurčeného pohlaví.



Obrázek 16 Vzorek č. 5 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.6 VZOREK Č. 6

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

Tabulka 9 Informace o vzorku č. 6

Lokalita U Zvonu se nalézá na území města Plzeň. Jedná se o areál špitálního kostela sv. Máří Magdaleny a přilehlý hřbitov. V letech 2010–2011 zde byly pod záštitou Západočeského muzea v Plzni provedeny archeologické výzkumné práce.

Špitální areál byl založen roku 1320 Konrádem z Dobřan. Špitální kostel sloužil až do roku 1783, kdy byl zrušen. O rok později byl z hygienických důvodů uzavřen i hřbitov. Během své existence byl celý areál několikrát poničen a vypálen a mnohokrát byl také zasažen záplavami^{52,53}.

Zub nebyl, dle informací doktorky Anny Pankowské, odebrán z čelisti kostry, ale byl nalezen izolovaně. Patřil nedospělému jedinci neurčeného pohlaví.



Obrázek 17 Vzorek č. 6 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.7 VZOREK Č. 7

Vzorek č. 7	
Lokalita	U Zvonu
Kontext	izolovaný zub
Typ zubu	M ₁ sin
Datování	středověk
Datum terénního výzkumu	2010–2011
Vedoucí výzkumu	J. Orna

Tabulka 10 Informace o vzorku č. 7

Vzorek č. 7 byl nalezen na stejné lokalitě jako vzorek č. 6.

Opět se jednalo o izolovaně nalezený zub patřící nedospělému jedinci neurčeného pohlaví.



Obrázek 18 Vzorek č. 7 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.8 VZOREK Č. 8

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

Tabulka 11 Informace o vzorku č. 8

Lokalita Karlín se nalézá na území Prahy 8 a jedná se o hřbitov z 18. a 19. století. Archeologický průzkum zde byl proveden během roku 2013 a to pod hlavičkou společnosti Archeo Pro, o. p. s.

Na uvedeném území byl ve 30. letech 18. století založen hřbitov pro zesnulé z nedaleké invalidovny. V polovině 18. století došlo k rozšíření pohřebiště pro zemřelé z pražské vojenské posádky, posléze zde byly založeny i dva evangelické hřbitovy. Navíc se kolem kaple rozprostíral hřbitov důstojnický. Hřbitov byl zrušen v roce 1894. Po deseti letech od zrušení bylo značné množství hrobů exhumováno a ostatky byly převezeny na Olšanské hřbitovy. Následně byl areál zavezen zeminou a sloužil jako obecní pokusná a zásobní zahrada⁵⁴.

Stejně jako v předchozích třech případech byl vzorek nalezen izolovaně od čelisti. Patřil dospělému jedinci neurčeného pohlaví.



Obrázek 19 Vzorek č. 8 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.4.2.9 VZOREK Č. 9

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

Tabulka 12 Informace o vzorku č. 9

Vzorek č. 9 nepochází, na rozdíl od ostatních zubů, z žádného archeologického výzkumu a nikdy nebyl uložen v zemi. Byl věnován osobou mužského pohlaví.

Na rozdíl od ostatních vzorků je díky tomu, že se jedná o současný zub, známa i přibližná historie kojení dané osoby. Chlapec byl první tři dny na umělé výživě, poté nastalo přibližně třítydenní období, kdy byl kojen, ale zároveň i dokrmován. Poté už byl opět pouze na umělé výživě.



Obrázek 20 Vzorek č. 9 před a po zalití do pryskyřice a rozřezání

3.5 MĚŘENÉ IZOTOPY

Jak pomocí průletového (TOF), tak kvadrupólového (Q), ICP-MS byly proměřeny vybrané izotopy některých prvků.

ICP-TOF-MS umožňuje díky principu svého hmotnostního analyzátoru rozumné proměření více prvků současně než ICP-Q-MS i při kontinuální ablaci vzorku. Pomocí tohoto přístroje tedy bylo měřeno více prvků, respektive izotopů, než pomocí ICP-Q-MS. Konkrétně se jedná o následující izotopy: ⁸⁶Sr, ⁸⁷Sr, ⁸⁸Sr, ¹³⁷Ba, ¹³⁸Ba, ⁴³Ca,

^{208}Pb a ^{238}U . Prvky byly vybrány na základě doporučení doktorky Anny Pankowské, která vzorky zubů poskytla. Dané izotopy byly zvoleny na základě studia literatury^{25,38,55,56}.

Při analýze pomocí ICP-Q-MS byl počet měřených izotopů zredukován na následující: ^{88}Sr , ^{138}Ba , ^{43}Ca a ^{208}Pb .

Z hlediska interpretací a odhadování způsobu stravování je pro tuto práci nejdůležitější Ba, respektive jeho poměr ku Ca. Sr bylo zvoleno pro určité srovnání s Ba (viz kapitolu 2.3.2.2) a Pb bylo vybráno na základě výsledků předešlých měření pomocí ICP-TOF-MS, jakožto prvek odrážející možnou kontaminaci zubů z půdy.

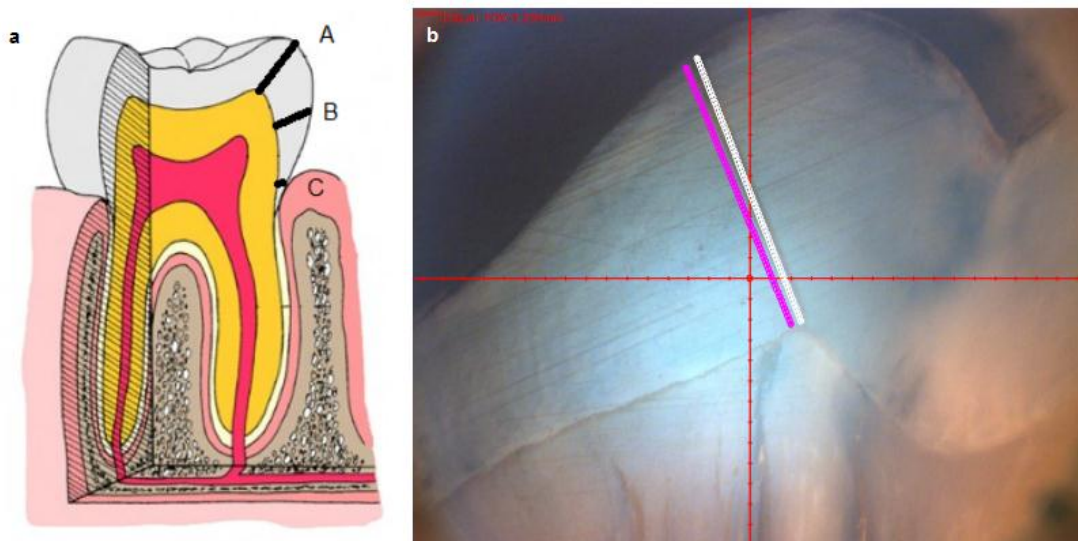
3.6 VOLBA ABLAČNÍHO MÍSTA A TYPY EXPERIMENTŮ

Ablační místa na vzorcích byla volena ve sklovině, jelikož se jedná o nejodolnější zubní tkáň a možnost diagenese je u ní menší než u dentinu.

Byly provedeny dva typy experimentů. První byl zaměřen na analýzu linie vedené od spojení skloviny a dentinu směrem k povrchu zubu. Na každém zubu byly vedeny linie na třech rozdílných místech: poblíž vrcholu zubu (část zubu tvořená v počátcích vývoje korunky), poblíž krčku (část tvořená na konci vývoje korunky), třetí místo bylo voleno mezi nimi. Místa (v uvedeném pořadí) jsou značena písmeny „A“, „C“ a „B“. V každém takovémto místě byly vedeny minimálně dvě linie, vzorkované co nejbližše vedle sebe (viz obrázek 21). Výsledky z obou linií byly poté průměrovány.

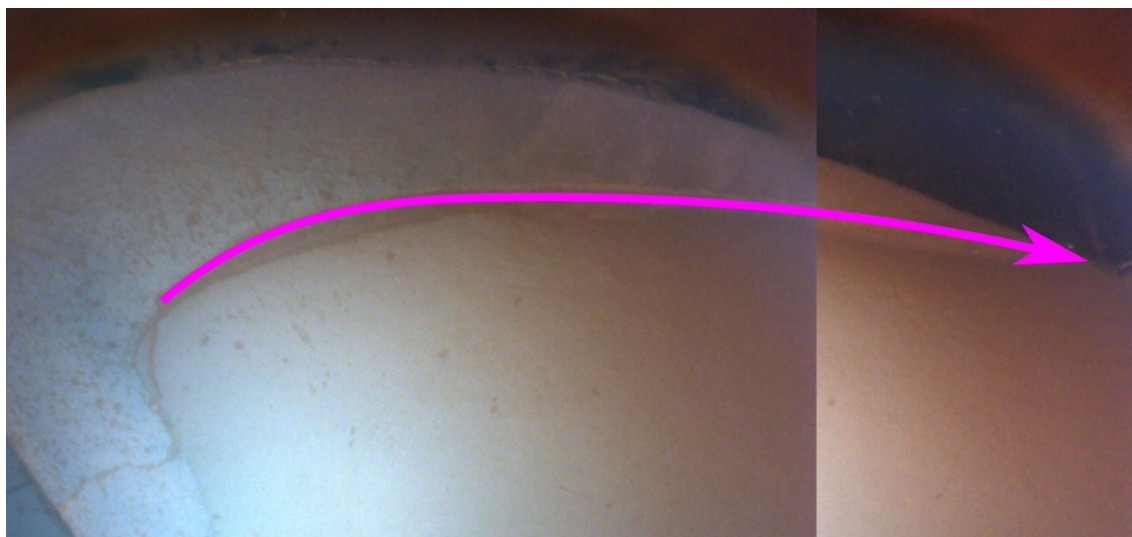
Byl sledován průměrný obsah měřených prvků v ablatovaných liniích a také místně (časově) závislý obsah, tedy obsah analytů v daném místě zvolené linie. Místně (časově) závislý obsah byl poté vyhodnocen pomocí grafů (obsah vyneseny proti místu na vzorku (době ablace)).

Tento typ experimentu byl proveden na obou přístrojích pro porovnání jejich výsledků a pro určení přibližných obsahů prvků v zubech.



Obrázek 21 a) Schématické znázornění sekci „A“, „B“ a „C“ ablatovaných ve sklovině zubu (obrázek převzat⁵⁷ a upraven); **b)** Fotografie linií ablatovaných na skutečném zubu (sekce „A“ vzorku č. 1)

Při druhém typu experimentu byla ve sklovině ablatována linie vedená podél spojení EDJ, která by měla nabídnout komplexní pohled na distribuci prvků v zubech v průběhu celého vývoje korunky (obrázek 22). Výsledkem jsou opět místně (časově) závislé grafy obsahů měřených izotopů.



Obrázek 22 Fotografie s naznačením linie ablatované ve sklovině podél EDJ a jejího směru (vzorek č. 9)

3.7 ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU

Obsah jednotlivých analytů byl zaznamenáván v jednotkách cps (z angl. „*counts per second*“).

Výstup z měření byl získán a ukládán v souborech s příponou *.mdb* (ICP-TOF-MS), respektive *.csv* (ICP-Q-MS). Další zpracování a tvorba grafů probíhaly v programech Excel 2013 a Access 2013 (oba Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 OPTIMALIZACE PARAMETRŮ LASEROVÉ ABLACE

Při optimalizaci parametrů laserové ablace byly využity zuby použité v diplomové práci Jany Bohunské⁵⁸. Pocházejí z lokality Chrást'any a jsou datovány do starší doby bronzové. Konkrétně se jedná o zuby s označením 230/813 a 374/820. Byly objeveny při stejném archeologickém výzkumu jako vzorek č. 4 zkoumaný v této práci.

Na rozdíl od pozdějších měření byla optimalizace parametrů prováděna pomocí linií ablatovaných v dentinu a ne ve sklovině. Důvodem byla nutnost ablatovat mnoho dlouhých linií, což by ve sklovině, která tvoří jen malou část zubu, nebylo z prostorových důvodů možné. Dentin je strukturně nejbližším materiálem, na kterém bylo možno optimalizaci provést.

Byly optimalizovány následující parametry: procentuální výkon laseru a s ním spojený laserový tok, pulsní frekvence laseru, průměr laserového paprsku a rychlost jeho posunu, celkový průtok nosného plynu (He) a poměr jeho průtoků (MFC1 a MFC2; z angl. „*mass flow controller*“ – softwarová regulace průtoku).

Optimalizační měření byla prováděna pomocí ICP-TOF-MS. Optimalizace byla provedena s ohledem na velikost signálu a RSD. Nicméně, jelikož dentin, a samotný zub obecně, je z podstaty nehomogenní materiál (předpokládá se určitá distribuce prvků v různých vrstvách dentinu), RSD nebyla stěžejním parametrem optimalizace.

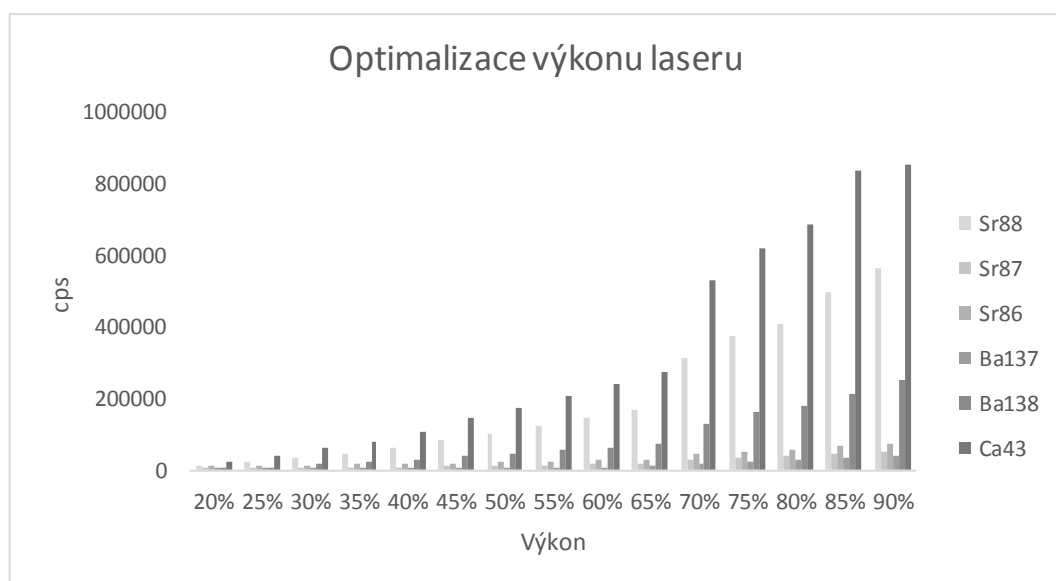
Velikost signálu nejintenzivnějšího z měřených izotopů by pro měření na ICP-TOF-MS neměla pro zachování životnosti detektoru dlouhodobě výrazně překračovat hodnotu 1 000 000 cps.

Po optimalizaci všech parametrů byly finální podmínky vyzkoušeny i pro ICP-Q-MS, a to jak na zubu (230/813), tak i na standardních referenčních materiálech NIST SRM 610 a NIST SRM 612.

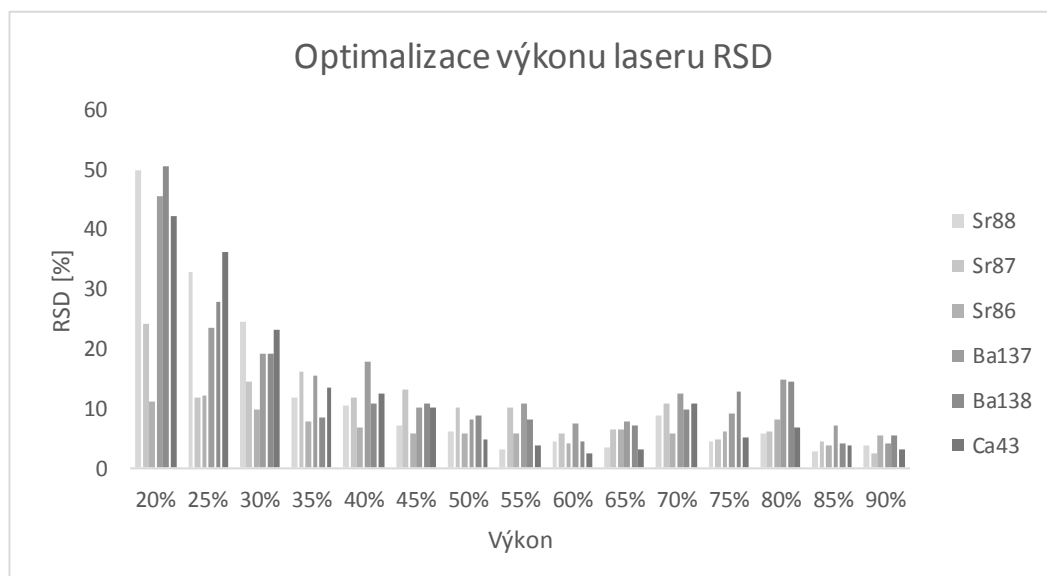
4.1.1 VÝKON LASERU (LASEROVÝ TOK)

Byl testován výkon laseru v rozmezí 20–90 %, vždy s nárůstem o 5 %, což odpovídá laserovému toku 2,12–9,54 J·cm⁻² (grafy 1 a 2). Měření byla provedena při pulsní frekvenci 20 Hz, průměru laserového paprsku 30 μm, rychlosti jeho posunu 10 μm·s⁻¹, celkovém průtoku He 0,65 l·min⁻¹ a poměru jednotlivých toků 1 : 1.

S ohledem na dostatečný signál a uspokojivé RSD byl jako vhodný zvolen výkon 75 %, což odpovídá laserovému toku 7,94 J·cm⁻².



Graf 1 Optimalizace výkonu laseru

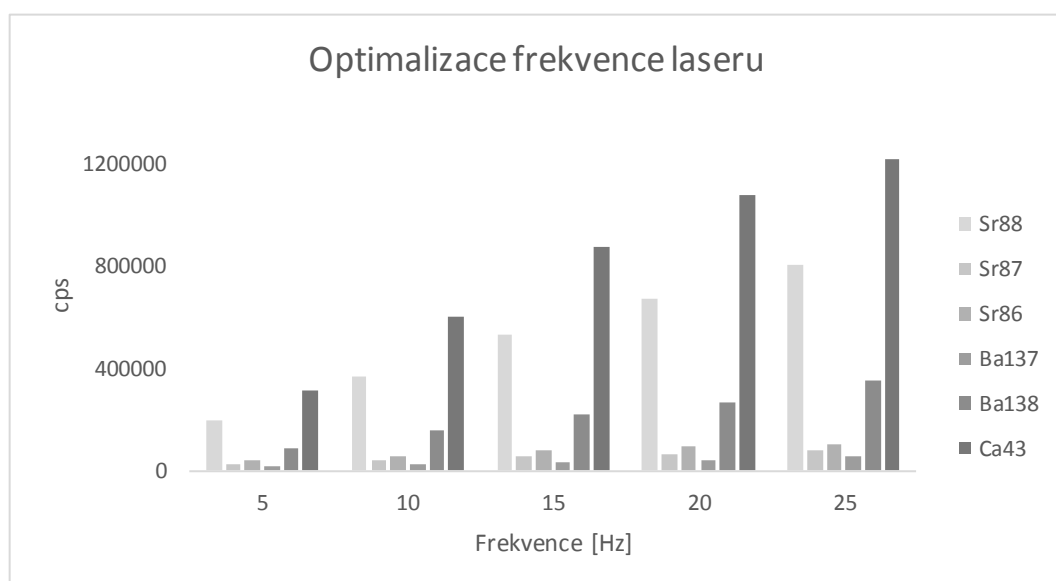


Graf 2 Optimalizace výkonu laseru – RSD

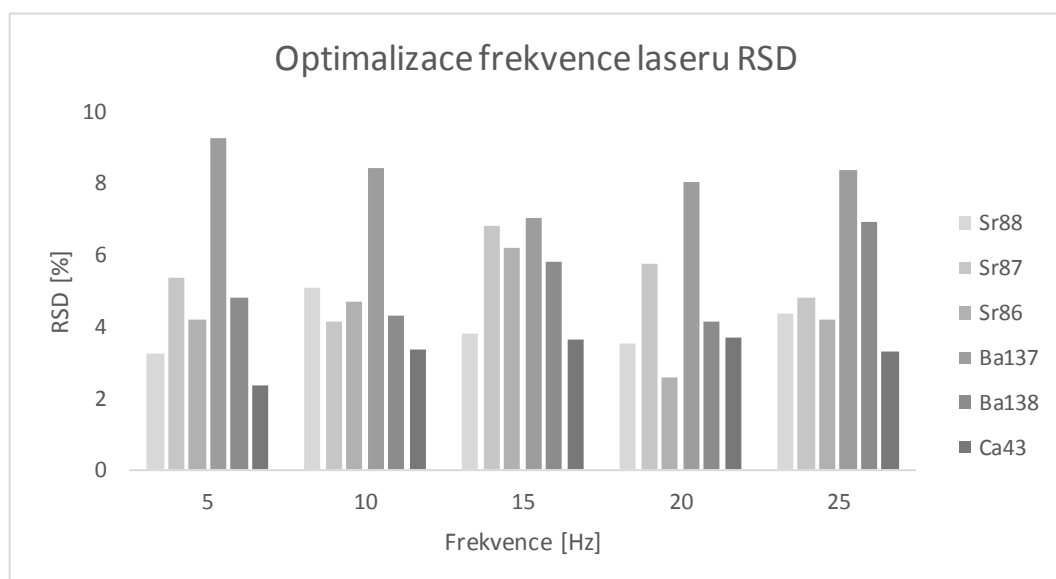
4.1.2 PULSNÍ FREKVENCE LASERU

Byly změřeny signály a RSD pro pulsní frekvence v rozmezí 5–25 Hz, vždy s nárůstem o 5 Hz. Měřilo se při výkonu 90 % ($9,54 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), průměru laserového paprsku $30 \mu\text{m}$, rychlosti jeho posunu $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, celkovém průtoku He $0,65 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ a poměru jednotlivých toků 1 : 1 (grafy 3 a 4).

Jako optimální byla zvolena frekvence 20 Hz, pro vyšší frekvenci již byla odezva s ohledem na doporučené signály až příliš vysoká.



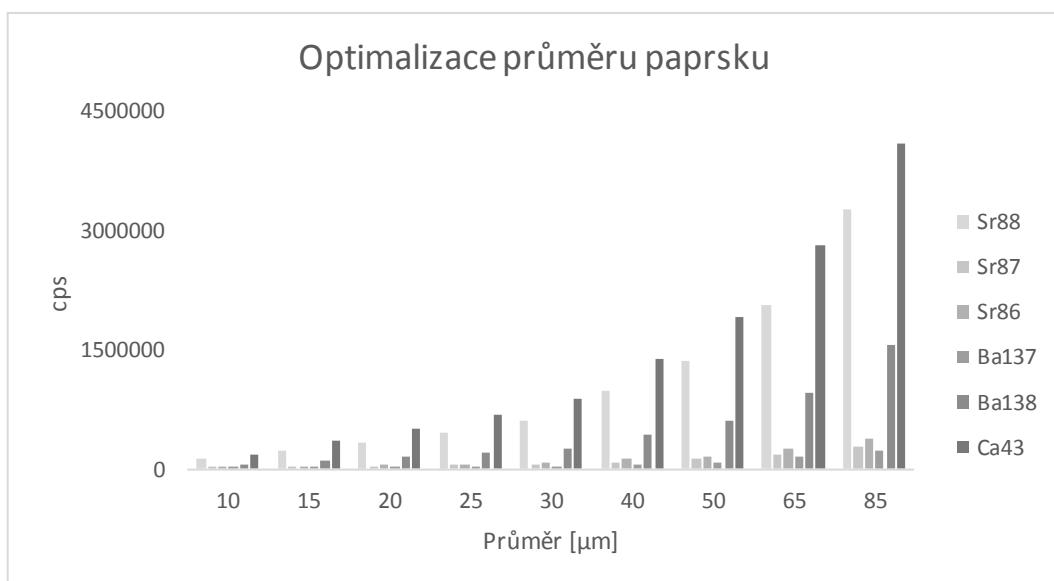
Graf 3 Optimalizace pulsní frekvence laseru



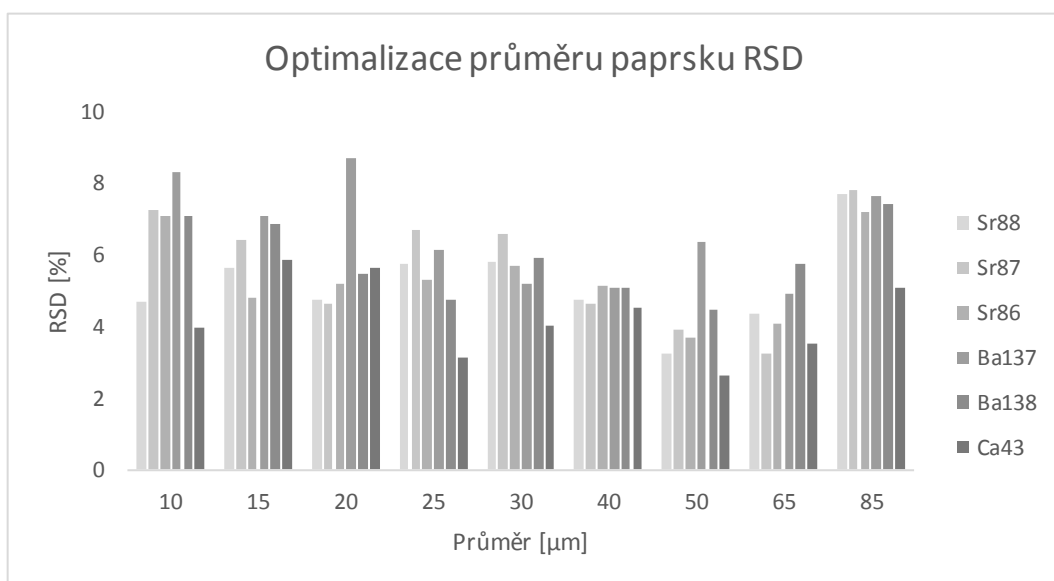
Graf 4 Optimalizace pulsní frekvence laseru – RSD

4.1.3 PRŮMĚR LASEROVÉHO PAPRSKU

Byl zvolen kruhový tvar laserového paprsku a optimalizován byl jeho průměr. Byly testovány hodnoty v rozmezí 10–85 μm (software ablace umožňoval nastavení pouze určitých, fixně daných, hodnot průměru paprsku). Ostatní parametry měření byly: výkon 90 % ($9,54 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$), pulsní frekvence 20 Hz, rychlosti posunu paprsku $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, celkový průtok He $0,65 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ a poměr jednotlivých toků 1 : 1 (grafy 5 a 6). Jako optimální byl zvolen paprsek o průměru 30 μm , při větším průměru již byly signály až příliš vysoké. Na RSD neměl parametr zásadní vliv.



Graf 5 Optimalizace průměru laserového paprsku

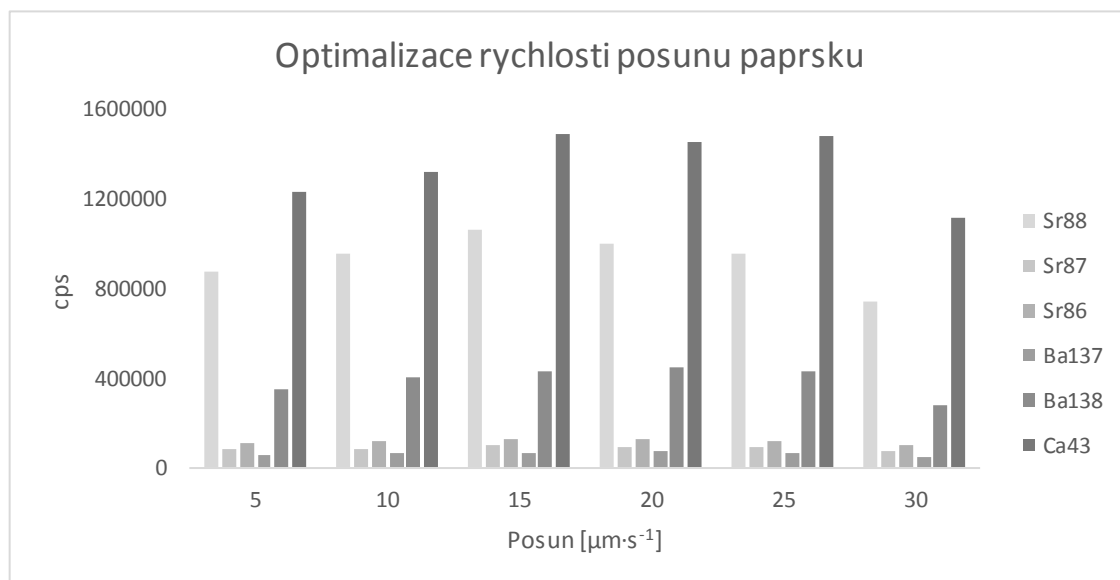


Graf 6 Optimalizace průměru laserového paprsku – RSD

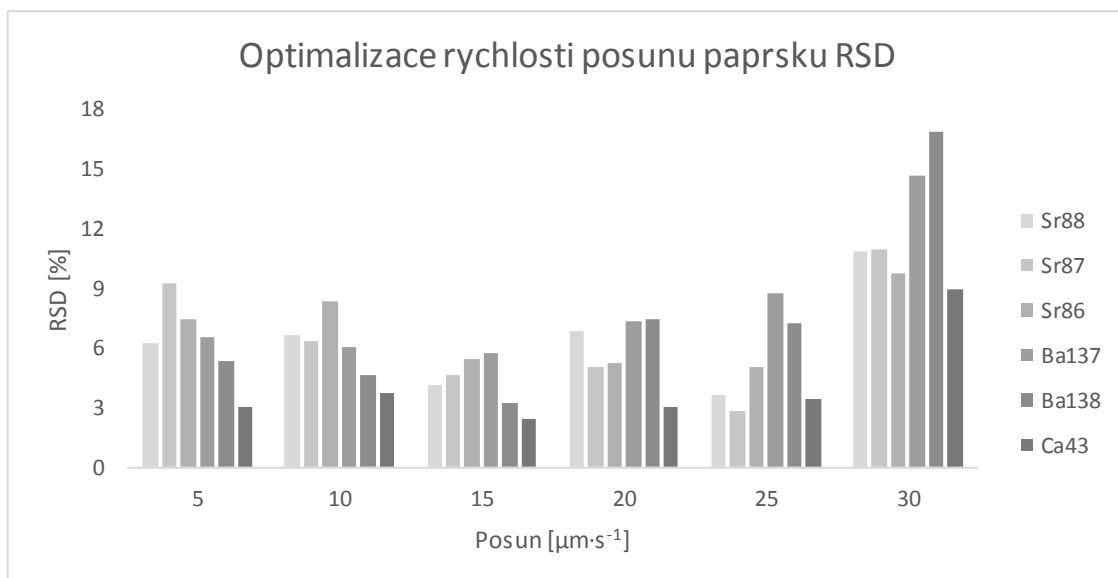
4.1.4 RYCHLOST POSUNU LASEROVÉHO PAPRSKU

Byla optimalizována rychlost posunu laserového paprsku v rozmezí 5–30 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, vždy po krocích odpovídajících zvýšení rychlosti o 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Ostatní parametry měření byly: výkon 90 % (9,54 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), pulsní frekvence 20 Hz, průměr paprsku 40 μm , celkový průtok He 0,65 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ a poměr jednotlivých toků 1 : 1 (grafy 7 a 8).

Jako optimální byla, i přes vyšší hodnoty RSD (vzhledem k podobným RSD u ostatních testovaných rychlostí je pravděpodobné, že byla způsobena větší nehomogenitou ablatované linie), zvolena rychlost 30 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Při ní byl zaznamenán rozumný signál a tato hodnota také dobře koresponduje s nakonec zvolenou hodnotou průměru laserového paprsku (30 μm).



Graf 7 Optimalizace rychlosti posunu laserového paprsku

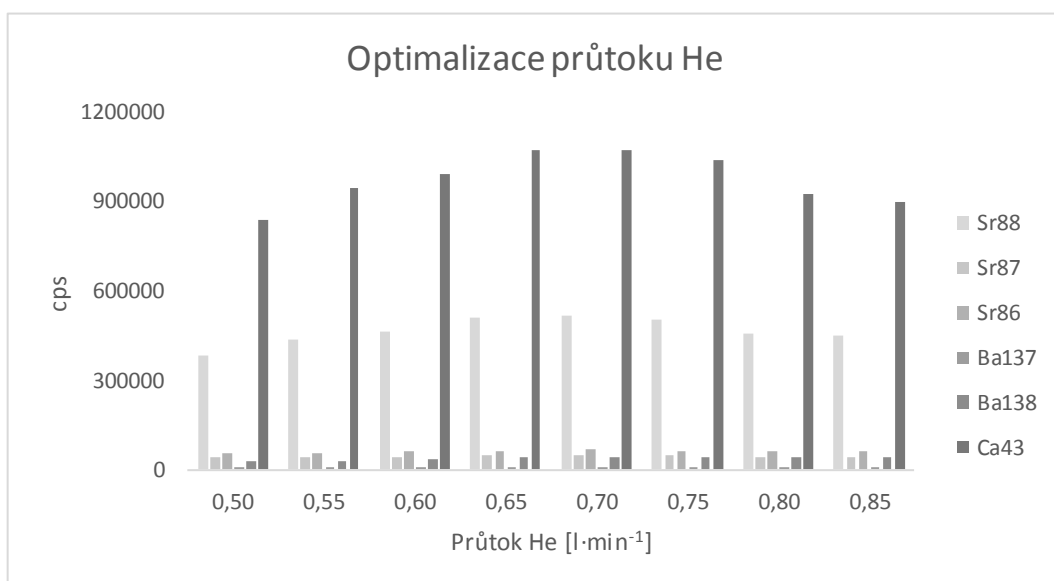


Graf 8 Optimalizace rychlosti posunu laserového paprsku – RSD

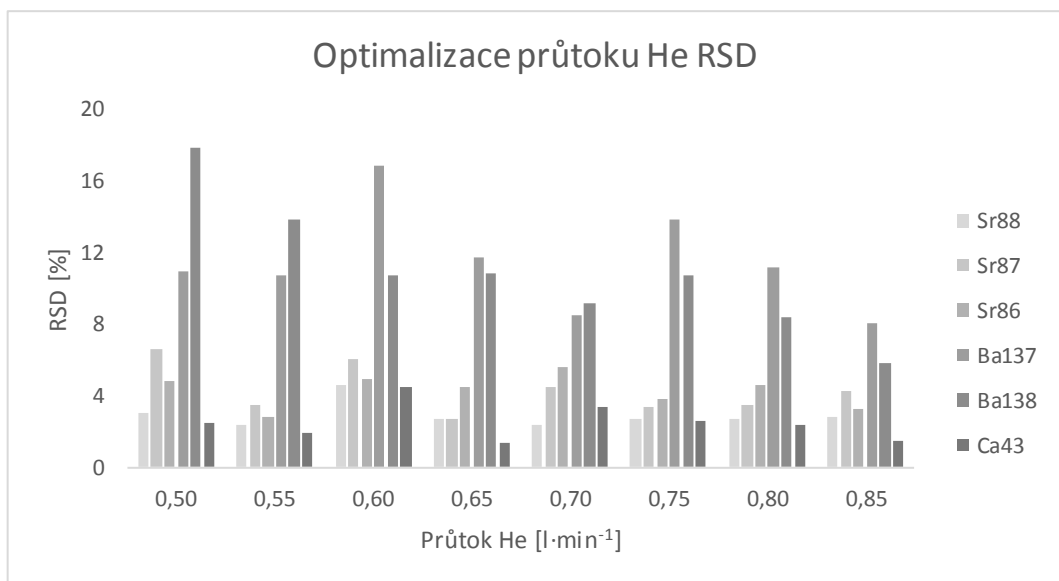
4.1.5 PRŮTOK NOSNÉHO PLYNU

Byl testován průtok He v rozmezí 0,50–0,85 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, vždy s nárůstem o 0,05 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Parametry byly testovány při výkonu 75 % (7,94 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), pulsní frekvenci 20 Hz, průměru laserového paprsku 30 μm , rychlosti jeho posunu 30 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, a poměru jednotlivých toků He 1 : 1 (grafy 9 a 10).

Jako optimální se ukázal průtok 0,65 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Při tomto průtoku byl nejvyšší signál, přijatelné RSD a zároveň rozumná spotřeba nosného plynu.



Graf 9 Optimalizace průtoku nosného plynu (He)

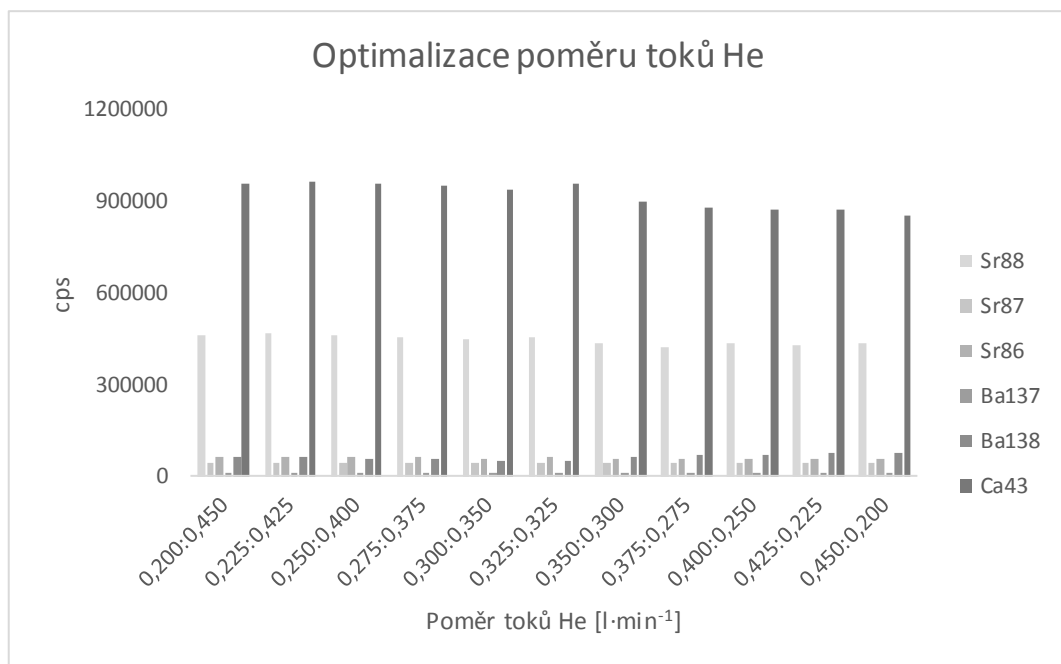


Graf 10 Optimalizace průtoku nosného plynu (He) – RSD

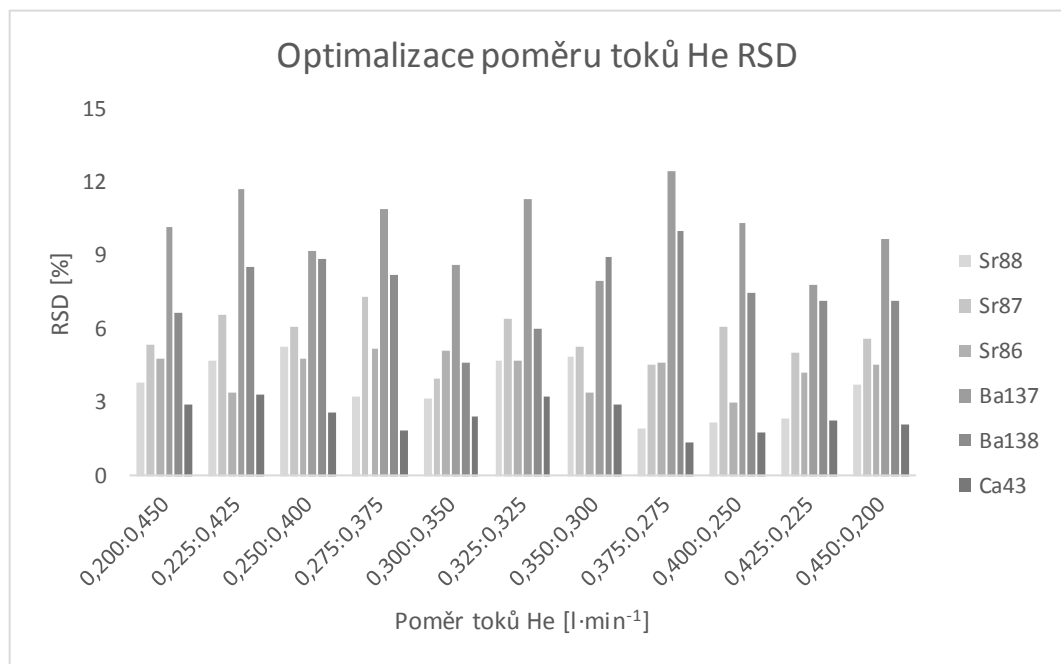
4.1.6 POMĚR PRŮTOKŮ NOSNÉHO PLYNU

Byl testován poměr průtoků He MCF1 a MCF2 (pro zjednodušení označené He₁ a He₂) při celkovém průtoku plynu 0,65 l·min⁻¹. Rozsah testovaných poměrů byl v rozmezí od 0,200 l·min⁻¹ (He₁) : 0,450 l·min⁻¹ (He₂) do 0,450 l·min⁻¹ (He₁) : 0,200 l·min⁻¹ (He₂). Rozdíl mezi jednotlivými kroky byl 0,025 l·min⁻¹ pro každý z toků. Ostatní parametry při testování byly následující: výkon laseru 75 % (7,94 J·cm⁻²), pulsní frekvence 20 Hz, průměr laserového paprsku 30 μm a rychlost jeho posunu 30 μm·s⁻¹ (grafy 11 a 12).

Jako ideální se nakonec ukázal poměr průtoků 0,300 l·min⁻¹ (He₁) : 0,350 l·min⁻¹ (He₂).



Graf 11 Optimalizace poměru průtoků nosného plynu (He)



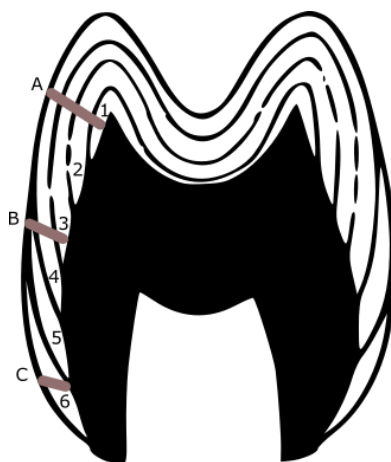
Graf 12 Optimalizace poměru průtoků nosného plynu (He) – RSD

4.2 ICP-TOF-MS

Pomocí ICP-MS s průletovým analyzátozem byly zkoumány linie vedené ve sklovině směrem od EDJ k povrchu zubu (pro podrobnější popis viz kapitolu 3.6). Na každém zubu byly ablatovány linie ve třech místech označených „A“, „B“ a „C“. Průměrný obsah

měřených izotopů v ablatovaných liniích dává informace o jejich ukládání v zubu na počátku vývoje korunky (linie „A“), zhruba v polovině jejího vývoje (linie „B“) a na jeho konci (linie „C“).

Jednotlivé linie byly vždy různě dlouhé, v závislosti na síle skloviny ve zvoleném místě daného zubu. Každá z linií potom obsahuje průměrné složení více vrstev skloviny s tím, že linie z jednotlivých sekcí téhož zubu se mohou v určitých vrstvách „signálově překrývat“ (dáno způsobem vývoje korunky, viz obrázek 23).



Obrázek 23 Naznačení linií ablatovaných ve sklovině zubu v sekcích „A“, „B“ a „C“. Linie „A“ udává průměrné složení z vrstev 1–4, linie „B“ z vrstev přibližně 3–5 a linie „C“ z vrstvy 6. Je vidět, že linie „A“ a „B“ jsou částečně vedeny skrze stejné vrstvy skloviny (3 a 4). Jejich signál se tedy částečně „překrývá“.

4.2.1 PRŮMĚRY Z JEDNOTLIVÝCH SEKCIÍ

Při analýze linií byl integrační čas získávání signálu nastaven na 2 s a v závislosti na délce ablatované čáry byl získán určitý počet výsledků. Finální signál dané linie je poté průměrem těchto výsledků.

Průměrné výsledky získané zprůměrováním dvou vedle sebe vedených linií v každé ze tří sekcí daného vzorku jsou shrnuty v tabulkách 13 a 14.

Dále je v tabulkách uveden celkový průměr pro dané izotopy získaný zprůměrováním výsledků všech tří sekcí. Tabulky také obsahují hodnoty poměrů vybraných izotopů Sr a Ba vůči Ca.

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

Tabulka 13 Shrnutí výsledků obsahu měřených izotopů (v jednotkách cps) v daných sekcích jednotlivých stálých zubů získaných pomocí měření na ICP-TOF-MS

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

Tabulka 14 Shrnutí výsledků obsahů měřených izotopů (v jednotkách cps) v daných sekcích jednotlivých dočasných zubů získaných pomocí měření na ICP-TOF-MS

Jak je již uvedeno výše, jedná se o průměrné výsledky ze tří odlišných časových období vývoje zubu a jako takové jsou spíše orientační. Dobře však poslouží při hledání výraznějších odlišností mezi jednotlivými vzorky.

Hodnoty získané zprůměrováním výsledků všech tří sekcí pro většinu izotopů nevykazují zásadní odlišnosti mezi jednotlivými vzorky. Zvláště dobře je to patrné u izotopu vápníku ^{43}Ca , který jako majoritní prvek obsažený v zubu slouží jako interní standard. U vápníku nejsou také viditelné zásadní výkyvy mezi sekcemi „A“, „B“ a „C“ jednotlivých zubů. To dokazuje, že se opravdu jedná o prvek, který je jako interní standard použitelný. Vztažení výsledků měření k vápníku je tedy vhodné pro minimalizaci vlivu rozdílných tvrdostí různých míst skloviny a s ní spojenou rozdílnou účinností ablace.

4.2.1.1 ZVÝŠENÝ OBSAH OLOVA

Jediný prvek, u kterého lze vidět odlišnosti mezi jednotlivými vzorky je olovo. U většiny vzorků (ať už stálých, či dočasných) se průměrný obsah olova v zubu pohybuje přibližně v rozmezí 500–1 000 cps. Jinak je tomu u vzorků č. 6 a 8, u kterých obsah olova odpovídá více než 2 000 cps a u vzorku č. 7, který vykazuje dokonce o řád vyšší výsledky (více než 12 000 cps) než ostatní vzorky.

Společným jmenovatelem u těchto tří vzorků je to, že byly nalezeny v půdě izolovaně (mimo čelist). Nicméně, izolovaně byl nalezen i vzorek č. 5, u nějž nebyl zvýšený obsah olova prokázán.

Vzorky č. 6 a 7 byly také nalezeny ve stejné lokalitě, U Zvonu, Plzeň, která byla během doby své existence mnohokrát zasažena záplavami, požáry a jinými katastrofami (viz kapitolu 3.4.2.6). Tyto jevy mohly zapříčinit zvýšené riziko vnější kontaminace nalezených zubů. Nicméně, bez znalosti obsahu olova v půdě dané lokality a jeho obsahu v jiných kosterních nálezech, se jedná pouze o teoretické vysvětlení a pro jeho potvrzení je třeba provedení dalších studií.

Vzorek č. 8 pochází z vojenského hřbitova v Karlíně (viz kapitolu 3.4.2.8). Dle informací doktorky Pankowské, byly na hřbitově využívány kovové rakve ze zinku a zinkalu. Některé z nich ale obsahovaly i stopy olova (cca 0,5 % w/w). Dalším možným vysvětlením je kontaminace způsobená pozdějším industriálním využitím pozemku. Zemina na některých místech naleziště dokonce intenzivně zapáchala po naftě nebo

olejích. Pro potvrzení těchto hypotéz by ale bylo třeba provést hlubší výzkumy a měření, vymykající se rozsahu a zaměření této práce.

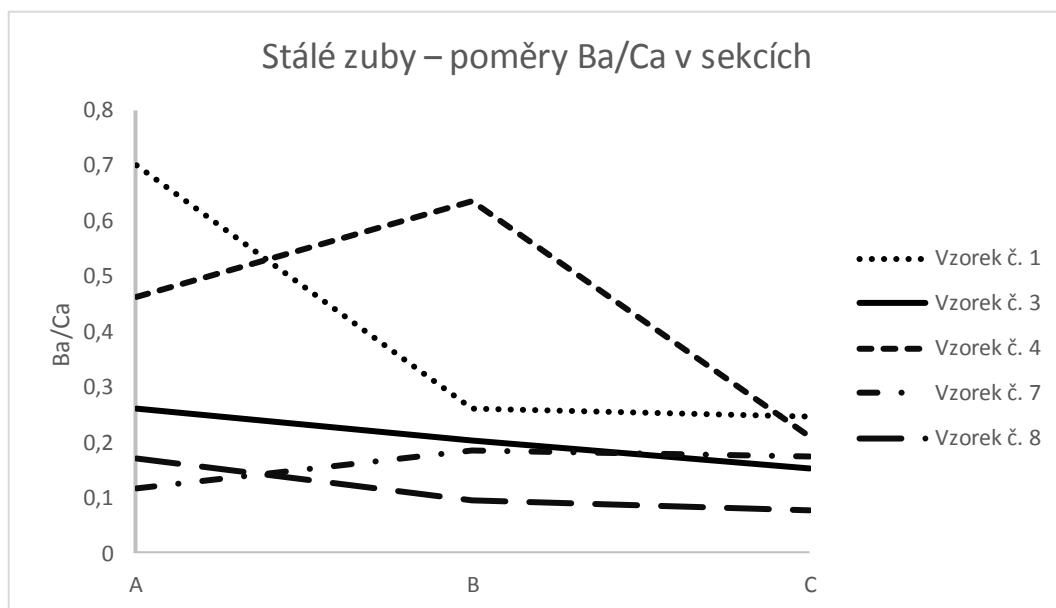
Vyloučit ale nelze ani kontaminaci zubů způsobenou stravováním, případně jinými vlivy, již během života jedinců.

4.2.1.2 POMĚRY Ba/Ca V JEDNOTLIVÝCH SEKCÍCH

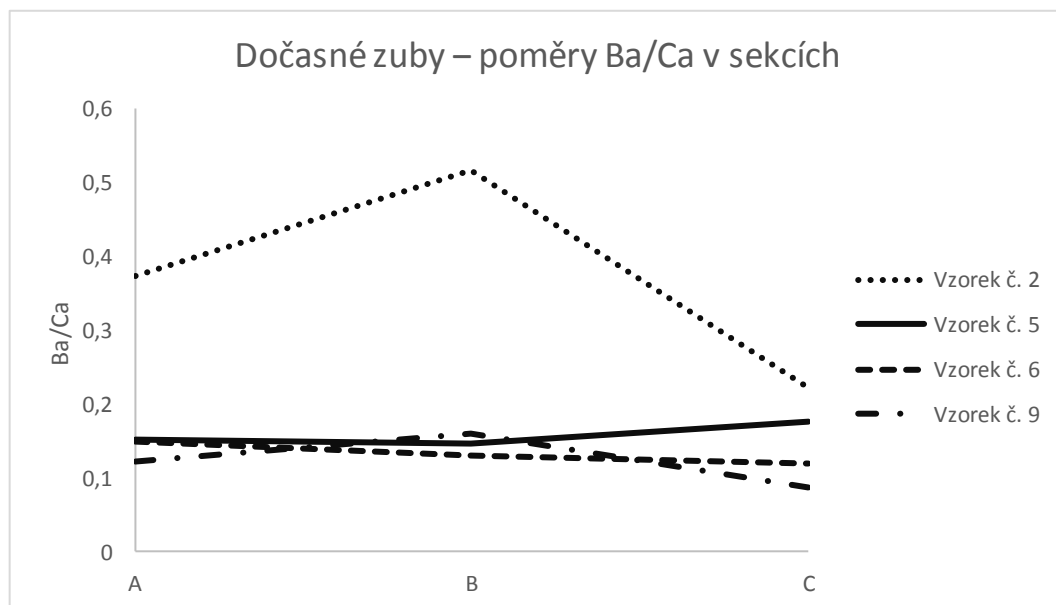
Důležitým faktorem odrážejícím stravovací návyky je obsah Ba, respektive poměr Ba/Ca (viz kapitolu 2.3.2.2).

V jednotlivých sekcích zubů byl měřen obsah Ba, Ca i poměr Ba/Ca . Poměr Ba/Ca byl softwarem přístroje ICP-TOF-MS počítán automaticky. Z měřených izotopů Ba byl pro výpočet jeho poměru ku vápníku použit hojněji zastoupený ^{138}Ba , který je také běžněji využíván v literatuře²⁵.

Z naměřených poměrů $^{138}Ba/^{43}Ca$ byly zpracovány grafy 13 a 14, které zobrazují, jak se tento mění v jednotlivých sekcích zubů.



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



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

Z grafu stálých zubů (graf 13) jsou patrné dva odlišné trendy. Prvním je nárůst signálu mezi sekcemi „A“ a „B“ (vzorky 4 a 7), ostatní vzorky vykazují postupný pokles signálu v pořadí sekcí.

Oba tyto trendy se dají vysvětlit. Jak je popsáno výše, stále první stoličky, což je případ všech testovaných vzorků, se začínají vyvíjet v období okolo porodu. Předpokládá se tedy, že poměr Ba/Ca by měl na počátku jejich vývoje být již vysoký, případně postupně narůstat (období kojení). Následuje předpokládaný pokles v období odstavování a přechodu na pevnou (nemléčnou) stravu. Tento pokles (předpokládaný v sekcích „B“ a „C“) je patrný u všech vzorků.

Poměry Ba/Ca v jednotlivých sekcích nejsou pro všechny zuby stejné a dosti se liší, to je ale možné vysvětlit individuálními odlišnostmi v metabolismu daných jedinců²⁵.

Dočasné stoličky se začínají vyvíjet již před narozením (cca 5–6 měsíců). Jejich vývoj je potom ukončen okolo šestého (m_1), respektive dvanáctého (m_2), měsíce života (viz tabulku 2, str. 29). Sekce „A“ by proto měla vykazovat nejnižší hodnoty poměru Ba/Ca, v dalších sekcích se předpokládá nárůst. Ten by mohl být patrný v sekci „B“, vytvořené okolo porodu. Lidé průměrně začínají odstavovat své potomky okolo šestého měsíce života²⁸, v sekci „C“, která svým složením odpovídá přibližně tomuto období, by tedy mohl být patrný určitý pokles signálu. Trend je patrný u vzorků č. 2, 6 i 9 (všechno m^1 , případně m_1).

Výjimkou je vzorek č. 5 (m_2), u nějž je vidět neočekávaný nárůst mezi sekcemi „B“ a „C“. To nicméně může být způsobeno delší dobou kojení daného jedince.

Při interpretaci výsledků je třeba brát v potaz, že se jedná o hodnoty průměrné, zahrnující vždy delší časové období vývoje zubu. Také vzdálenosti mezi jednotlivými sekcemi nemohly být vždy zvoleny úplně stejně (praskliny a jiná abnormální místa na zubech). Místa byla volena i s ohledem na rozumnou délku ablatované čáry, tj. v co možná nejširším místě skloviny, s přihlédnutím k poloze dané sekce.

Výsledky mohou být také ovlivněny určitými abnormalitami ve sklovině a její nehomogenitou obecně. Jedná se tedy opravdu o orientační výsledky.

4.2.2 MÍSTNÍ (ČASOVÝ) PROFIL LINIÍ V SEKCÍCH

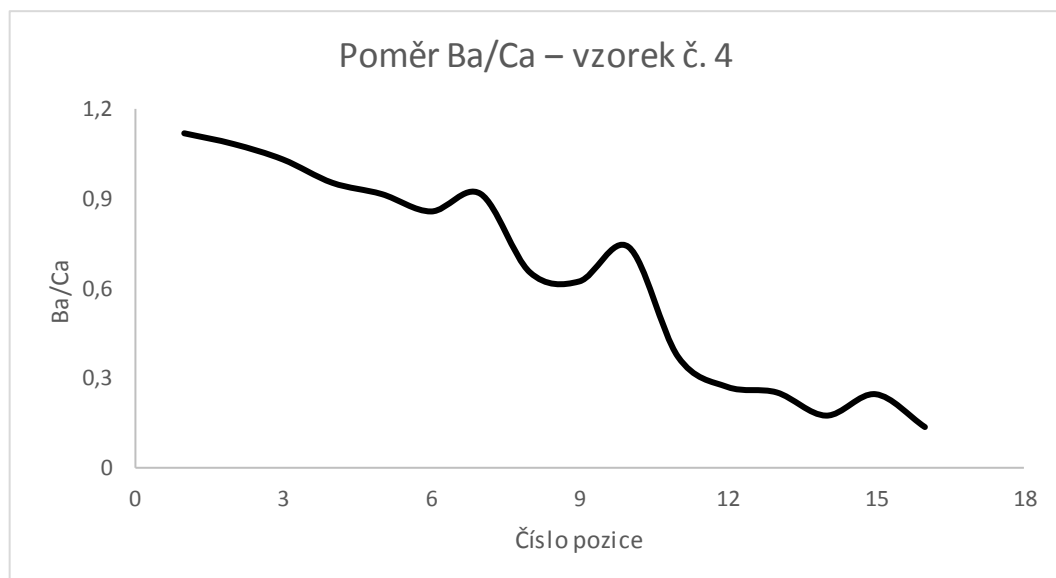
Jak je popsáno výše, byly změřeny i místní (časové) profily poměru Ba/Ca v liniích vedených v jednotlivých sekcích zubů ve směru od EDJ k jeho povrchu. Díky zmenšující se vrstvě skloviny směrem od vrcholu korunky ke krčku byly nejdelší, a proto při tomto experimentu nejhodnotnější, linie v sekcích „A“. U některých vzorků byly dostatečně dlouhé i linie vedené v sekcích „B“.

Integrační čas získávání signálu byl u tohoto typu experimentu nastaven na 1 s. Celkový počet bodů (x-ová osa grafů 15 a 16) tvořících výslednou křivku grafu byl poté závislý na síle skloviny v ablatovaném místě.

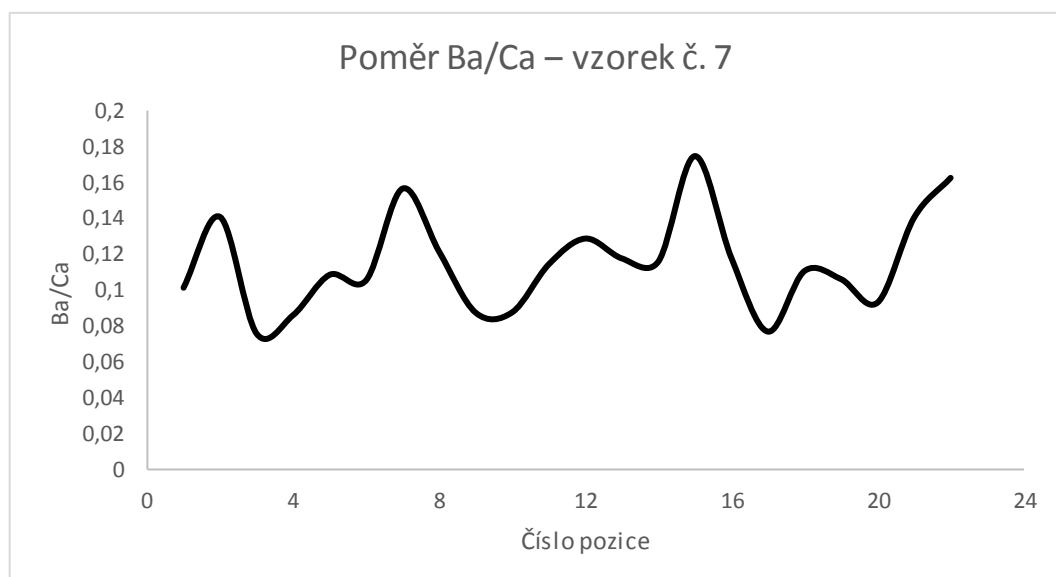
U těchto měření se ukázalo, že poměr Ba/Ca není pravděpodobně závislý pouze na změnách ve stravování. Je možné, že je podobně jako poměr Sr/Ca, závislý i na pozici daného místa na spojnici vedené od EDJ k povrchu zubu (viz kapitolu 2.5.1), tedy že v hlubších částech skloviny je poměr Sr/Ca vyšší než v jejích povrchových částech (dáno rozdílným stupněm mineralizace).

Zároveň je třeba brát v potaz, že povrch skloviny se také liší od jejího zbytku (zvýšený obsah některých prvků, viz kapitolu 2.5.2). U zubů uložených po delší časový úsek v zemi je také zvýšené riziko kontaminace, které se týká především povrchu zubu.

Trend značného poklesu signálu Ba/Ca byl pozorován u vzorků č. 1, 3, 4, 8 a 9, ostatní vzorky vykazovaly pokles mírnější, případně byl signál relativně konstantní v celé linii (pro příklad viz grafy 15 a 16). Je možné, že snížení signálu bylo způsobeno nejen změnami jídelníčku, ale také odlišnou mineralizací zubu.



Graf 15 Místně (časově) závislý profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené v sekci „A“ vzorku č. 4



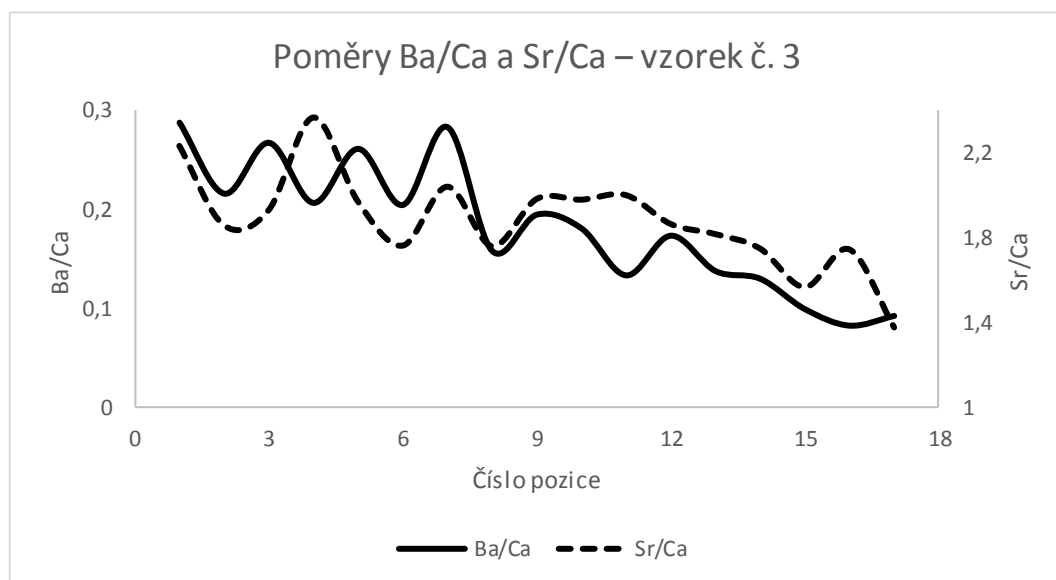
Graf 16 Místně (časově) závislý profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené v sekci „A“ vzorku č. 7

Rekonstrukce doby kojení a odstavování odvozená na základě profilů linií vedených v sekcích „A“, „B“ a „C“ tedy nemusí být 100% přesná. Zároveň žádná ze sekcí nepokrývá celé období vývoje zubu a jednotlivé linie se částečně „signálově překrývají“.

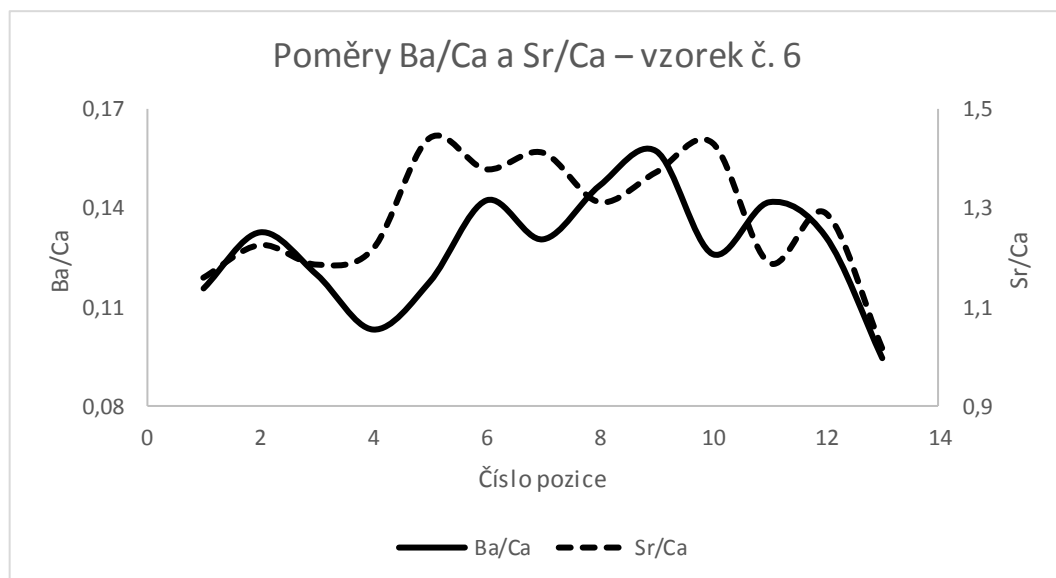
4.2.2.1 SROVNÁNÍ PROFILŮ POMĚRŮ Ba/Ca A Sr/Ca

Byly také porovnány profily poměrů $^{138}Ba/^{43}Ca$ a $^{88}Sr/^{43}Ca$ vedené v sekcích „A“ vzorků. Tvary zjištěných profilů byly u všech vzorků podobné, pouze s lokálními odchylkami. U vzorků, u nichž byl pozorován klesající tvar profilu Ba/Ca byl stejný trend patrný i z profilu Sr/Ca (viz graf 17). U vzorků, u nichž nebyl zjevný klesající trend patrný z profilu Ba/Ca , nebyl tento pozorován ani v profilu Sr/Ca (viz graf 18).

U profilů Ba/Ca ale docházelo k procentuálně větším změnám mezi jednotlivými částmi skloviny, než tomu bylo u profilů Sr/Ca (viz grafy 17 a 18). Tyto výsledky odpovídají trendům pozorovaným v literatuře²⁵, kde také zjistili podobné chování poměrů Ba/Ca a Sr/Ca a změny v poměru Ba/Ca byly výraznější.



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



Graf 18 Srovnání tvaru profilů poměrů $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ a $^{88}\text{Sr}/^{43}\text{Ca}$ získaných analýzou linie vedené v sekci „A“ vzorku č. 6. Jsou opět patrné o něco výraznější procentuální změny poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$.

Na základě srovnání výsledků Ba/Ca a Sr/Ca lze říci, že oba poměry jsou pro odhad stravování v období kojení a odstavování použitelné. U poměru Ba/Ca byly nicméně pozorovány větší změny v místně (časově) závislém profilu. Na základě tohoto zjištění, jež potvrzuje výsledky některých dostupných literárních zdrojů²⁵ (podrobněji v kapitole 2.3.2.2), byl pro rekonstrukci doby kojení u dalších experimentů zvolen poměr Ba/Ca.

4.3 SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ ICP-TOF-MS A ICP-Q-MS

Pro srovnání výsledků obou použitých typů přístrojů byly linie vedené v sekcích „A“, „B“ a „C“ analyzované i pomocí ICP-Q-MS. Zjišťovány byly jak průměrné obsahy izotopů v měřených čarách, tak i profily poměru Ba/Ca v těchto liniích.

ICP-Q-MS z principu nedovoluje při kontinuální ablaci linie měření takového množství izotopů jako ICP-TOF-MS. Jejich počet byl tedy zredukován na čtyři, konkrétně ^{138}Ba , ^{88}Sr , ^{43}Ca a ^{208}Pb . Baryum, stroncium a vápník byly vybrány jakožto faktory odrážející dobu kojení. Olovo bylo zvoleno z důvodu zvýšeného obsahu tohoto prvku ve třech testovaných zubech (vzorky č. 6–8), který byl pozorován při měření na ICP-TOF-MS (viz kapitolu 4.2.1.1).

Pro porovnání výsledků obou typů přístrojů byly pro analýzu vybrány vzorky č. 1–3 a 6–8. Vzorky č. 6–8 byly vybrány z důvodu zvýšeného obsahu olova, vzorky č. 1–3 při měření na ICP-TOF-MS zvýšené množství olova neobsahovaly a slouží ke srovnání.

4.3.1 PRŮMĚRNÉ HODNOTY MĚŘENÝCH IZOTOPŮ V SEKCÍCH „A“, „B“ A „C“

Průměrné hodnoty dané sekce byly při měření na ICP-Q-MS stejně jako u ICP-TOF-MS získány zprůměrováním celkového signálu dvou vedle sebe ablatovaných linií.

Integrační čas sběru signálu pro každý měřený izotop byl nastaven na 0,1 s. Při kontinuální ablaci linie byl tedy získán určitý počet bodů. Jejich zprůměrováním byl poté získán celkový průměrný signál dané linie.

Porovnání výsledků obou přístrojů je shrnuto v tabulce 15. Je třeba brát v potaz, že se jedná pouze o rámcové porovnání. Linie analyzované za použití ICP-Q-MS byly vedeny vedle linií ablatovaných pomocí ICP-TOF-MS a jejich složení tedy není 100% totožné. Každá z linií navíc může být ovlivněna lokálními abnormalitami v zubu.

Z uvedených výsledků je patrné, že ICP-TOF-MS poskytuje vyšší, avšak řádově srovnatelné, výsledky pro ^{88}Sr a ^{138}Ba . ICP-Q-MS naproti tomu poskytuje výrazně vyšší výsledky pro izotop ^{43}Ca . Průměrná hodnota zjištěná při měření na ICP-TOF-MS je $31\,105 \pm 3\,799$ cps, na ICP-Q-MS se jedná o hodnotu $157\,897 \pm 7\,223$ cps.

Toto zvýšení signálu by mohlo být vysvětleno např. větší citlivostí systému ICP-Q-MS na interferující ion $^{27}\text{Al}^{16}\text{O}^+$, jehož molekulová hmotnost 43 je totožná s atomovou hmotností měřeného iontu vápníku.

Měření na ICP-Q-MS také potvrdilo vyšší obsah olova ve vzorcích č. 6–8.

		⁸⁸ Sr		¹³⁸ Ba		⁴³ Ca		²⁰⁸ Pb		¹³⁸ Ba/ ⁴³ Ca	
		TOF	Q	TOF	Q	TOF	Q	TOF	Q	TOF	Q
Vzorek č. 1	A průměr	103 690	41 946	27 212	12 672	38 963	161 131	1 270	44	0,702	0,078
	B průměr	65 918	35 797	9 514	5 261	36 950	149 680	1 019	40	0,261	0,035
	C průměr	56 226	27 715	7 643	5 100	30 799	162 643	849	101	0,248	0,043
	celkový průměr	75 278	35 152	14 790	7 678	35 571	157 818	1 046	62	0,403	0,052
Vzorek č. 2	A průměr	64 377	42 053	11 796	8 930	31 417	156 638	704	180	0,375	0,057
	B průměr	61 849	45 014	15 699	11 323	30 397	163 075	912	173	0,516	0,070
	C průměr	46 232	33 562	6 557	4 022	29 326	148 056	1 435	110	0,223	0,027
	celkový průměr	57 486	40 210	11 351	8 092	30 380	155 923	1 017	154	0,371	0,051
Vzorek č. 3	A průměr	53 983	37 760	6 165	4 125	23 793	170 468	501	43	0,262	0,024
	B průměr	47 056	35 123	5 269	4 045	25 910	164 470	488	47	0,204	0,024
	C průměr	45 354	38 791	3 763	3 415	24 561	162 442	530	44	0,153	0,019
	celkový průměr	48 797	37 224	5 066	3 862	24 755	165 793	506	45	0,207	0,023
Vzorek č. 6	A průměr	45 164	31 773	4 683	2 698	31 124	160 212	2 667	399	0,150	0,017
	B průměr	40 378	31 641	3 829	2 614	29 555	160 883	2 141	460	0,130	0,016
	C průměr	38 427	30 873	3 358	2 342	28 328	156 947	1 274	269	0,119	0,015
	celkový průměr	41 323	31 429	3 957	2 551	29 669	159 348	2 027	376	0,133	0,016
Vzorek č. 7	A průměr	64 010	53 515	3 426	2 699	29 395	144 332	15 032	3 078	0,116	0,019
	B průměr	135 082	55 689	6 656	2 561	35 962	146 654	17 914	2 408	0,186	0,017
	C průměr	89 611	52 289	5 492	2 900	31 791	144 437	4 320	872	0,174	0,020
	celkový průměr	96 234	53 831	5 191	2 720	32 383	145 141	12 422	2 119	0,159	0,019
Vzorek č. 8	A průměr	73 257	39 825	6 077	3 667	35 316	181 700	2 113	283	0,172	0,020
	B průměr	46 922	28 816	3 256	1 571	34 459	155 389	2 037	304	0,096	0,010
	C průměr	46 052	29 438	2 423	1 155	31 853	152 981	2 647	221	0,076	0,008
	celkový průměr	55 410	32 693	3 919	2 131	33 876	163 356	2 266	269	0,115	0,013

Tabulka 15 Shrnutí průměrných výsledků analýzy linií vedených v sekcích „A“, „B“ a „C“ získaných na obou typech použitých přístrojů (ICP-TOF-MS i ICP-Q-MS), výsledky jsou uvedeny v jednotkách cps

4.3.2 PROFILY POMĚRU Ba/Ca

U výše uvedených vzorků také byly srovnány tvary časově (místně) závislého profilu poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Byly porovnávány profily získané analýzou linie vedené v sekcích „A“ jednotlivých zubů.

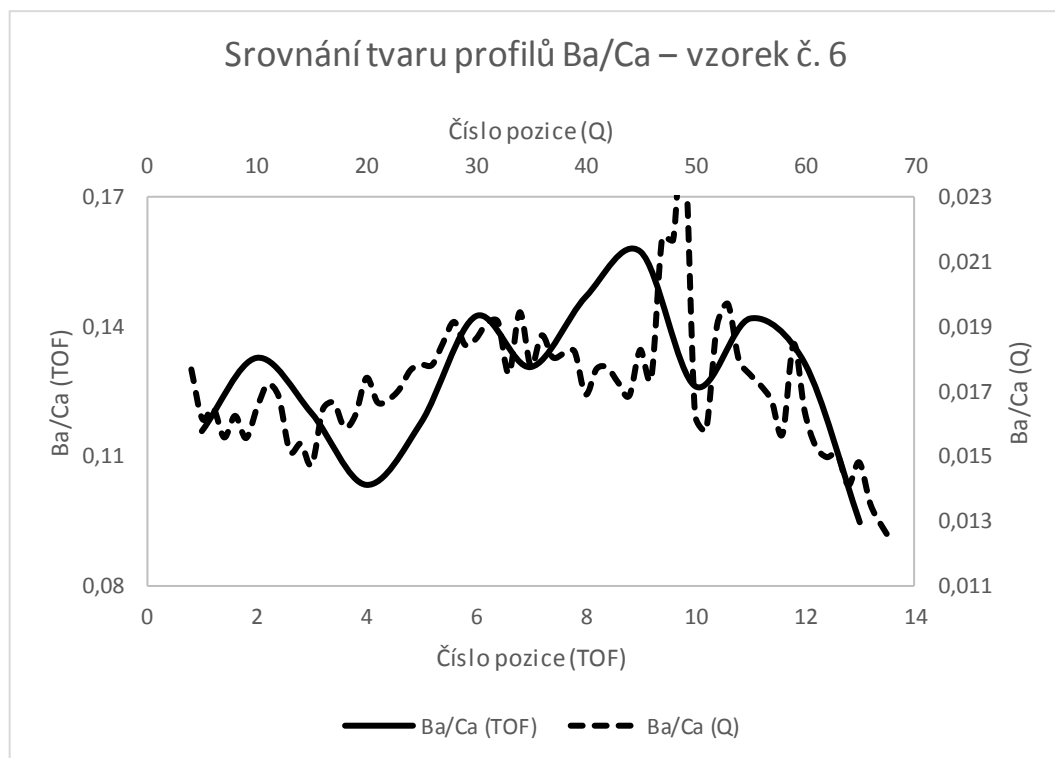
Díky kratšímu integračnímu času u ICP-Q-MS (0,1 s), než u ICP-TOF-MS (1 s), jsou jeho profily, i přes fakt, že ablatované čáry byly přibližně stejné dlouhé, tvořeny z většího počtu „bodů“ a jsou proto detailnější.

Zároveň nebyly srovnávané linie ablatovány těsně vedle sebe, ale byla mezi nimi mezera způsobená více analyzovanými čarami. Začátky a konce linií se tedy mohou mírně lišit.

Srovnání pro vybrané vzorky lze vidět v grafech 19 a 20. Profily získané analýzou na obou typech přístrojů jsou tvarově obdobné. V praxi jsou tedy použitelné oba typy přístrojů.



Graf 19 Srovnání tvaru profilů poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaných analýzou linie vedené v sekci „A“ vzorku č. 1 pomocí ICP-TOF-MS a ICP-Q-MS



Graf 20 Srovnání tvaru profilů poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaných analýzou linie vedené v sekci „A“ vzorku č. 6 pomocí ICP-TOF-MS a ICP-Q-MS

4.3.3 ZÁVĚR SROVNÁNÍ

Díky faktu, že profily získané analýzou na ICP-Q-MS jsou tvořeny větším počtem bodů a jsou tedy detailnější (viz grafy 19 a 20), tento přístroj snáze odhalí případné lokální odchylky v profilech. Ve prospěch ICP-Q-MS také hovoří fakt, že dává větší signál na ^{43}Ca , což je u něj, jako interního standardu, velmi výhodné. Další výhodou tohoto uspořádání je snadnější provedení měření, uživatelsky přívětivější software a menší citlivost na změny teploty v laboratoři.

Pro poslední, a z hlediska interpretace stravování v období kojení a odstavování nejdůležitější, typ experimentu byl tedy, na základě výše popsaných výsledků, zvolen systém ICP-Q-MS.

4.4 ICP-Q-MS

4.4.1 LINIE VEDENÉ PODÉL EDJ

Posledním typem experimentu, kterým se tato práce zabývá, je analýza linií vedených ve sklovině zubů podél jejího spojení s dentinem. Jelikož je celá linie vedená v nejhlubší části skloviny, výsledky by neměly být ovlivněny rozdílnou mineralizací zubu a s ní spojeným rozdílným obsahem prvků v různě „hlubokých“ částech skloviny.

Při experimentu tentokrát nebyl stanovován průměrný signál jednotlivých izotopů, ale pouze časově (místně) závislý profil. Na rozdíl od profilů stanovovaných z linií vedených v sekcích „A“ zubů, linie ablatované podél EDJ by měly odrážet změny v prvkovém složení zubu v průběhu celého vývoje jeho korunky a nabízet tak nejkomplexnější pohled na stravovací návyky v období kojení a odstavování.

Na základě výše popsaných výsledků byl pro analýzu zvolen systém ICP-Q-MS. Integrační čas pro každý měřený izotop byl stejně jako u předchozích měření 0,1 s. Opět byla získána série výsledků, kdy každý výsledek odráží složení daného místa skloviny.

Vzhledem k faktu, že u všech vzorků víme, o jaký typ zubu se jedná a je známa také průměrná doba vývoje korunky každého typu zubu (viz tabulky 1 a 2, str. 29), je možné přibližně „nařadit“ získaný profil (Ba/Ca) na časovou osu (ve dnech). V závislosti na velikosti korunky daného zubu, a tedy délce ablatované linie, je získán určitý počet výsledků, z nichž je poté tvořen profil Ba/Ca. Prvnímu z těchto bodů je přiřazen přibližný den v životě jedince, kdy se daný typ zubu začíná vyvíjet (např. den 0 v případě M_1), poslednímu bodu je přiřazen přibližný den ukončení vývoje korunky daného typu zubu (např. den 1095 v případě M_1). Vycházíme-li z předpokladu, že zub roste konstantní rychlostí, je poté možno jednotlivé výsledky získané ablací linie podél EDJ přibližně přiřadit ke dni vytvoření. Prostým vydělením počtu dní vývoje zubu počtem získaných výsledků pak zjistíme, kolika dnům vývoje přibližně odpovídá každý jednotlivý výsledek. Výsledkům poté přiřadíme získané údaje o době vývoje daného místa zubu (ve dnech).

Takto získané přiřazení je samozřejmě pouze orientační, vychází z průměrné doby vývoje korunky daného typu zubu a nezohledňuje individuální odlišnosti a odchylky ve vývoji. Pro přesné přiřazení by bylo třeba pracovat se zobrazovací technikou, která by

zvládla dobře rozlišit jednotlivé vrstvy ve sklovině daného zubu. Na základě doby vývoje každé z vrstev by pak bylo teoreticky možno provést přiřazení přesnější.

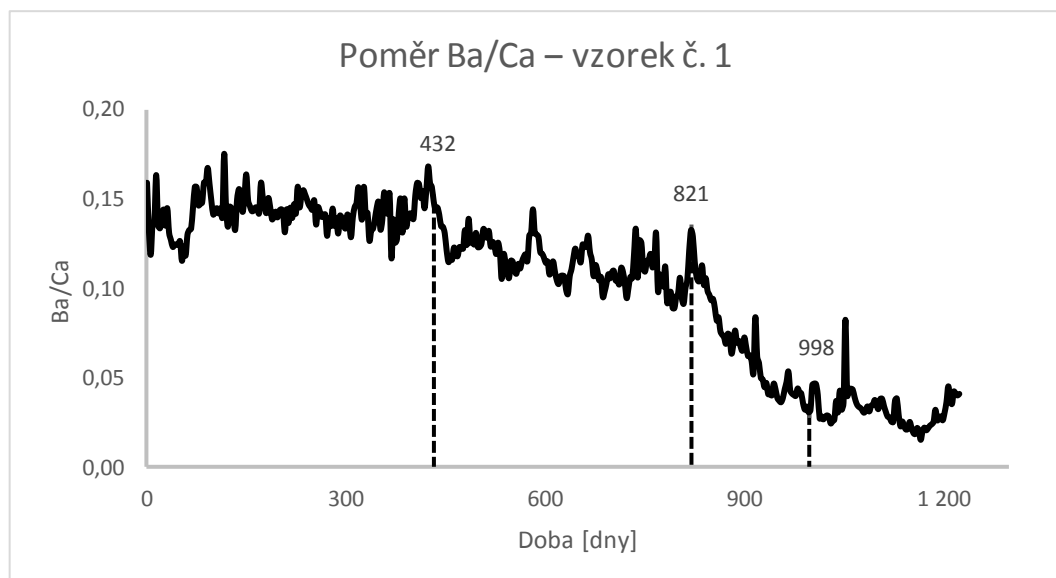
Obdobné přiřazení dnů vývoje k určitým místům zubů bylo použito i v článku Austin a spolupracovníků²⁵. Ti ale použili přesnější metodu, kdy díky použití mikroskopu mohli přesně stanovit místo v zubu (vrstvu), kterému odpovídá změřený signál. Díky znalosti rychlosti vývoje zubu a jeho vrstev poté vypočítali den, kdy se každá jednotlivá vrstva vytvořila.

4.4.1.1 VZOREK Č. 1 (M^1)

Při ablaci linie vzorku č. 1 bylo získáno celkem 462 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje horní první stálé stoličky je 3,5 roku, tj. 1278 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 2,8 dne vývoje korunky.

Graf 21 ukazuje tvar profilu poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$, který by měl odrážet změny ve stravování daného jedince. Graf lze rozdělit do čtyř částí. V první části, trvající přibližně od narození do 432. dne života jedince, je poměr Ba/Ca v podstatě konstantní a nejvyšší. To ukazuje na stravu bohatou na Ba, tedy na období kojení. V druhé části (mezi dny 432 a 821) je patrný postupný mírný pokles hodnot Ba/Ca, což by mohlo být vysvětleno postupným nahrazováním mateřského mléka jinou stravou. Klesající trend pokračuje, tentokrát ale strměji, ve třetí části grafu (mezi dny 821 a 998). To ukazuje na nahrazení výraznější části mateřského mléka běžnou stravou a úplné odstavení potomka. Hodnoty Ba/Ca v poslední části grafu (dny 998 a další) jsou opět konstantní a zároveň nízké. To ukazuje na příjem běžné stravy.

Mírné zvýšení na samém konci grafu může být způsobeno jednak určitou variací ve stravě nebo také faktem, že konec ablatované linie se již v důsledku tvaru skloviny blíží k jejímu povrchu, který je nejnáchylnější ke kontaminaci a diagenезi a také jeho prvkové složení je odlišné od zbytku skloviny (viz kapitolu 2.5.2).

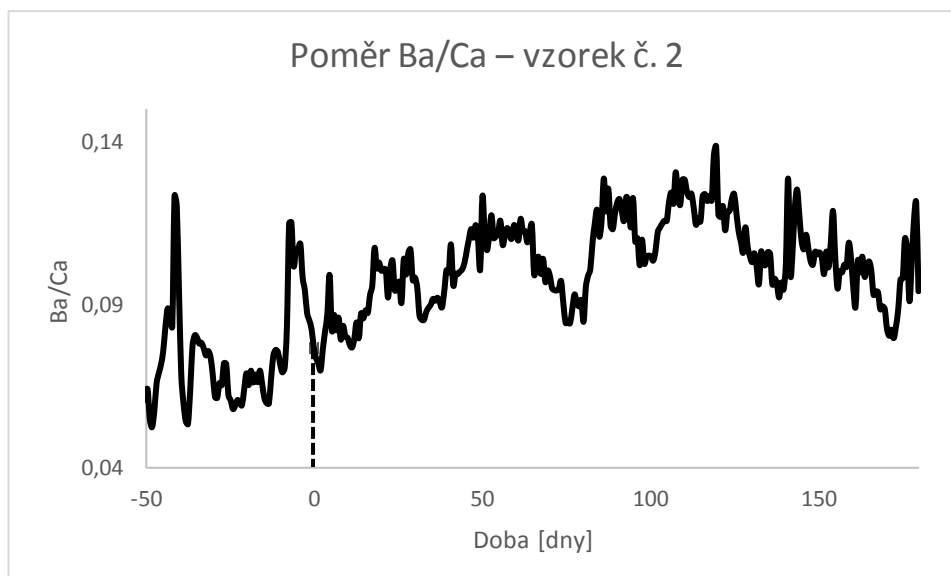


Graf 21 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 1); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

Doba počátku a konce odstavení je na současnou společnost velmi pozdní. Nicméně vzorek č. 1 je datován do období eneolitu a ve starších společnostech bylo pozdější odstavování poměrně běžné. Tento trend přetrvává v některých domorodých společnostech až do současnosti (podrobněji v kapitole 2.3.1.1).

4.4.1.2 VZOREK Č. 2 (m^1)

Při ablaci linie vzorku č. 2 bylo získáno celkem 345 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje horní první dočasné stoličky je 11 měsíců, tedy cca 330 dní. Nicméně po přiřazení podle systému použitého u ostatních vzorků si v grafu neodpovídal počátek nárůstu poměru Ba/Ca s narozením (tedy dnem 0). Bylo proto nutno den 0 přiřadit počátku nárůstu Ba/Ca, tedy počátku kojení. S ohledem na to byl opraven i počátek ablatované linie, kterému byl vypočten a přiřazen den -50. Počátek ablatované linie totiž nemusel 100% korespondovat s počátkem vývoje zubu. Nalezení úplného vrcholu zubu, a tedy ideálního místa počátku ablatované linie, je bez vhodných zobrazovacích zařízení (mikroskopů) obtížné. Také je třeba brát v potaz individuální odlišnosti počátku vývoje zubu u daných jedinců.



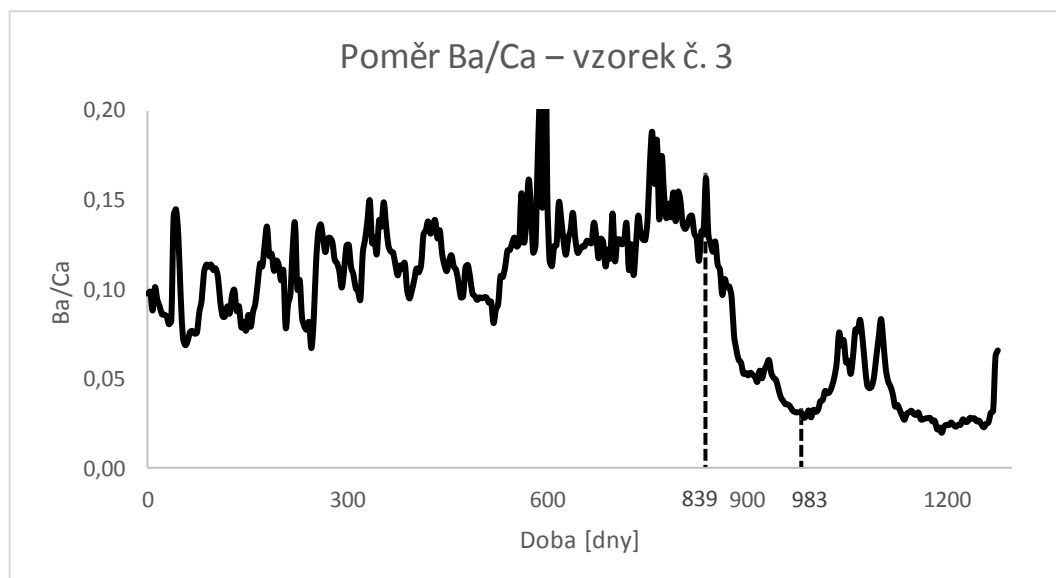
Graf 22 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 2); vertikální přerušovaná čára odděluje předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

Graf 22 ukazuje profil Ba/Ca odrážející změny ve stravování. Na grafu je nejprve vidět, pokud nebereme v potaz lokální maxima, která mohla být způsobena nehomogenitami v zubu, relativně konstantní hodnota poměru. Poté se začíná postupně zvyšovat, což lze nejpravděpodobněji vysvětlit narozením a začátkem kojení (jedná se o mléčný zub, jehož vývoj začíná již v děloze matky). Stoupající trend pokračuje v druhé části zubu. Během celého období jeho vývoje byl pravděpodobně jedinec kojen.

Mírný pokles na konci profilu může naznačovat počátek odstavování, ale také pouze určitou variabilitu patrnou v celé délce profilu. Druhé vysvětlení je, z hlediska kontextu, přijatelnější, neboť se jedná o zub datovaný, stejně jako vzorek č. 1, do eneolitu a předpokládá se u něj proto také delší doba kojení.

4.4.1.3 VZOREK Č. 3 (M^1)

Při ablaci linie vzorku č. 3 bylo získáno celkem 365 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje horní první stálé stoličky je 3,5 roku, tj. 1278 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 3,5 dne vývoje korunky.



Graf 23 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 3); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

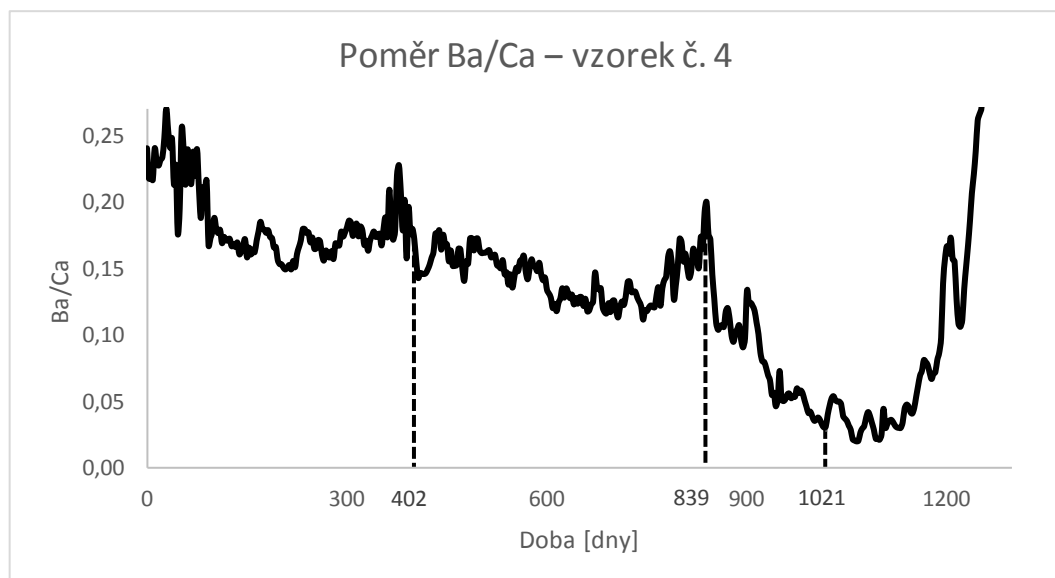
Z profilu Ba/Ca vzorku č. 3 jsou patrná tři období vývoje dítěte. První část zubu (mezi dny 0 a 839) ukazuje na období výlučného kojení daného jedince. Klesající trend mezi dny 839 a 983 lze nejpravděpodobněji vysvětlit postupným odstavováním dítěte. K definitivnímu odstavení pak pravděpodobně došlo okolo 983. dne života potomka.

Lokální maxima patrná na profilu pravděpodobně souvisejí s nehomogenitou zubu spíše než se změnou stravovacích návyků. Mírný nárůst poměru Ba/Ca na samém konci profilu lze, podobně jako u vzorku č. 1, vysvětlit přiblížením abaltované linie k povrchu skloviny.

Profil je obdobný jako u vzorku č. 1, datovaného taktéž do eneolitu. U něj je prudší pokles v poměru Ba/Ca zaznamenán mezi dny 821 a 998, což je velmi podobné jako u vzorku č. 3 (tedy období mezi dny 839 a 983). Na rozdíl od vzorku č. 1, ale není patrný postupný velmi mírný pokles v hodnotě Ba/Ca ukazující na nahrazení malé části mateřského mléka jinou stravou.

4.4.1.4 VZOREK Č. 4 (M^1)

Při ablaci linie vzorku č. 4 bylo získáno celkem 443 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje horní první stálé stoličky je 3,5 roku, tj. 1278 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 2,9 dne vývoje korunky.



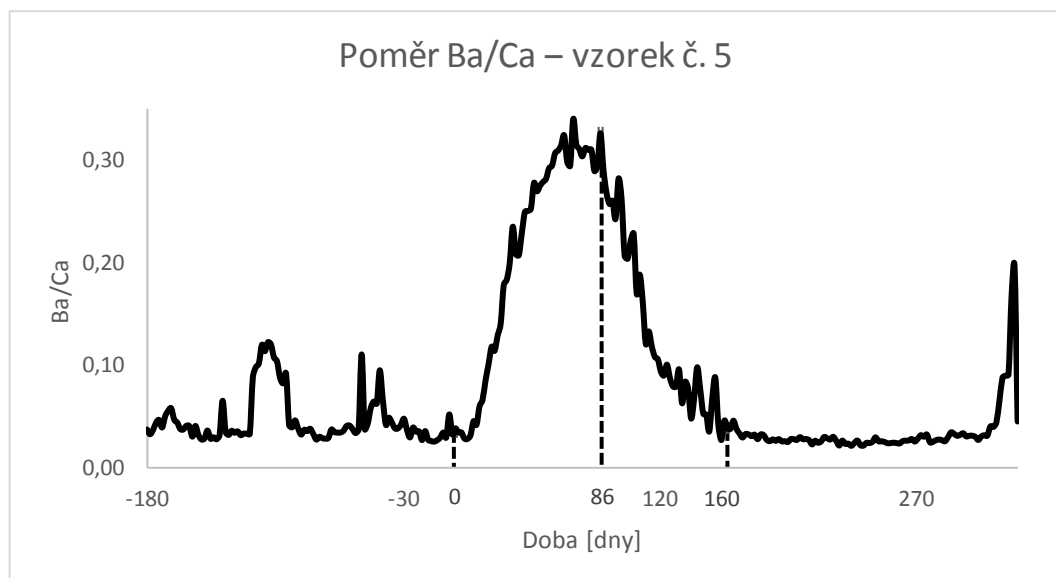
Graf 24 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 4); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

Na grafu 24 jsou patrné čtyři úseky, oddělené dny 402, 839 a 1021. Graf je svou strukturou velmi podobný grafu 21, zachycujícímu tentýž profil vzorku č. 1 (taktéž čtyři části oddělené dny 432, 821 a 998).

První úsek patrně odráží období výlučného kojení, s tím, že zvýšené hodnoty na samém počátku jsou nejspíše způsobeny nehomogenitou zubu (zvýšení bylo patrné i na samotném obsahu interního standardu ^{43}Ca). Druhý úsek, s mírně klesajícími hodnotami poměru Ba/Ca, lze opět vysvětlit nahrazením malé části mateřského mléka jinou stravou. Ve třetím úseku pravděpodobně dochází ke zvětšování podílu nemléčné stravy. K definitivnímu odstavení pak dochází nejspíše okolo dne 1021, za kterým jsou již hodnoty poměru Ba/Ca konstantní. Výrazné zvýšení na konci grafu (dokonce přesahující zvolenou škálu osy y) je podobně jako u vzorků č. 1 a 3 nejspíše způsobeno zásahem ablatované linie do povrchu skloviny, u něhož se předpokládá jiné zastoupení prvků.

4.4.1.5 VZOREK Č. 5 (m_2)

Při ablaci linie vzorku č. 5 bylo získáno celkem 289 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje dolní druhé dočasné stoličky je 17 měsíců, tj. přibližně 510 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 2,9 dne vývoje korunky.



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

Profil patrný v grafu 25 se poměrně zásadně liší od profilů ostatních testovaných zubů. Je na něm patrné velice výrazné maximum mezi dny 0 a 160. Vzhledem k faktu, že se toto maximum objevuje v období vývoje zubu následujícím pravděpodobně ihned po porodu, může být způsobeno začátkem kojení. Období kojení by mělo vykazovat vyšší hodnoty než období prenatalní, což by v tomto případě platilo. Poměrně velký skok v hodnotách poměru Ba/Ca oproti prenatalnímu období, by se dal také vysvětlit, neboť poměr Ba/Ca a jeho změny v jednotlivých úsecích vývoje zubu jsou dosti individuální záležitostí.

Období výlučného kojení by odpovídalo úseku ohraničenému dny 0 a 86. Následující období odstavování by poté bylo ukončeno okolo 160. dne života dítěte. Po tomto dni je již poměr konstantní (přibližně na úrovni prenatalních hodnot, což dobře odpovídá teorii). Zvýšení na konci by se dalo opět vysvětlit zásahem ablatované linie do povrchu skloviny.

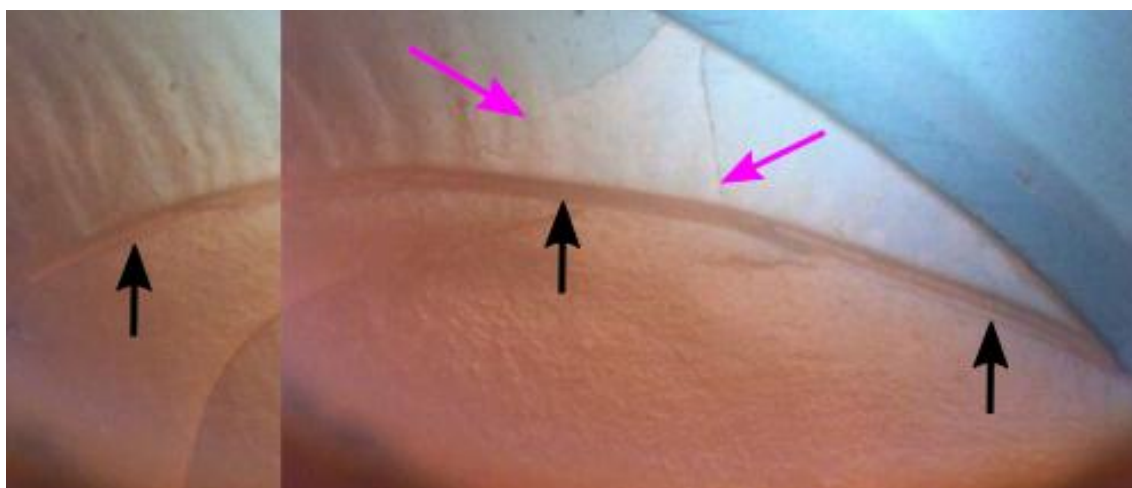
Pokud maximum skutečně odráží změny ve stravování, jedinec byl na svou dobu (zub je datován do mladší doby bronzové) kojen velmi krátce. Takováto délka kojení by byla spíše očekávána u současných vzorků. Nicméně, i takto krátká doba kojení je možná. Mohlo se jednat o obecnou zvyklost dané společnosti či rodiny, matka dítěte mohla onemocnět, případně zemřít, ...

Druhým možným vysvětlením je lokální nehomogenita v zubu. Pro tuto teorii mluví fakt, že ve sklovině testovaného zubu byly okem viditelné dvě praskliny, které svou pozicí přibližně odpovídají hranicím maxima (obrázek 24). Proti této teorii naopak hovoří

fakt, že zvýšení bylo patrné pouze pro tři z měřených izotopů, ^{138}Ba , ^{88}Sr a ^{43}Ca , které mají všechny tři souvislost se stravováním. Trend naopak nebyl patrný u čtvrtého testovaného izotopu, ^{208}Pb , který se změnami v příjmu mateřského mléka obecně přímo nesouvisí.

V případě, že by se jednalo o pouhou anomálii ve struktuře zubu, nebyly by na něm patrné žádné náznaky kojení, neboť hodnoty poměru Ba/Ca jsou jak před, tak i za zvýšením v podstatě totožné. Toto neodpovídá teorii, která předpokládá vyšší hodnoty poměru spojené s nástupem mateřského mléka do stravování jedince. Hodnoty za anomálií, by tedy měly být teoreticky vyšší než před ní, v prenatálním období.

Bez znalosti bližších informací o jedinci a jeho životě nebo možnosti analýzy více jeho zubů je obtížné rozhodnout, která z předložených teorií je pravdivá nebo, lépe řečeno, jestli se vůbec některá z nich blíží reálné příčině pozorovaného maxima.

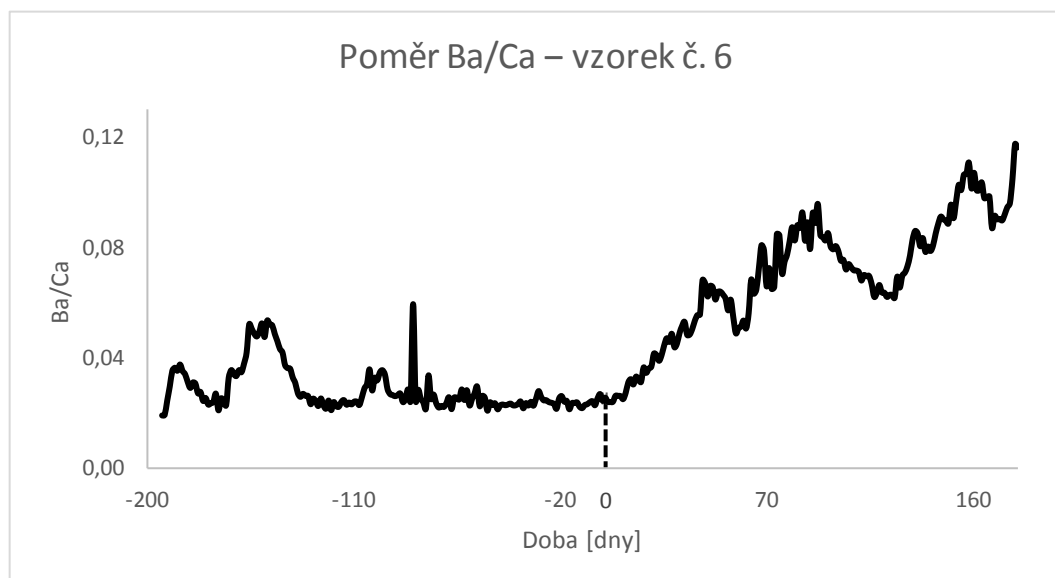


Obrázek 24 Fotografie části vzorku č. 5 pořízená CCD kamerou laserové ablace. Růžovými šipkami jsou označeny praskliny ve sklovině, černé šipky ukazují ablatovanou linii (tmavá čára na spojení skloviny (šedavá část zubu) a dentinu (běžová část)).

4.4.1.6 VZOREK Č. 6 (m^1)

Při ablaci linie vzorku č. 6 bylo získáno celkem 335 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje horní první dočasné stoličky je 11 měsíců, tj. přibližně 330 dní. Podobně jako u vzorku č. 2, bylo třeba mírně upravit nulový bod s ohledem na počátek nárůstu poměru Ba/Ca. Poslednímu z naměřených výsledků byl, dle teorie, přiřazen den č. 180, prvnímu potom na základě výpočtu hodnota -193 dní

(teoretická hodnota pro daný typ zubu je -150 dní, ale jedná se opravdu jen o průměrné hodnoty počátku vývoje zubu).



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

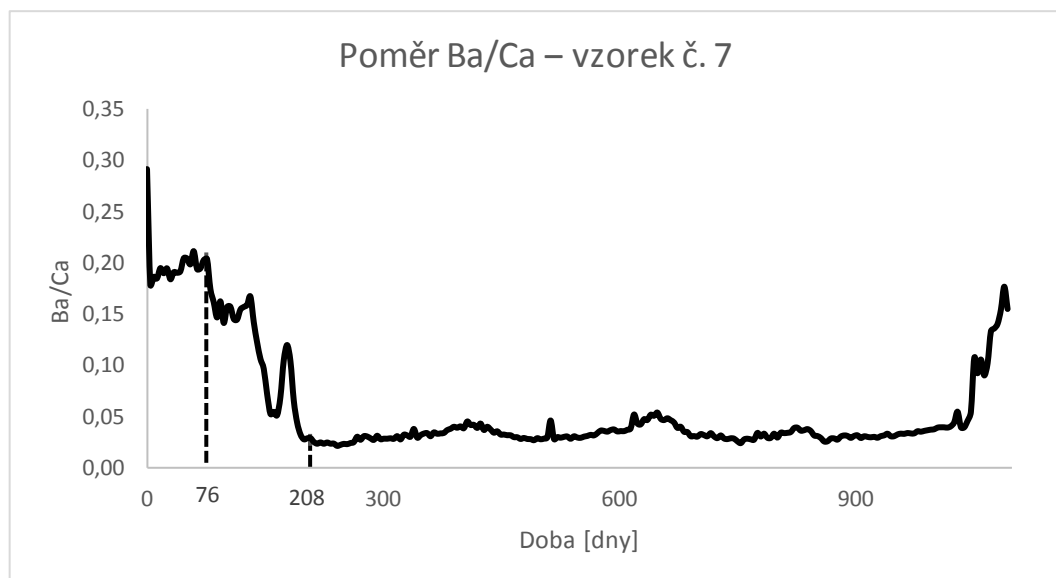
Na grafu 26 je vidět rozdělení profilu na dvě části, prenatální končící dnem 0 a následnou část pravděpodobného výlučného kojení jedince, které nejspíše pokračovalo i po ukončení vývoje korunky zubu (180. den života).

Pokračování výlučného kojení po dovršení 6. měsíce není nic neobvyklého, zvláště vezmeme-li v potaz, že se jedná o zub datovaný do středověku, kdy byla doba odstavování ještě posunuta k pozdějšímu věku oproti dnešním trendům.

Určitá maxima v prenatální části jsou pravděpodobně způsobena lokálními odchylkami ve složení zubu a se stravovacími návyky nejspíš nesouvisí.

4.4.1.7 VZOREK Č. 7 (M_1)

Při ablaci linie vzorku č. 7 bylo získáno celkem 259 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje dolní první stálé stoličky jsou 3 roky, tj. 1095 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 4,2 dne vývoje korunky.



Graf 27 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 7); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

Graf 27 ukazuje profil Ba/Ca získaný analýzou vzorku č. 7. Graf lze rozdělit na tři úseky. Na samém počátku profilu jsou patrné vyšší hodnoty poměru, což by odpovídalo období výlučného kojení trvající po poměrně krátkou dobu, přibližně 2,5 měsíce. Následující pokles v poměru Ba/Ca by se dal vysvětlit postupným odstavováním dítěte s definitivním odstavením okolo 208. dne života. Ve třetí části grafu (po dni 208) jsou již hodnoty poměru Ba/Ca víceméně konstantní, objevují se pouze zvýšené hodnoty na konci, kdy ablatovaná linie zasahuje k povrchu skloviny.

Vysvětlení změn v poměru Ba/Ca pomocí změn ve stravovacím návyku by ukazovalo na poměrně krátkou dobu kojení i odstavování. Takováto krátká doba příjmu mateřského mléka je nicméně možná, i když obdobné trendy lze předpokládat spíše u současných vzorků než u testovaného zubu datovaného do středověku.

Druhou možností jak vysvětlit zvýšené hodnoty poměru na počátku grafu je kontaminace zubu, případně abnormalita. Takovéto vysvětlení podporuje i fakt, že v tomto úseku zubu byly naměřeny zvýšené hodnoty všech čtyř zkoumaných izotopů tj. ^{138}Ba , ^{88}Sr , ^{43}Ca i ^{208}Pb . Naměřené hodnoty olova (v cps) dokonce překračují hodnoty zjištěné pro baryum, což je v rámci testovaných zubů ojedinělý trend. Situace se tak liší od případu vzorku č. 5, kde poměr Ba/Ca byl zvýšen také pouze v krátkém období vývoje zubu, ale kdy v tomto úseku nedošlo ke zvýšení obsahu olova.

Teorii kontaminace mohou podpořit i skutečnosti, že areál hřbitova, ze kterého zub pochází, byl několikrát vypálen a zasažen záplavami (viz kapitolu 3.4.2.7), což se mohlo dotknout i tamních uložených ostatků.

Proti teorii kontaminace naopak hovoří fakt, že za dnem 208 již nedochází k dalšímu poklesu hodnot, což by prokázalo odstavení dítěte někdy v pozdějším období. Konstantní nízké hodnoty ukazují na nemléčnou stravu, není ale pravděpodobné, že by dítě nebylo během života vůbec kojeno.

Proto se naskýtá ještě třetí možné vysvětlení. K odstavení dítěte mohlo dojít velice brzy (mezi dny 0 a 208), z grafu toto ale není patrné, neboť případný klesající trend v období odstavování může být překryt signálem způsobeným kontaminací.

Potvrzení některé z teorií je ale bez znalosti bližších údajů o jedinci nebo analýze některého dalšího jeho zubu prakticky nemožné.

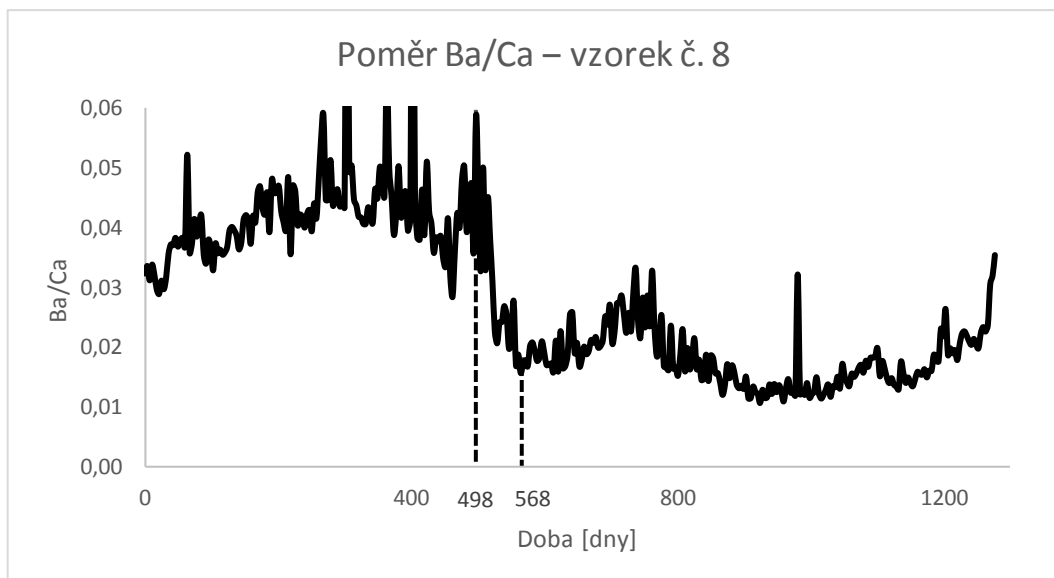
Zvýšený obsah olova v počátečních fázích vývoje zubu ale také, mimo jiné, potvrzuje předchozí experimenty prováděné v sekcích „A“, „B“ a „C“, které ukázaly nejvyšší obsah tohoto prvku právě ve vzorku č. 7.

4.4.1.8 VZOREK Č. 8 (M^1)

Při ablaci linie vzorku č. 8 bylo získáno celkem 363 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje horní první stálé stoličky je 3,5 roku, tj. 1278 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 3,5 dne vývoje korunky.

Graf 28 lze rozdělit na tři části. První z nich, ohraničená dny 0 a 498, ukazuje na výlučné kojení dítěte. Prudký krátký pokles poměru Ba/Ca mezi dny 498 a 568 by mohl být vysvětlen razantním odstavením dítěte, které, ve srovnání s ostatními testovanými vzorky, proběhlo během krátkého časového období necelých 2,5 měsíců. Z hodnot poměru Ba/Ca následujících po dni 568 již nelze vyvozovat příliš závěrů. V podstatě ihned po dni 568 dochází opět k mírnému navýšení sledovaného poměru, nicméně toto není na vyvozování závěrů souvisejících se stravováním dostatečné a je spíše způsobeno určitou odchylkou ve složení zubu. Je také nepravděpodobné, že by dítě po tak razantním odstavení začalo znovu požívat mateřské mléko, třeba i v menší míře.

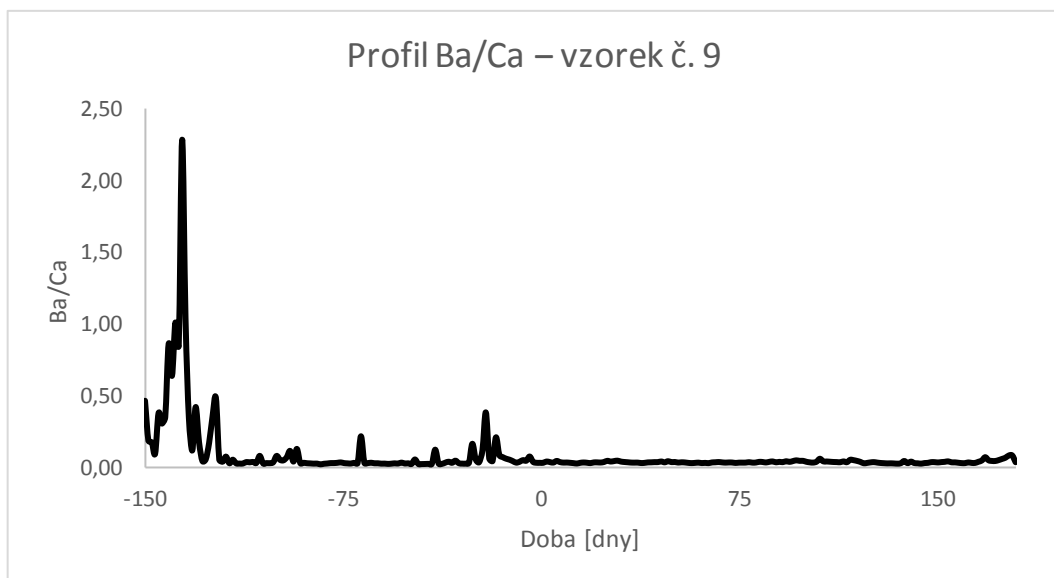
Nárůst poměru Ba/Ca na konci grafu opět pravděpodobně souvisí s rozdílným složením povrchu skloviny.



Graf 28 Profil $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaný analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 8); vertikální přerušované čáry oddělují předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

4.4.1.9 VZOREK Č. 9 (m_1)

Při ablaci linie vzorku č. 9 bylo získáno celkem 259 výsledků tvořících výsledný profil poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$. Přibližná doba vývoje dolní první dočasné stoličky je 11 měsíců, tedy asi 330 dní. Každý bod (výsledek) tedy zahrnuje přibližně 3,5 dne vývoje korunky.



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

Jak je patrné z grafu 29, profil získaný analýzou vzorku č. 9 není jednoduchý a v předpokládaném prenatálním období vývoje zubu je na něm patrna celá řada „píků“, které s největší pravděpodobností nesouvisí s výživou. Vzhledem k faktu, že se jedná o současný vzorek, který nebyl uložen v zemi, je kontaminace z půdy vyloučená.

V místech, kde byly naměřeny zvýšené hodnoty izotopu ^{138}Ba , respektive jeho poměru k ^{43}Ca , byly také, ve většině případů, pozorovány i značně zvýšené hodnoty ^{208}Pb . Hodnoty signálu ^{43}Ca a ^{88}Sr se ale v těchto místech neodlišovaly od normálu. Toto je trend, který nebyl pozorován u žádného jiného testovaného vzorku.

Možným a pravděpodobným vysvětlením prvního a zároveň největšího z těchto maxim je ale určitý typ kontaminace. Ablatovaná linie je na svém počátku, tedy přibližně v místě prvního maxima, vedena částečně skrze prasklinu v zubu, která je patrná pouhým okem (viz obrázek 25). Praskliny přibližně v místech dalších maxim nebyly okem pozorovány, nicméně není vyloučeno, že v těchto pozicích určité nepatrné mikropraskliny existují.

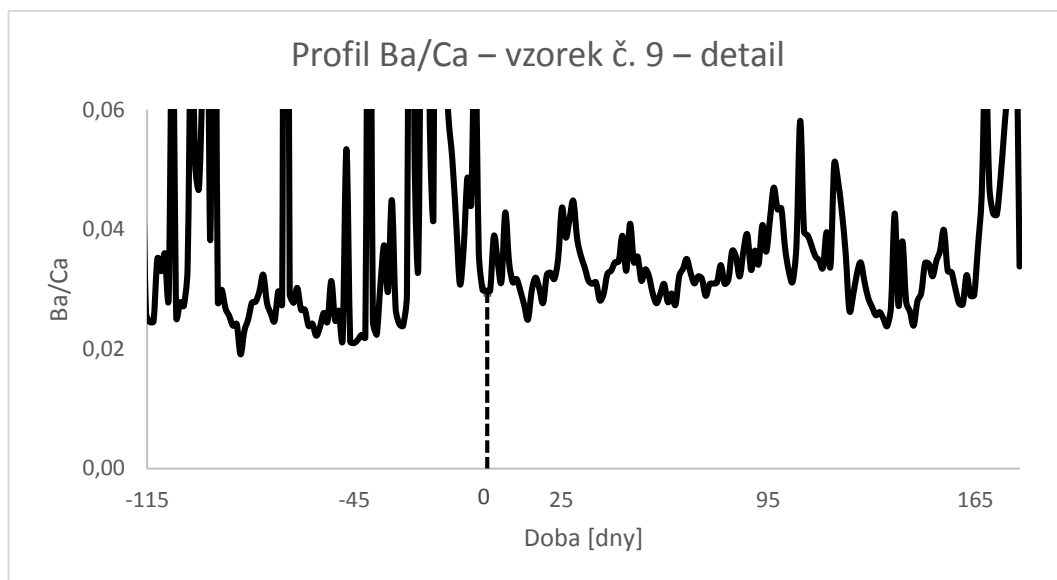


Obrázek 25 Fotografie části vzorku č. 9 pořízená CCD kamerou laserové ablace. Růžovou šipkou je označena prasklina ve sklovině zasahující až do ablatované linie označené černými šipkami. Bílá šipka naznačuje přiblížení ablatované linie k povrchu skloviny.

Odhlédneme-li ale od pozorovaných maxim, je vidět (graf 30), že „nekontaminované“ hodnoty v předpokládaném prenatálním období jsou o něco nižší, než po narození (den 0) a nástupu mateřského mléka, respektive umělé dětské výživy, která je ale na baryum dokonce ještě bohatší než mateřské mléko²⁵. Zvýšení v hodnotách je pouze nepatrné,

avšak dobře koresponduje s předpokládaným místem v zubu spojeným s narozením jedince.

Zvýšení hodnot na konci ablatované linie opět pravděpodobně souvisí se zásahem do povrchu skloviny, což je pro ilustraci patrné na obrázku 25.



Graf 30 Detail profilu $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ získaného analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ (vzorek č. 9); vertikální přerušovaná čára odděluje předpokládaná období, ve kterých došlo ke změnám stravovacích návyků

Vzhledem k faktu, že se jedná o současný zub, známe i přibližnou historii stravování po narození (první tři dny na dětské umělé výživě, poté tři týdny kojení a dokrmování, poté už opět pouze umělá výživa – viz kapitolu 3.4.2.9). Takovéto nuance nicméně nejsou z grafu patrné a jejich potvrzení není ze získaných výsledků možné.

4.4.2 SHRUTÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ

Všechny výsledky, získané analýzou linie vedené ve sklovině podél EDJ, jsou shrnuty v tabulce 16. Výsledky naznačují, že jedinci, jimž patřily testované zuby, byli pravděpodobně odstavováni později, než odpovídá současným trendům.

U několika zubů také pravděpodobně hraje značnou roli kontaminace a pro spolehlivější výsledky by bylo třeba testovat více zubů daného člověka. Více vzorků od jediného subjektu ale bohužel nebylo k dispozici.

Vzorek č.	Typ zubu	Datování	Lokalita	Počátek odstavování [den]	Definitivní odstavení [den]
1	M ¹ dx	eneolit	Slavonín 1	432 (821)	998
2	m ¹ sin	eneolit	Slavonín 1	–	–
3	M ¹ dx	eneolit	Nemilany 3	839	983
4	M ¹ sin	EBA	Chrást'any	402 (839)	1021
5*	m ₂ sin	EBA	Přemýšlení	86	160
6	m ¹ sin	středověk	U Zvonu	–	–
7*	M ₁ sin	středověk	U Zvonu	76	208
8	M ¹ dx	novověk	Karlín	498	568
9*	m ₁ dx	současnost	–	–	–

Tabulka 16 Shrnutí získaných výsledků. U vzorků označených hvězdičkou může svou roli hrát kontaminace, kterou je třeba zohlednit. Čísla v závorkách (u vzorků č. 1 a 4) udávají den, kdy pravděpodobně začalo docházet k razantnějšímu odstavování jedince. EBA = straší doba bronzová (z angl. „early bronze age“).

5. ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala analýzou vzorků lidských zubů pocházejících z různých historických období, od eneolitu až po současnost. Testovány byly jak zuby stálé, tak dočasné.

Analýza probíhala s využitím ICP-MS s laserovou ablací. Díky využití laserové ablace došlo k minimálnímu porušení vzorků. U zubů zůstala zachována vnitřní struktura a bylo tak možné zkoumat obsahy sledovaných izotopů (především ^{138}Ba , ^{88}Sr , ^{43}Ca a ^{208}Pb) v různých částech a vrstvách zubu. Zároveň bylo možno sledovat i změny prvkového složení zubu při ablaci kontinuální linie.

Byly použity dva typy ICP-MS, s kvadrupólovým (Q) a hmotnostním (TOF) analyzátozem. Výsledky těchto přístrojů byly srovnány a ke stěžejním experimentům byl nakonec vybrán ICP-Q-MS.

Byly také optimalizovány podmínky nastavení laserové ablace. Jako optimální se ukázal výkon laseru 75 %, což odpovídá laserovému toku $7,94 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, pulsní frekvence 20 Hz, průměr laserového paprsku $30 \text{ }\mu\text{m}$, rychlost jeho posunu $30 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, celkový průtok nosného plynu (He) $0,65 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ a poměr jeho průtoků (MFC1 a MFC2) $0,30 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1} : 0,35 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$.

U vzorků byla sledována především hodnota poměru $^{138}\text{Ba}/^{43}\text{Ca}$ a její změny v rozdílných místech zubu. Hodnota tohoto poměru dává určité informace o stravovacích návycích daného jedince během dětství. Na základě její velikosti a změn bylo poté usuzováno na období v životě jedince, kdy byl tento výlučně kojen, odstavován a kdy byl definitivně odstaven a přešel na zcela běžnou stravu.

6. LITERATURA

1. Gray A. L.: Proc. Soc. Anal. Chem. 11, 182 (1974).
2. Houk R. S., Fassel V. A., Flesch G. D., Svec H. J., Gray A. L., Taylor C. E.: Anal. Chem. 52, 2283 (1980).
3. Potter, D.: J. Anal. At. Spectrom. 23, 690 (2008).
4. Thomas, R.: *Practical Guide to ICP-MS*. Marcel Dekker Inc, New York 2004.
5. Dean, J. R.: *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. Wiley, Chichester 2005.
6. Vanhaecke F., Degryse P. (Eds): *Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS*. Wiley-VCH, Weinheim 2012.
7. Todolí J. L., Mermet J. M.: Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 61, 239 (2006).
8. Botto R. I., Zhu J. J.: J. Anal. At. Spectrom. 9, 905 (1994).
9. Zoorob G. K., McKiernan J. W., Caruso J. A.: Mikrochim. Acta 128, 145 (1998).
10. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch, S. R.: *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Brooks/Cole, Belmont 2007.
11. Nelms S. (Ed): *ICP Mass Spectrometry Handbook*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
12. Günther D., Jackson S. E., Longerich, H. P.: Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 54, 381 (1999).
13. Becker J. S.: *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Wiley, Chichester 2007.
14. Russo R.: Talanta 57, 425 (2002).
15. Margetic V., Pakulev A., Stockhaus A., Bolshov M., Niemax K., Hergenröder R.: Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 55, 1771 (2000).
16. Durrant S.: J. Anal. At. Spectrom. 15, 1385 (2000).
17. Vrbová M., Jelínková H., Gavrilov P.: *Úvod do laserové techniky*. Vydavatelství ČVUT, Praha 1998.
18. Gross J. H.: *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer, Berlín 2011.

19. de Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Wiley, Chichester 2007.
20. Christian G. D., Dasgupta P. K., Schug K. A.: *Analytical Chemistry*. Wiley, Hoboken 2014.
21. Katzenberg A., Saunders S.: *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. Wiley, Hoboken 2008.
22. Dokládál M.: *Anatomie zubů a chrupu*. Masarykova univerzita, Brno 1994.
23. Weber T.: *Memorix zubního lékařství*. Grada, Praha 2012.
24. Kohn M. J., Schoeninger M. J., Barker, W. W.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 2737 (1999).
25. Austin C., Smith T. M., Bradman A., Hinde K., Joannes-Boyau R., Bishop D., Hare D. J., Doble P., Eskenazi B., Arora, M.: *Nature* 498, 216 (2013).
26. American Academy of Pediatric Dentistry: *Pediatr. Dent.* 2014, 371.
27. Shaw J. H., Sweeney, E. A. v knize: *Modern Nutrition in Health Disease: Dietotherapy* (Goodhart R. S., Shils M. E., Wohl, M. G., ed.) Lea, Philadelphia 1973.
28. Humphrey L. T.: *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 453 (2010).
29. Tsutaya T., Yoneda M.: *Am. J. Phys. Anthropol.* 156, 2 (2015).
30. Sellen D. W.: *J. Nutr.* 131, 2707 (2001).
31. Community Paediatrics Committee 2003-2004: *Paediatr. Child Health* 9, 249 (2004).
32. Lee-Thorp J. A.: *Archaeometry* 50, 925 (2008).
33. Howcroft R., Eriksson G., Lidén K.: *Am. J. Phys. Anthropol.* 149, 217 (2012).
34. Dolphin A. E., Goodman A. H., Amarasiriwardena D. D.: *Am. J. Phys. Anthropol.* 128, 878 (2005).
35. Mays S.: *J. Archaeol. Sci.* 30, 731 (2003).
36. Humphrey L. T., Dean M. C., Jeffries T. E., Penn M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6834 (2008).
37. Reynard L. M., Henderson G. M., Hedges R. E. M.: *J. Archaeol. Sci.* 38, 657 (2011).

38. Vašinová-Galiová M., Nývltová-Fišáková M., Kynický J., Prokeš L., Neff H., Mason A. Z., Gadas P., Košler J., Kanický V.: *Talanta* 105, 235 (2013).
39. Reitznerová E., Amarasiriwardena D., Kopčáková M., Barnes R. M.: *Fresenius. J. Anal. Chem.* 367, 748 (2000).
40. Lee K. M., Appleton J., Cooke M., Keenan F., Sawicka-Kapusta K.: *Anal. Chim. Acta* 395, 179 (1999).
41. Goffe Z.: *Archaeological Chemistry*. Wiley, Hoboken 2007.
42. Price T. D., Burton J. H., Bentley R. A.: *Archaeometry* 44, 117 (2002).
43. Montgomery J., Evans J. A., Cooper R. E.: *Appl. Geochemistry* 22, 1502 (2007).
44. Beard B., Johnson C.: *J. Forensic Sci.* 45, 1049 (2000).
45. Müller W., Fricke H., Halliday A. N., McCulloch M. T., Wartho J. A.: *Science* 302, 862 (2003).
46. Eda M., Kodama Y., Ishimaru E., Yoneda M.: *Int. J. Osteoarchaeol.* 24, 265 (2014).
47. Montgomery J., Evans J., Chenery S., Pashley V., Killgrove K.: *J. Rom. Archaeol. Suppl. Ser.* 2010, 199.
48. <http://www.ac-olomouc.cz/archeologie/archiv-vyzkumu/2008-chrastany.aspx>, staženo 2. března 2015.
49. Pankowská A. v knize: *Ročenka Archeologického centra v Olomouci 2010* (Bém M., Peška J., ed.), Archeologické centrum Olomouc, Olomouc 2011.
50. Paulus M.: *Chrástany Záhumení. Nálezová zpráva (282/11)*. Archeologické centrum Olomouc, Olomouc 2010.
51. <http://www.muzeumompv.cz/archeologicke-vyzkumy-muzea/>, staženo 3. března 2015.
52. Šneberger J.: *Diplomová práce*. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň 2013.
53. Galeta P., Šneberger J., Friedl L., Pankowská A., Jurman K., Kubátová I.: *Katalog kosterního souboru ze hřbitova U Zvonu, Plzeň*. Nepublikovaná archeologická zpráva, 2014.
54. <http://archeopro.archeo4u.cz/archeologickevyzkumy.html>, staženo 3. března 2015.
55. Hare D., Austin C., Doble P., Arora M.: *J. Dent.* 39, 397 (2011).

56. Kang D., Amarasiriwardena D., Goodman A. H.: *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1608 (2004).
57. <http://www.nechcikazy.cz/z-ceho-se-sklada-zub>, staženo 5. března 2015.
58. Bohunská J.: *Diplomová práce*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2013.