

Uporaba FTIR spektroskopije za analizo kosti iz arheoloških okolij

Application of FTIR spectroscopy for analysing bones from archaeological contexts

© Tamara Leskovar
tamaraleskovar@gmail.com

Izvelek: FTIR-ATR spektroskopija omogoča hitre in natančne kemične analize vzorcev. Zaradi možnosti izvedbe na majhnih vzorcih in izogitve uničenju le-teh je izredno uporabna kot del (osteo)arheoloških analiz. Nudi namreč vpogled v kemično sestavo vzorca, ki lahko predstavlja izhodišča za razumevanje stanja ohranjenosti vzorca ter vplivov okolja na zaznane spremembe. V nadaljevanju so predstavljene osnove FTIR spektroskopije, kemične sestave kosti in njenih sprememb po smrti organizma ter možnosti obdelave in interpretacije pridobljenih podatkov.

Ključne besede: FTIR-ATR spektroskopija, kemična sestava kosti, tafonomija, kolagen, mineral, analiza FTIR spektra

Abstract: FTIR-ATR spectroscopy enables fast and accurate chemical analyses of different materials. Small sample requirements and a potentially non-destructive nature render the technique a highly useful tool in (osteo)archaeological analyses. Offering an insight into the chemical composition, it can be employed in the study of the state of sample preservation or the influence of environment on the sample's chemical structure. The contribution brings a brief presentation of the technique, the chemical structure of the bone, the changes in bone structure after death and the different possibilities for FTIR-ATR data manipulation and interpretation.

Keywords: FTIR-ATR spectroscopy, chemical composition of bone, taphonomy, collagen, mineral, FTIR spectrum analysis

Uvod

Fourierjeva transformacijska infrardeča (FTIR) spektroskopija predstavlja eno od hitrih in izredno informativnih tehnik kemične analize materialov. Uporablja se z namenom določitve in primerjave kemične sestave vzorcev (Smith 1999, 1). Z vidika arheologije je tehnika izredno zanimiva, saj je primerna za analize različnih organskih in anorganskih materialov ter hkrati zahteva zgolj majhne vzorce (Margaris 2014, 2890). Zaradi svoje široke uporabnosti in možnosti izogitve uničenju analiziranega vzorca je pogosto uporabljena tudi za analize človeških (ali živalskih) posmrtnih ostankov. FTIR analiza slednjih namreč omogoča vpogled v stanje kolagena in minerala v kosti. Pridobljeni rezultati tako nudijo izhodišče ali dopolnilo razumevanju tafonomskih sprememb v kosti po smrti organizma in vplivov fizičnega okolja na te spremembe.

Namen članka je predstavitev FTIR spektroskopije, predvsem tehnike oslabljenega popolnega odboja (*attenuated total reflection* – ATR) in njene uporabnosti v primeru analiz kosti iz arheoloških okolij. Besedilo podaja osnove FTIR-ATR spektroskopije in kemične sestave kosti, glavne tafonomske spremembe v kosti po smrti organizma ter izhodišča za interpretacijo pridobljenega spektra. Celoten postopek je prikazan tudi s primerom analize vzorcev kosti, izpostavljenih različnim tafonomskim spremembam.

FTIR spektroskopija

FTIR spektroskopija se uporablja za analize molekularne strukture in karakterizacijo materialov. Deluje na osnovi interakcije infrardeče (IR) svetlobe v povezavi z molekularnimi nihanji in rotacijami (Stuart 2004, 2). Skozi vzorec potujoča IR-svetloba povzroči različne vrste gibanj molekulskih vezi, kot so na primer simetrično in nesimetrično raztezanje in krčenje, upogibanje v ravnini ter gugajoče upogibanje zunaj ravnine. Funkcionalne skupine (denimo C = E, CH₃) oz. njihove vezi absorbirajo IR-svetlobo pri različnih valovnih dolžinah in različno intenzivno. S tem v vzorcu ustvarijo edinstven molekularni spekter (Stuart 2004, 46). Na osnovi valovnih dolžin in intenzitete absorpcijskih vrhov trakov v spektru je tako mogoče ugotoviti prisotne funkcionalne skupine (Smith 1999, 15–18). Ker je intenziteta absorpcijskega vrha traku proporcionalna koncentraciji funkcionalnih skupin, hkrati odraža količino skupine v vzorcu. Opozoriti velja, da slednje drži za čiste, enomolekularne vzorce. Pri večmolekularnih vzorcih je intenzivnost pogojena z različnimi molekulami in funkcionalnimi skupinami. Ker se trakovi v spektru večmolekularnega vzorca prekrivajo, je otežena jasna določitev koncentracij (Smith 1999, 19; Coates 2000, 3–6). Za interpretacijo spektra je lahko koristna tudi širina posameznega traku, saj je odvisna od jakosti medmolekularnih interakcij. Denimo močne vodikove vezi tvorijo široke trakove, medtem ko šibke van der Waalove vezi tvorijo ozke trakove (Smith 1999, 21).

Obstaja sicer več tehnik FTIR spektroskopije, vendar je v arheoloških kontekstih najpogosteje zaslediti transmisijsko tehniko z uporabo kalijevega bromida (KBr)

ter refleksijsko tehniko oslabljenega popolnega odboja (*attenuated total reflection* – ATR). V preteklosti je prevladovala uporaba prve, medtem ko je v zadnjem času opaziti prednjačenje druge. Razlogi za porast uporabe ATR tehnike so predvsem v boljši primerljivosti znotraj vzorcev in med njimi, v njeni stroškovni učinkovitosti ter možnosti analize tako uprašenih kot tudi trdnih vzorcev (Hollund *et al.* 2013; Beasley *et al.* 2014). Pri tem je treba poudariti, da rezultati, pridobljeni z različnimi tehnikami in na vzorcih v različnem stanju, niso neposredno primerljivi (Surovell, Stiner 2001; Hollund *et al.* 2013; Beasley *et al.* 2014; Leskovar 2016), kar velja upoštevati pri interpretacijah rezultatov različnih raziskav.

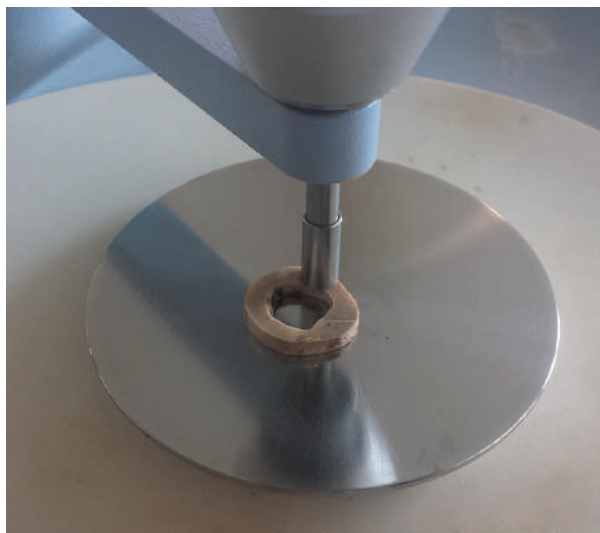
Priprava vzorcev

Priprava vzorcev za pridobitev FTIR spektra kosti je odvisna od uporabljene tehnike. Ob uporabi ATR tehnike je vzorce mogoče posneti v obliki prahu ali v trdni obliki. V prvem primeru je treba vzorce uprašiti, prah pa je posnet brez nadaljnjih priprav. Trdne vzorce je mogoče posneti neposredno, potrebna je le dovolj ravna površina, ki zagotovi dober stik med napravo in vzorcem (Hollund *et al.* 2013, 18; Beasley *et al.* 2014, 508).

Snemanje vzorcev s FTIR-ATR tehniko

Pred snemanjem vzorcev s FTIR napravo je treba posneti ozadje. Korak je nujen zaradi atmosferskih plinov, prisotnih v okolju, ki absorbirajo IR-sevanje (CO_2 , vodna para). Spekter posnetega ozadja je shranjen in ob snemanju vzorca samodejno odštet od spektra vzorca (Pavia *et al.* 2014, 25). Snemanje vzorca poteka s postavitvijo vzorca na kristal, nameščen v napravi (slika 1). Nastavitve snemanja so raznolike, odvisne od lastnosti vzorca in želene natančnosti. V primeru snemanja kosti se uporablja spekter srednjih valovnih dolžin med 4000 cm^{-1} in 400 cm^{-1} . Število ponovitev in ločljivost snemanja med raziskavami nihata med 8–64 ponovitvami pri ločljivosti $2\text{--}8\text{ cm}^{-1}$ (Thompson *et al.* 2009, 911; Hollund *et al.* 2013, 512; Lebon *et al.* 2016, 3). Njuna izbira temelji na potrebni natančnosti in časovni omejitvi. Večje število ponovitev in visoka ločljivost omogočita pridobitev natančnejših podatkov, a sta tudi časovno bolj zahtevna.

Pridobljeni spekter je nadalje obdelan z računalniško programsko opremo. Deloma je obdelava mogoča že s programom, pripadajočim napravi, deloma so zahtevani



Slika 1. Snemanje kostnega izseka s FTIR-ATR tehniko.

Figure 1. Scanning a bone section using the FTIR-ATR technique.

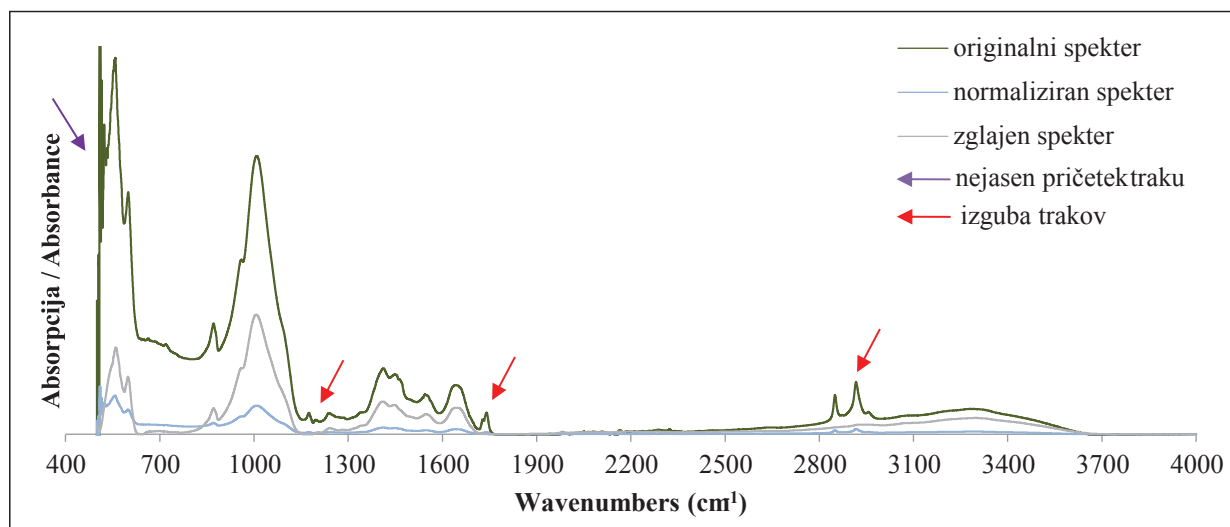
dodatni računalniški programi (Stuart 2004, 51–57). Izbira programske opreme ter nadaljnja obdelava sta odvisni od skeniranega vzorca, kakovosti pridobljenega spektra ter zastavljenih vprašanj. Potrebno je namreč najti pravo mero med pridobitvijo največje možne količine kakovostnih informacij brez prevelikih izgub (slika 2).

Kost

Sestava

Kost je kompozitni material s kompleksno hierarhično strukturo. 60 % teže kosti predstavlja anorganski del, 30 % organski del, medtem ko preostalih 10 % tvori voda (Gong *et al.* 1964, 329). Anorganski del zastopajo mineralni kristali, grajeni iz nestehiometričnega kalcijevega hidroksiapatita, poznanega kot bioapatit. Organski del kosti v 85–90 % zastopa kolagen tipa I, medtem ko preostanek sestavljajo nekolagenski proteini in lipidi (Millard 2001; Clarke 2008).

Kolagen tvorijo tri levosučne alfa verige, povezane v trojno desnosučno vijačno molekulo (Ramachandran 1967, 225; Lodish *et al.* 2000, 217). Vijačnico vzdržujejo interakcije in vezi med aminokislinskimi ostanki sosednjih stranskih verig (Brodsky, Ramshaw 1997, 546).



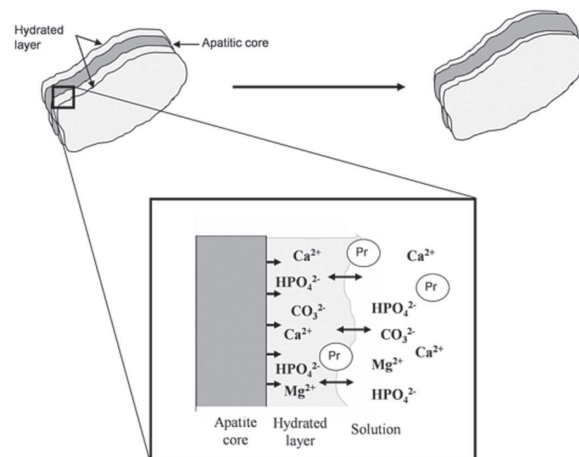
Slika 2. Primerjava med originalnim, normaliziranim in zglajenim spektrom istega vzorca.

Figure 2. Comparison between the original, normalised and tuned-up spectra of the same sample.

Molekule z vzdolžnim, vodoravnim in radialnim razporejanjem tvorijo fibrile (Hulmes 2002, 2), vzdrževane z mrežo kovalentnih navzkrižnih vezi znotraj molekul in med njimi (Fratzl, Weinkamer 2007, 1276). V mineraliziranem tkivu, kakršno je kost, so fibrile kolagena obdane z mineralom. Slednjega predstavljajo majhni in ploščati kristali kalcijevega fosfata, ki tvorijo slabo kristalinični, nestehiometrični kalcijev hidroksiapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (Landis *et al.* 1996, 206). Nestehiometričnost izvira iz zamenjav kalcijevih ionov ali fosfatnih in hidroksilnih skupin. Pri tem je najpogostejša zamenjava fosfatne s karbonatno skupino, ki tako lahko predstavlja 3–5 % bioapatita (Lowenstam *et al.* 1989, 17; Olszta *et al.* 2007, 82). Zamenjave povzročijo vgradnjo karbonata v strukturo kosti ter posledično popačenje in deformacije v mineralni mreži in omejitve velikost kristalov. Majhni kristali imajo veliko površino, kar poveča njihovo reaktivnost in topnost (Rey *et al.* 1990, 386; Currey 2002, 6). Reaktivnost je nadalje povečana z neapatitnim hidriranim slojem na površini kristala (slika 3), ki vsebuje labilne, lahko izmenljive ione, kot so denimo CO_3 , PO_4 in HPO_4 (Rey *et al.* 1990, 386; Cazalbou *et al.* 2004, 564).

Mineralizirani fibrili predstavljajo osnovne gradnike kosti. Tvorijo namreč vlakna, nadalje zložena v snope, ki sestavljajo nezrelo in zrelo strukturo kosti (Currey 2002,

12; Clarke 2008, 137). Strukture so nadalje povezane ali v trdno in gosto kortikalno ali močno porozno (~ 80 %) trabekularno kost. Oba tipa skupaj tvorita skeletne elemente različnih velikosti in oblik (Fratzl, Weinkamer 2007, 1270–1273).



Slika 3. Hidrirani sloj na površini kristala (Farlay *et al.* 2010, 334, sl. 1).

Figure 3. Hydrated layer on the surface of the crystal (Farlay *et al.* 2010, 334, Fig. 1).

Tafonomske spremembe v kosteh

Po smrti organizma je skelet izpostavljen fiziokemičnim spremembam, ki vodijo v popoln propad ali fosilizacijo (Hedges 2002; Jans 2005; Nielsen-Marsh *et al.* 2007; Smith *et al.* 2007). Proces sprememb oz. njihovo proučevanje je poimenovano tafonomija (Efremov 1940) in je nadalje razdeljeno na biostratinomijo in diagenozo. Prva je vezana na makroskopske in mikroskopske spremembe pred odložitvijo posmrtnih ostankov, druga na spremembe po njej. Celoten proces vpliva na ohranjenost kosti ter informacije, ki jih le-ta hrani (Smith 2002, 21–27). Zaradi odvisnosti številnih notranjih in zunanjih dejavnikov je proces izredno kompleksen (Hedges, Millard 1995; Hedges 2002; Tütken, Vennemann 2011). V osnovi vpliva na spremembe minerala in kolagena v kosti. Oba sta lahko prizadeta zaradi delovanja mikroorganizmov, kar se največkrat zgodi v začetni fazi procesa (Hedges 2002, 321). Posledica delovanja organizmov je izguba organskega dela kosti ter reorganizacija minerala (Hedges 2002, 321–322; Jans *et al.* 2004, 87–88). Do propadanja kolagena lahko pride tudi s kemično hidrolizo peptidnih vezi. Proces zahteva svoj čas in je značilen za geokemično stabilna okolja, vendar je lahko močno pospešen v primeru visokih temperatur in okolij z izredno nizkimi ali visokimi pH vrednostmi (Collins *et al.* 2002, 387). Kemična hidroliza pripelje do denaturacije kolagena v želatino, ki se izluži iz kosti (Collins *et al.* 1995, 181; isti 2002, 387). Poleg mikroorganizmov spremembe v mineralu najpogosteje povzročata voda. Interakcija med kostjo in vodo namreč vodi v raztapljanje in rekristalizacijo mineralnih kristalov ter absorpcijo ionov iz okolja. Končni rezultat je ali popolno izginotje kosti ali njena povišana kristaliničnost (Hedges, Millard 1995; Smith 2002, 29–30). Omeniti velja, da tesen odnos med mineralom in kolagenom predstavlja njuno vzajemno zaščito, ključno za dolgoročno ohranitev kosti. Izguba enega ali drugega vodi v dodatno izpostavljenost tafonomskim spremembam ter hitrejši propad (Hedges, Millard 1995; Nielsen-Marsh, Hedges 2000; Jackes *et al.* 2001; Collins *et al.* 2002; Trueman *et al.* 2004; Jans 2005).

Poseben tafonomski proces predstavljajo izredne okoliščine izpostavitve kosti visokim temperaturam. Izpostavitve v osnovi povzročijo izgubo vode (100–600 °C), razgradnjo in izgubo organskih snovi (300–800 °C) ter povečanje kristaliničnosti (500–1100 °C). Končne posledice izpostavitve so vendarle lahko raznolike, odvisne od

začetnega stanja kosti (prisotnost/odsotnost mehkega tkiva), višine temperatur ter načina in časa izpostavljenosti (Thompson 2004, 204; Koon 2006, 31).

FTIR spektroskopija kosti

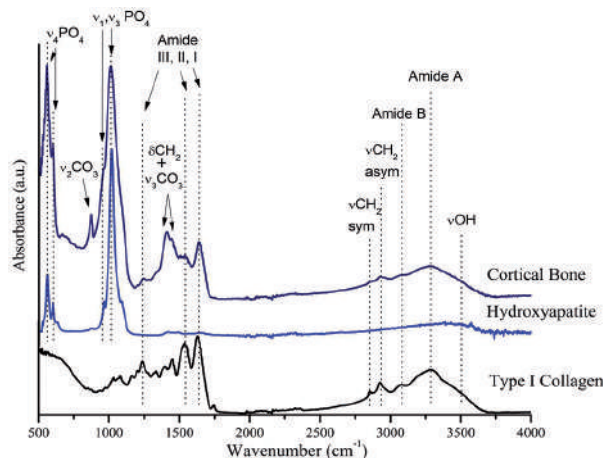
Prepoznavanje funkcionalnih skupin v kosti

V kosti so prisotne različne funkcionalne skupine, v glavnini vezane na mineral, kolagen in lipide. Skupini PO_4 in CO_3 predstavljata hidroksiapatit, prepoznaven pri valovnih dolžinah 500–700 cm^{-1} in 900–1500 cm^{-1} , kolagen je prek amidnih skupin I–III, A in B prepoznaven pri dolžinah 1200–1700 cm^{-1} in 3000–3700 cm^{-1} , medtem ko gre lipide s skupinami CH_2 , CH_3 in CO prepoznati pri dolžinah 700–1800 cm^{-1} in 2800–3000 cm^{-1} . Pri tem je treba omeniti nekaj prekrivanj. V območju med 500 in 700 cm^{-1} del trakov tvorijo tudi amidi IV–VII, v območju med 1300 in 1600 cm^{-1} so prisotne skupine minerala, amidov in lipidov, prekrivanje pa je prisotno tudi v sku-

Valovna dolžina / Wavelength (cm^{-1})	Mineral / Mineral	Kolagen / Collagen	Lipidi / Lipids
~ 560	PO_4	Amide IV–VII	
~ 600	PO_4		
~ 720			CH_2
~ 870	CO_3		
~ 1016	PO_4		
~ 1175			CO
~ 1395		$\text{CH}_2 + \text{CH}_3$	
~ 1415	CO_3		
~ 1455	CO_3	CH_2	
~ 1465			$\text{CH}_2 + \text{CH}_3$
~ 1245		Amide III (CN, NH)	
~ 1550		Amide II (NH, CN)	
~ 1650		Amide I (CO)	
~ 1745			CO
~ 2850		CH_2	CH_2
~ 2920		CH_2	CH_2
~ 3080		Amide B	
~ 3290		Amide A	

Tabela 1. Funkcionalne skupine v kosti.

Table 1. Functional groups in bone.



Slika 4. FTIR spektri kortikalne kosti, hidroksiapatita in kolagena tipa I (Figueiredo *et al.* 2014, 321, sl. 4).

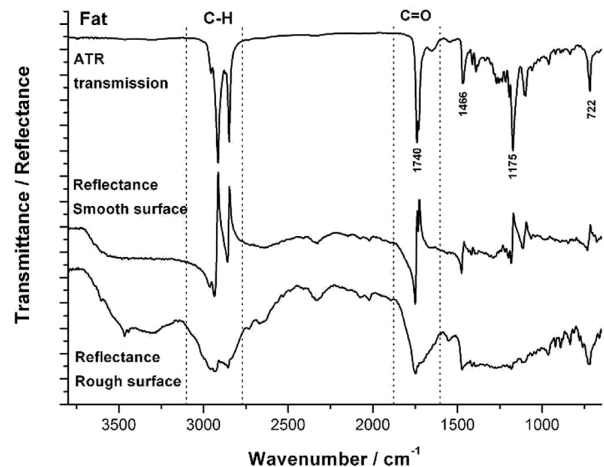
Figure 4. FTIR spectra of the cortical bone, hydroxyapatite and type I collagen (Figueiredo *et al.* 2014, 321, Fig. 4).

pinah kolagena in lipidov¹ v območju med 2800 in 3000 cm^{-1} (tabela 1; sliki 4 in 5) (Figueiredo *et al.* 2014, 322; Prinsloo *et al.* 2014, 735).

Pridobitev informacij

Večina trakov kostnega spektra je sestavljena iz več funkcionalnih skupin. Njihova ločitev na posamezne komponente je z odvajanjem sicer mogoča, vendar zgolj na osnovi visoko kakovostnega spektra z nizkim šumom in dobrim razumevanjem v vzorcu prisotnih molekul (Petibois *et al.* 2009, 510–511). Odvajanje je tako precej težavno, posebej v primeru kosti iz arheoloških kontekstov. Zaradi podvrženosti tafonomiji njihova sestava namreč ni povsem jasna. Tako pridobljeni spektri običajno niso uporabljeni v absolutnem smislu, temveč služijo kot izhodišče različnim primerjavam med vzorci in znotraj njih (Figueiredo *et al.* 2012, 324).

Na osnovi primerjav je mogoče pridobiti informacije o kristaliničnosti minerala (Weiner, Bar-Yosef 1990), vsebnosti karbonatov (Wright, Schwarcz 1996), vsebnosti organskih snovi (Trueman *et al.* 2004; Grecu *et al.* 2007) ter razmerju med organskimi in anorganskimi snovmi v kosti (Trueman *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2009). Če je odvajanje vendarle uporabljeno, FTIR spekter lahko poda natančnejše



Slika 5. FTIR spekter maščobe (Prinsloo *et al.* 2014, 736, sl. 6c).

Figure 5. FTIR spectrum of fat (Prinsloo *et al.* 2014, 736, Fig. 6c).

informacije o strukturnih spremembah v mineralu in kolagenu (Trueman *et al.* 2004; Lebon *et al.* 2008; Chadefaux *et al.* 2009; Anastassopoulou *et al.* 2015).

Kristaliničnost

Kristaliničnost minerala je pogojena z velikostjo kristalov in urejenostjo kristalne mreže (Winer, Bar-Yosef 1990, 189–190). Tafonomija kosti vpliva na obe lastnosti, ki tako omogočita zaznavo sprememb. V FTIR spektru je kristaliničnost izražena z vrhovi trakov PO_4 pri ~ 560 in ~ 600 cm^{-1} in njunim delitvenim dejavnikom (*splitting factor* – SF) (Weiner, Bar-Yosef 1990, 189–190). Raziskave poročajo o gibanju SF vrednosti moderne kosti med 2,5 in 4 (Wright, Schwarcz 1996; Berna *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2009; Hollund *et al.* 2013; Beasley *et al.* 2014). Ker SF odraža rast kristalov, se njegova vrednost s tafonomskimi spremembami v kosti viša (Wright, Schwarcz 1996, 936; Berna *et al.* 2004, 879).

Urejenost mreže je mogoče ugotovljati z razmerjem med vrhovi trakov PO_4 pri valovni dolžini 1030 cm^{-1} in 1020 cm^{-1} . Razmerje 1030/1020 namreč odraža odnos med nestehiometričnimi in stehiometričnimi apatiti v mineralu (Paschalis *et al.* 1996, 482) ter apatitnimi in neapatitnimi okolji kristalov (Farlay *et al.* 2010, 435). V modernih kosteh je vrednost razmerja okrog 1,12 (Lebon *et al.*

¹ Lipidi presegajo okvir tega članka in nadalje ne bodo obravnavani.

2010, 2269). Ker tafonomski procesi vodijo v nižjo raven nestehiometričnih apatitov in neapatitnih okolij, naraslo razmerje 1030/1020 odraža izboljšano urejenost mineralne mreže (Lebon *et al.* 2010, 2267–2268).

Vsebnost karbonatov

Vsebnost karbonatov v mineralni strukturi kosti se spreminja s tafonomskimi procesi. Ocena njihove vsebnosti je podana z razmerjem med vrhom traku CO_3 pri $\sim 1035 \text{ cm}^{-1}$ in vrhom traku PO_4 pri $\sim 1415 \text{ cm}^{-1}$ (Wright, Schwarcz 1996, 936). Raziskave poročajo o vrednosti moderne kosti med 0,22 in 0,4 (Wright, Schwarcz 1996; Nielsen Marsh, Hedges 2000; Garvie Lok *et al.* 2004). Nižje razmerje C/P nakazuje na raztapljanje in obarjanje fosfatov ali na raztapljanje in obarjanje strukturnih karbonatov. Višje razmerje C/P je vezano na zamenjavo fosfatov s karbonati ali na raztapljanje in obarjanje fosfatov (Thomas *et al.* 2007, 1536). Pri interpretaciji je potrebne nekaj pazljivosti, saj sočasni pojav več omenjenih procesov lahko pripelje do na videz nespremenjenih vrednosti razmerja C/P in s tem prikrije spremembe (Nielsen Marsh, Hedges 2000, 1144).

Strukturne spremembe minerala

Spremembe v mineralni mreži so opazne tudi prek vrha traku PO_4 , ki je v modernih vzorcih viden pri valovni dolžini $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ (Pasteris *et al.* 2004, 232; Lebon *et al.* 2010, 2268). Izmenjave ionov v mineralni mreži povzročijo premik vrha na druge valovne dolžine. Pozitivni premik tako odraža izgubo karbonatov in/ali vključevanje fluora v mrežo, ki je posledično bolj urejena (Lebon *et al.* 2010, 2273).

Vsebnost kolagena

Ocena vsebnosti kolagena je izražena z razmerjem med vrhom traku amida I pri $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$ ter vrhom trakov PO_4 pri $\sim 1035 \text{ cm}^{-1}$ (Am/P) in CO_3 pri $\sim 1415 \text{ cm}^{-1}$ (Am/C). Značilne vrednosti AmI/P modernih kosti nihajo med 0,1 in 0,3 (Trueman *et al.* 2004, 726; Hollund *et al.* 2013, 516–519; Lebon *et al.* 2016, 14), medtem ko se vrednosti AmI/C gibljejo okrog $\sim 1,1$ (Thompson *et al.* 2013, 420). Izguba kolagena se odraža v manj intenzivnem vrhu amidnega traku in s tem v nižjem razmerju Am/P oz. Am/C (Trueman 2004, 726; Thompson *et al.* 2013, 419–420).

Strukturne spremembe kolagena

Strukturne anomalije kolagenskih proteinov so vidne v razmerju med amidom I in amidom II, ki je v moderni kosti med 0,6 in 1,1. Ker je slednji bolj občutljiv v primerjavi s prvim (Anastassopoulou *et al.* 2015, 93), se njuno razmerje s tafonomskimi procesi niža (Leskovar 2016, 77). Odvajanje traku amida I (tabela 2) in III raz-

Valovna dolžina / Wavelength (cm^{-1})	Posamezne komponente / Components
~ 1610	Denaturirani kolagen / Denatured collagen
~ 1630	Denaturirani kolagen / Denatured collagen
~ 1643	Upogibanje molekule $\text{H}_2\text{O} / \text{H}_2\text{O}$ bending
~ 1650	Denaturirani kolagen Denatured collagen
~ 1660	α vijačnice / α helix
~ 1668	Nepripisano / Non attributed
~ 1674	Karbonske skupine lateralnih verig / Carbonyl groups from collagen lateral groups
~ 1681	Denaturirani kolagen / Denatured collagen
~ 1690	Vijačnice kolagenu podobnih peptidov / Helices of aggregated collagen-like peptides
~ 1697	Nepripisano / Non attributed

Tabela 2. Posamezne komponente traku amida I.

Table 2. Components of the Amide I band.

Valovna dolžina / Wavelength (cm^{-1})	Zamenjava / Substitution
~ 880	Karbonat zamenja OH skupino – enojni trak / Carbonate substitution of the OH group – single band
$\sim 1450, \sim 1545$	Karbonat zamenja OH skupino – dvojni trak / Carbonate substitution of the OH group – double band
$\sim 875, \sim 1410, \sim 1455$	Karbonat zamenja fosfatno skupino – enojni trak / Carbonate substitution of the phosphate group – single band

Tabela 3. Zamenjave v mineralni mreži ob izpostavitvi kosti visokim temperaturam.

Table 3. Substitutions in the bone mineral matrix due to high temperature exposure.

deli osnovni absorpcijski trak na posamezne komponente (Payne, Veis 1988; Renugopalakrishnan *et al.* 1989; Prystupa, Donald 1996; Chang, Tanaka 2002; Habermehl *et al.* 2005; Barth 2007; Chadeaux *et al.* 2009) (tabela 2). Pri tafonomskih procesih običajno pride do denaturacije kolagena, ki jo je mogoče opaziti v razmerju med komponento ~ 1660 in ~ 1630 cm^{-1} (60/30) znotraj amida I ter komponento ~ 1237 in 1270 cm^{-1} (37/70) znotraj amida III (Habermehl *et al.* 2015, 825–826; Leskovar 2016, 78). Komponenti ~ 1660 in ~ 1270 cm^{-1} namreč odražata α vijačnice, zato je njuna izguba nakazuje denaturacijo kolagena (Chi *et al.* 1998, 2858; Chang, Tanaka 2002, 4817; Habermehl *et al.* 2005, 824–825).

Do opaznih sprememb v strukturi kosti pride tudi ob izpostavitvi kosti visokim temperaturam. Pri valovnih dolžinah 880, 1450 in 1545 cm^{-1} je OH skupina v mineralu nadomeščena s karbonatno skupino, pri valovnih dolžinah 1455, 1410 in 875 cm^{-1} pa karbonat zamenja fosfatno skupino (tabela 3). Poleg tega temperature pod 400 °C močneje vplivajo na razmerja C/P, AmI/C in AmI/P ter na

širino PO_4 traku pri valovni dolžini ~ 1035 cm^{-1} , temperature med 400 in 700 °C na SF in širino PO_4 traku pri valovni dolžini ~ 1035 cm^{-1} , temperature nad 700 °C pa na razmerje C/P ter razmerje med vrhovoma traku pri 625 in 610 cm^{-1} . Omeniti velja še, da se slednja dva trakova pojavita šele pri izpostavitvi kosti nad 700 °C (Thompson *et al.* 2013, 418–419).

Primer analize

Z namenom prikaza uporabnosti FTIR spektroskopije za vpogled v stanje ohranjenosti kosti so bila opravljena FTIR skeniranja različnih vzorcev. Skenirani so bili vzorec sveže kosti ter vzorci kosti, izpostavljenih različnim tafonomskim procesom (Leskovar 2016, 27–28).

Metodologija

Vzorci

Analizirani vzorci (tabela 4) izvirajo iz raziskav z namensko, nadzorovano izpostavitvijo vzorcev agresivnim

Vzorec / Sample	Kost / Bone	Izpostavljenost / Exposure
F1	moderna ovčja	brez / none
F1D	moderna ovčja	visok hidravlični potencial / high hydraulic conductivity (D)
F1pH	moderna ovčja	pH 3 (pH)
A1	arheološka ovčja	arheološko okolje / archaeological context
A2	arheološka človeška	kremacija / cremation

Tabela 4. Analizirani vzorci.

Table 4. Analysed samples.



Slika 7. Arheološka ovčja dolga kost.

Figure 7. Archaeological long bone of a sheep.



Slika 6. Sveža ovčja dolga kost.

Figure 6. Fresh long bone of a sheep.



Slika 8. Žgana človeška kost.

Figure 8. Cremated human bone.

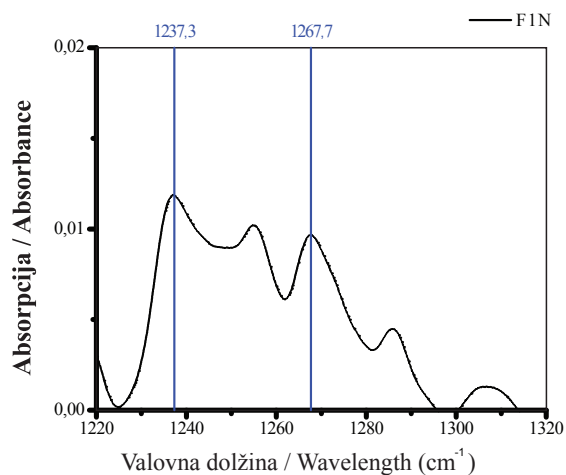
okoljem ter z arheoloških najdišč. V primeru prvih gre za svežo kost ovce (slika 6), izpostavljeno okolju z visokim hidravličnim potencialom (D) in okolju z nizko pH vrednostjo (pH). Arheološka vzorca predstavljata dobro ohranjeno ovčjo kost (sliki 7, 9) z rimskodobnega najdišča (A1) ter del človeške žganine (slika 8) s prazgodovinskega najdišča (A2).

Deblo moderne ovčje kosti je bilo razrezano na 3 mm debele preseke. Dva izmed presekov sta bila šest tednov izpostavljena okolju z visokim hidravličnim potencialom in okolju s pH vrednostjo 3. Po izpostavitvi sta bila oba preseka očiščena z deionizirano vodo ter posušena na zraku. FTIR snemanje je bilo brez dodatnih priprav opravljeno na enem neizpostavljenem preseku ter obeh izpostavljenih presekih.



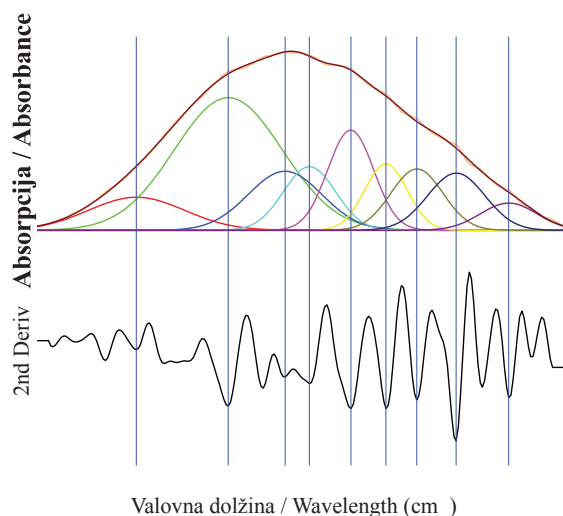
Slika 9. Preseki arheološke ovčje kosti.

Figure 9. Cross-sections of the archaeological sheep bone.



Slika 10. Izmera višin vrhov trakov pri ~ 1237 in ~ 1270 cm^{-1} .

Figure 10. Measuring peak heights at ~ 1237 and ~ 1270 cm^{-1} .



Slika 11. Odvajanje in pridobitev posameznih komponent traku amida I.

Figure 11. Differentiation and determination of the Amide I band components.

Arheološka ovčja kost je bila razrezana na 3 mm debele preseke (slika 9). Snemanje je bilo opravljeno brez nadaljnjih priprav.

Arheološka žgana kost je bila posneta brez predhodnih priprav.

Snemanje in obdelava podatkov

FTIR snemanje je bilo opravljeno s tehniko ATR. Uporabljen je bil spektrometer *PerkinElmer* s pripadajočo programsko opremo. Vsi vzorci so bili skenirani v območju 4000–400 cm^{-1} . Opravljenih je bilo 32 skeniranj vsakega vzorca z resolucijo 4 cm^{-1} in intervalom 0,1 cm^{-1} . Skeniranje posameznega vzorca je bilo ponovljeno trikrat. Za nadaljnje analize je bilo uporabljeno povprečje vseh treh skeniranj. Pridobljeni podatki so bili nato obdelani s programsko opremo *Origin Pro 2016*, s katero so bili opravljeni odvajanje in izmere višin vrhov (slika 10) ter površin komponent (slika 11). Na osnovi enačb (tabela 5) je bil za izračun razmerij uporabljen program *Microsoft Office Excel*.

Rezultati

Spekter

Izpostavitve vzorcev tafonomskim procesom je povzročila številne spremembe (priloga 1). V pH okolju so vidne izgube PO_4 in CO_3 trakov na valovnih dolžinah med 500 in

1200 cm^{-1} . V okolju pH je opazna izguba dihotomije trakov amida III in CO_3 na valovnih dolžinah med 1200 in 1500 cm^{-1} ter izguba CH_2 in CO trakov med 700 in 1800 cm^{-1} . Arheološki vzorec A1 kaže dobro ohranjenost z rahlim nižanjem in izgubo dihotomije vrhov amidov. Vzorec A2, izpostavljen visokim temperaturam, odraža predvsem izgubo trakov organskega dela kosti ter večjo izrazitost trakov minerala. Opaziti gre tudi dodaten vrh pri $\sim 620 \text{ cm}^{-1}$.

PO_4 trak z vrhom pri $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$

Valovna dolžina vrha traku pri 960 cm^{-1} modernega neizpostavljenega vzorca je bila 960 cm^{-1} . Z izpostavitvijo vzorca okolju D se ni spremenila. Z izpostavitvijo okolju pH se je vrh premaknil na 937 cm^{-1} . Valovna dolžina vrha v arheološki kosti je bila rahlo nižja od tiste v sveži kosti, medtem ko je bila v žganem vzorcu rahlo višja (tabela 6).

Razmerja

V primerjavi s svežim vzorcem je bil SF v vseh preostalih vzorcih povišan, najočitneje v žgani kosti. Razmerje 1030/1020 je bilo opazno spremenjeno v vzorcu, izpostavljenem okolju pH, ter v žganem vzorcu. Razmerje C/P se je v okolju D in pH povišalo, izrazito v slednjem. V arheoloških vzorcih je razmerje v primerjavi s svežo kostjo nižje. Podoben trend je zaslediti v Aml/P in Aml/C, z izjemo Aml/C v vzorcu A1, ki je bilo povišano. Razmerji Aml/AmII in Aml/AmIII sta bili v vseh primerih povišani v primerjavi s svežo kostjo, medtem ko sta bili razmerji 37/70 in 60/30 nižji. Izjemi sta le razmerje 60/30 v vzorcu A1, ki je bilo povišano, ter žgan vzorec A2, pri katerem vrhovi, potrebni za izmere, niso bili več razpoznavni (tabela 7).

Razmerje / Ratio	Vrhovi / Peaks	Enačba / Equation
SF	$\sim 560, \sim 600$ in vmesni minimum $\sim 590 \text{ cm}^{-1}$	$H \sim 600 + H \sim 560$ $H \sim 590$
P/P	1020 in 1030 cm^{-1}	H_{1030}/H_{1020}
C/P	~ 1016 in $\sim 1415 \text{ cm}^{-1}$	H_{1415}/H_{1016}
Aml/P	~ 1016 in $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$	H_{1650}/H_{1016}
Aml/C	~ 1415 in $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$	H_{1650}/H_{1415}
Aml/AmII	~ 1550 in $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$	H_{1650}/H_{1550}
Aml/AmIII	~ 1237 in $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$	H_{1650}/H_{1237}
37/70	~ 1237 in $\sim 1270 \text{ cm}^{-1}$	H_{1237}/H_{1270}
60/30	~ 1660 in $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$	A_{1660}/A_{1630}

Tabela 5. Uporabljene enačbe za izračun razmerij. H = največja višina vrha traku, A = površina komponente traku.

Table 5. Equations for the ratio calculations. H = maximum band height, A = area of the band component.

VZOREC / SAMPLE	TOČNA VALOVNA DOLŽINA PO_4 PRI $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ / EXACT WAVELENGTH OF THE PO_4 AT $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$
FIN	960
F1D	960
F1pH	937
A1	958,5
A2	961

Tabela 6. Točne valovne dolžine vrha traku $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ analiziranih vzorcev.

Table 6. Exact wavelengths of the analysed $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ band samples.

VZOREC / SAMPLE	SF	1030/1020	C/P	AmI/P	AmI/C	AmI/AmII	AmI/AmIII	37/70	60/30
FIN	3.62	0.93	0.27	0.21	0.76	0.61	1.54	0.78	0.59
FID	4.28	0.92	0.31	0.39	1.23	0.76	4.36	0.48	0.29
FlpH	NO	1.24	0.56	3.27	5.80	0.66	3.12	0.287	0.24
A1	5.62	0.90	0.23	0.19	0.84	0.71	3.95	0.4211	1.12
A2	6.05	1.02	0.07	0.03	0.47	/	/	/	/

Tabela 7. Rezultati izračunanih razmerij za posnete vzorce.

Table 7. Results of the analysed sample ratios.

Diskusija

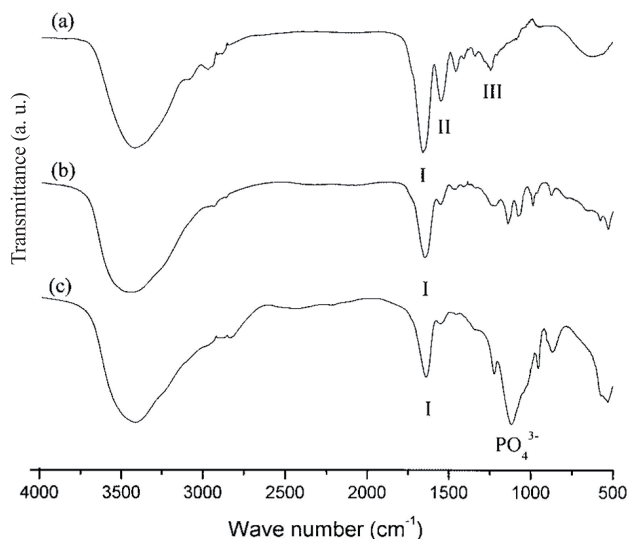
Primerjava med svežo kostjo in kostmi, izpostavljenimi različnim tafonomskim procesom, izraža jasne razlike v ohranjenosti kolagena in minerala. Neposredna primerjava pridobljenih spektrov je nekoliko otežena zaradi raznolike absorpcije vsakega izmed vzorcev. Tako kaže zgolj grob vpogled v spremembe, ki ga je treba podpreti z izračunanimi razmerji.

Spremembe v mineralu

Spremembe v mineralu so najočitnejše v vzorcu, izpostavljenem okolju z nizko pH vrednostjo. Kislo okolje je namreč povzročilo izgubo trakov funkcionalnih skupin minerala, kar kaže na raztapljanje le-tega (Smith 1999, 19). Slednje je mogoče potrditi s primerjavo pridobljenega spektra s primerom spektra vzorca čistega kolagena ter vzorca kolagena z manj kot 50 % kalcijevega fosfata (sliki 12–13). SF vzorca, izpostavljenega kislemu okolju, ni bilo moč izračunati zaradi izgube vrhov trakov, medtem ko razmerja med mineralom in kolagenom kažejo izrazito povečanje koncentracij slednjega. Natančnejši vpogled v razmerja razkriva izgubo neapatitnih okolij in večje koncentracije strukturnih karbonatov. Vzorec s tem odraža raztapljanje vseh vrst mineralnih kristalov, tudi osnovnih fosfatnih gradnikov. Porast karbonatov je namreč moč obrazložiti zgolj z raztapljanjem fosfata (Thomas *et al.* 2007, 1536). Pridobljeni rezultati se tako ujemajo z drugimi raziskavami vpliva kislih okolij na strukturo kosti (Figueiredo *et al.* 2011; El-Bassyouni *et al.* 2013).

Spekter vzorca, izpostavljenega okolju z visokim hidravličnim potencialom, ne kaže primerljivo izrazitih razlik kot vzorec izpostavljen kislemu okolju. Tako je upora-

ba razmerij toliko bolj potrebna. Razmerja prikazujejo pričakovano rast velikosti kristalov (Wright, Schwarcz 1996, 936; Berna *et al.* 2004, 879), zanemarljive razlike v neapatitnih okoljih ter dvig koncentracij strukturnih karbonatov. Slednje je mogoče razložiti ali z zamenjavo fosfatov s karbonati ali z raztapljanjem in izgubo prvih (Thomas *et al.* 2007, 1536). Glede na to, da je govora o okolju z visokim hidravličnim potencialom, je verjetnejša druga možnost. Hiter pretok vode bi namreč težko



Slika 12. FTIR spekter čistega kolagena (a), kolagena s 50 % kalcijevega fosfata (b) ter kolagena s 70 % kalcijevega fosfata (c) (Zhang *et al.* 2003, 1053, Fig. 3).

Figure 12. FTIR spectra of pure collagen (a), collagen with 50 % of calcium phosphate (b), and collagen with 70 % of calcium phosphate (c) (Zhang *et al.* 2003, 1053, Fig. 3).

dopuščal rekristalizacijo. Veliko bolj verjetna je možnost raztapljanja in odnašanja mineralnih kristalov iz kosti.

Primerjava med svežo in arheološko kostjo A1 prikazuje dobro ohranjenost slednje z zanemarljivimi spremembami v trakovih minerala. Boljšo sliko predstavijo razmerja, ki kažejo pričakovano rast kristalov (Wright, Schwarcz 1996, 936; Berna *et al.* 2004, 879) in izgubo karbonatov. Slednja odraža arheološko okolje, ki ni dopuščalo izrazite izgube fosfatnih ionov na račun raztapljanja ali izmenjave s karbonatnimi ioni iz okolja (Nielsen-Marsh, Hedges 2000, 1144; Thomas *et al.* 2007, 1536).

Vzorec, izpostavljen visokim temperaturam, prikazuje izrazite PO_4 trakove in pridobitev traku z vrhom pri $\sim 620 \text{ cm}^{-1}$. Razmerja odražajo pričakovano rast kristalov (Wright, Schwarcz 1996, 936; Berna *et al.* 2004, 879) ter bolj urejeno kristalno mrežo zaradi izgube neapatitnih okolij in karbonatov (Lebon *et al.* 2010, 2267–2270). Omenjeni trak $\sim 620 \text{ cm}^{-1}$ nadalje nakazuje na izpostavljenost kosti temperaturam, višjim od $700 \text{ }^\circ\text{C}$ (Thompson *et al.* 2013, 418–419).

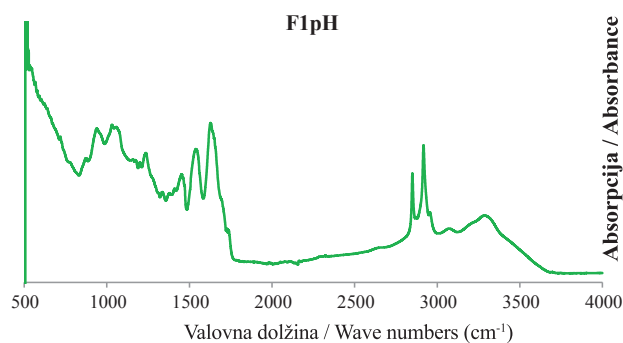
Nekoliko bolj kompleksen je premik vrha traku pri $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$. Lebon *et al.* (2010) govorijo o pozitivnem premiku vrha z vse bolj urejeno kristalno mrežo. Pri tem za dovolj pomembno označijo spremembo, večjo od 1 cm^{-1} . V pričujoči raziskavi se je vrh traku vzorca, izpostavljenega kislemu okolju, izrazilo premaknil na nižjo valovno dol-

žino. Premik tako lahko odraža že prikazano raztapljanje minerala in s tem manj urejeno kristalno mrežo. Premik v žganem vzorcu A2 je skladen z Lebnovo teorijo, saj se je vrh premaknil v pozitivno smer. Neskladen pa je negativen premik vrha dobro ohranjenega arheološkega vzorca A1. Po teoriji bi bilo namreč pričakovati pozitiven premik. Razlago gre morda iskati v vzpostavitvi Lebnove teorije zgolj na osnovi kosti, izpostavljenih visokim temperaturam, ter kosti pleistocenske starosti. Seveda je vzorec premajhen za oprijemljive zaključke. Vendar velja omeniti, da je bil trend negativnega premika opazen tudi na drugih rimskodobnih arheoloških vzorcih (Leskovar 2016, 56). Morda gre za odraz različnega vpliva tafonomskih sprememb na kosteh, pogojenega bodisi z okoljem bodisi s časom.

Spremembe v kolagenu

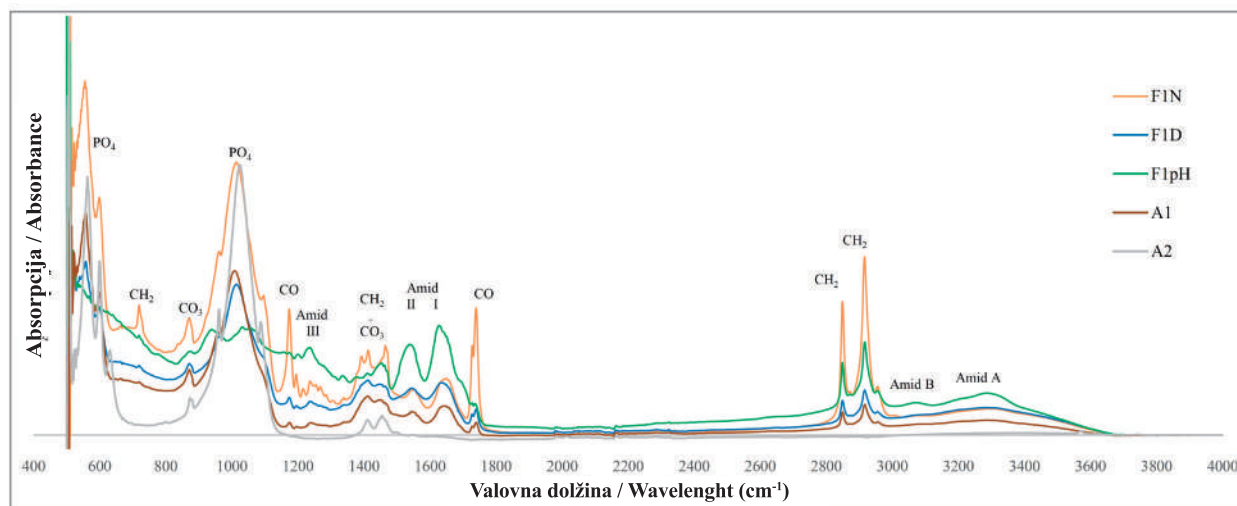
V vzorcu, izpostavljenem kislem okolju, so trakovi amidov narasli, kar odraža izgubo minerala s posledično povišanimi koncentracijami kolagena (Zhang *et al.* 2003). Večje koncentracije kolagena so bile nadalje potrjene s povišanimi razmerji med mineralom in amidi. Podrobnejši vpogled v razmerja med amidi in njihovimi komponentami vendarle kaže na strukturne spremembe v kolagenu oz. njegovo denaturacijo (Chi *et al.* 1998, 2858; Chang and Tanaka 2002, 4817; Habermehl *et al.* 2005, 824–825; Anastassopoulou *et al.* 2015, 93). Visoko hidravlično okolje je povzročilo izpiranje kolagena iz kosti, kar je vidno tako v izgubi trakov spektra kot v razmerjih med posameznimi amidi. Podobno kot v kislem okolju so tudi v visoko hidravličnem okolju opazne strukturne spremembe kolagena. V kolagenu opazne spremembe gre povezati z že omenjenim izpiranjem minerala, saj potrjuje teorije o medsebojni odvisnosti minerala in kolagena v kontekstu njune ohranitve (Hedges, Millard 1995; Nielsen-Marsh, Hedges 2000; Jackes *et al.* 2001; Collins *et al.* 2002; Trueman *et al.* 2004; Jans 2005).

V arheološkem vzorcu A1 gre sicer opaziti nekaj izgub amidov, vendar so te majhne, najočitnejše v traku amida III. Primerjava vrhov trakov amidov z vrhovi trakov mineralov je skladna z dobro ohranjenimi fosfatnimi funkcionalnimi skupinami ter nekaj izgubami karbonatov. Opaziti gre tudi izrazite spremembe v komponentah amida II, ki kažejo denaturacijo kolagena. Težavo predstavlja nepričakovano visoko razmerje 60/30 med komponentami amida I. Denaturacija kolagena bi namreč morala po-



Slika 13. FTIR spekter moderne ovčje kosti, izpostavljene kislemu okolju.

Figure 13. FTIR spectrum of a modern sheep bone exposed to an acidic environment.



Priloga 1. Spektri analiziranih kosti.

Appendix 1. Spectra of the analysed bones.

kazati nizko razmerje, ne visokega. Najverjetneje gre za težavo, nastalo pri procesu odvajanja. Kot že omenjeno, so kompozitni (arheološki) vzorci lahko precej težavni za odvajanje, saj njihova struktura ni povsem jasna. Posebej težavna je prisotnost vode, ki lahko močno popači komponente, pridobljene z odvajanjem (Chadefaux *et al.* 2009, 324; Figueiredo *et al.* 2012, 134–135).

Izpostavitve kosti visokim temperaturam je pričakovano povzročila popolno izgubo kolagena (Thompson 2004, 204), videno v številnih raziskavah (Lebon *et al.* 2008; Thompson *et al.* 2009; Lebon *et al.* 2010).

Zaključki

Namen članka je predstavitev uporabnosti FTIR spektroskopije kot dopolnitve (osteo)arheoloških analiz. Opozoriti velja, da prikazani vzorci predstavljajo le nekaj primerov sprememb v pridobljenem spektru. Podane interpretacije tako ne temeljijo zgolj na predstavljenih vzorcih, temveč so osnovane na širšem ozadju teorij in predvsem drugih, večjih raziskav.

Primerjave med spektri kosti različnega izvora jasno kažejo na možnosti, ki jih FTIR-ATR analize ponujajo. Prepoznati gre namreč številne kemične spremembe v mineralu in kolagenu, do katerih pride zaradi tafonomskih procesov. Z dovolj dobrim zajemom podatkov je tako moč prepoznati izgube gradnikov kosti ali njihove strukturne spremembe. Tehnika s tem odpira številne možnosti prepoznavanja stanja ohranjenosti kosti in njihovega potenciala za nadaljnje analize (denimo analize izotopov ali aDNK), razumevanja vpliva tafonomije na kemično sestavo kosti ter vpliva okolja na tafonomski proces. Slednje nudi tudi možnost raziskave z nasprotno perspektive, torej interpretacije okolja, v katerem se je kost nahajala.

Application of FTIR spectroscopy for analysing bones from archaeological contexts

(Summary)

The contribution's aim is to present FTIR-ATR spectroscopy and its applicability in osteoarchaeological analyses. It brings basic data on the technique, on the chemical composition of bone, the main taphonomic changes in bone and the methodology for obtaining and interpreting the obtained spectra.

Fourier transformative infrared (FTIR) spectroscopy is a fast and informative technique for performing chemical analyses of different materials (Smith 1999, 1). From the archaeological standpoint, the technique is extremely interesting: it requires only small samples and is suitable for both organic and inorganic materials (Magaris 2014, 2890). Because of its wide applicability and the possibility of avoiding sample destruction, the technique is often used for analysing human or/and animal osteological remains. As it offers an insight into the state of collagen and mineral in the sample, the obtained results shed light on the taphonomic changes in bone and the influences the environment has on these changes.

FTIR spectroscopy

It is used for analysing the structure of the molecules and material characterisation. It examines the interaction between a molecule's nuclear vibrations and electromagnetic radiation – the infrared light. The infrared radiation passing through the sample is either absorbed or transmitted, creating the sample's unique molecular spectrum. The position, height and width of the peaks in the obtained spectra provide information on the presence and concentrations of the functional groups (e.g. C = O, CH₃) of molecules in the sample (Smith 1999, 15–18; Coates 2000, 3–6; Stuart 2004, 2).

There are numerous techniques of FTIR spectroscopy, of which the transmission KBr and attenuated total reflection or ATR are the most commonly used ones when dealing with archaeological finds. The former dominated in the past, while the latter is being increasingly employed today because of the possibility to analyse powdered or solid samples, the cost-effectiveness, as well as the readily comparable inter- and intra-sample results (Hollund *et al.* 2013; Beasley *et al.* 2014).

Sample preparation for the FTIR-ATR technique is relatively simple. Solid samples can be analysed directly, while for the powder analysis samples need to be ground. Before analysing the sample, the background has to

be scanned in order to eliminate the IR absorbing atmospheric gases (CO₂, water vapour) (Pavia *et al.* 2014, 25). Sample scanning is conducted by placing the sample onto the machine's diamond crystal (Figure 1) and making sure that there is good contact between the sample and the crystal (Hollund *et al.* 2013; Beasley *et al.* 2014). Scanning setting differs based on sample properties and desired accuracy. For bone, scanning uses the middle wavelength spectrum between 4000 cm⁻¹ and 400 cm⁻¹. The number of scans varies between 8 and 64, with a 2–8 cm⁻¹ accuracy (Thompson *et al.* 2009, 911; Hollund *et al.* 2013, 512; Lebon *et al.* 2016, 3). The obtained spectrum is then processed using computer programs that allow for normalisation, baseline correction and noise cleaning (Figure 2).

Bone composition and taphonomy

Bone is a composite material with a complex hierarchical structure. On the weight basis, 60% is represented by the inorganic phase, 30% by organic phase, while the remaining 10% is water. The inorganic phase is composed of mineral crystals, formed by a non-stoichiometric calcium hydroxyapatite, also known as bioapatite. The organic phase corresponds to the proteins, mainly (85–90%) type I collagen, and a series of non-collagenous proteins (NCP) and lipids (Millard 2001; Clarke 2008).

The collagen is made up of amino acids, forming left-handed alpha chains/the amino acids forming left-handed alpha chains. They are folded into a right-handed triple helical macromolecule (Ramachandran 1967, 225; Lodish *et al.* 2000, 217), maintained by the interaction and bonds between the amino acid residues of the adjacent side chains (Brodsky, Ramshaw 1997, 546). In the mineralised tissues, collagen is coated by the mineral crystals (Fratzl, Weinkamer 2007, 1276). The small, flat plate calcium phosphate crystals form the poorly crystalline, non-stoichiometric calcium hydroxyapatite Ca₃(PO₄)₃OH (Landis *et al.* 1996, 206). The crystallites have a high surface area, making them very soluble and reactive (LeGeros, LeGeros 1984; Rey *et al.* 1990, 386; Currey 2002, 6). The reactivity is further increased by a non-apatitic hydrated layer on their surface (Figure 3), containing labile and easily exchangeable ions such as CO₃, PO₄ and HPO₄ (Rey *et al.* 1990, 386; Cazalbou *et al.* 2004, 564).

After the death of an organism, skeletal elements are exposed to taphonomic changes that result either in complete degradation or in fossilisation of the bones (Hedges 2002; Jans 2005; Nielsen-Marsh *et al.* 2007; Smith *et al.* 2007). The process is highly variable and complex, controlled by the bone's intrinsic and environmental extrinsic factors (Hedges, Millard 1995; Hedges 2002; Tütken, Vennemann 2011). In general, it involves changes to the mineral and the protein phase of the bone. Both can be altered due to microbial attack, causing a loss of organic matter and a reorganisation of the mineral (Hedges 2002, 321). Alteration and loss of collagen can also occur due to the chemical hydrolysis of the peptide bonds. The process depends upon time, water availability, temperature and the pH of the surrounding environment. Usually it is slow, characteristic of geochemically stable environments (Collins *et al.* 2002, 387). Regardless of the mechanism, the collagen is reduced to soluble gelatine and leached out of the bone (Collins *et al.* 1995, 181). Consequently, the bone's physical and chemical integrity is severely affected and the bone is more vulnerable to other diagenetic processes (Hedges, Millard 1995; Jackes *et al.* 2001; Jans 2005). The alterations to the mineral occur because the bioapatite crystals are thermodynamically unstable and liable to change. Even though the microbial action can affect the mineral, most significant changes are caused by the interaction of the bone with the groundwater. The interaction causes dissolution, recrystallisation and exogenous ion absorption (Hedges, Millard 1995).

Distinctive taphonomic changes can be caused by the exposure of the bones to high temperatures. The exposure causes dehydration (100–600°C), the breakdown and loss of organic matter (300–800°C), followed by the alteration and decomposition of the mineral (500–1100°C). The changes mainly depend on the initial state (e.g. fleshed or defleshed), the method of heating, temperatures and the time of exposure (Thompson 2004, 204; Koon 2006, 31).

It is also worth knowing that collagen and mineral have an intimate relationship, providing their mutual protection, essential for long-term survival. The mineral stabilises and protects the collagen against gelatinisation and microbial attack (Nielsen-Marsh *et al.* 2000b; Collins *et al.* 2002). On the other hand, degradation and loss of the collagen cause increased porosity (Nielsen-Marsh, Hedg-

es 1999, 2000), exposing crystals to the dissolution and recrystallisation (Person *et al.* 1995; Trueman *et al.* 2004).

Analysis of the bone FTIR spectra

When analysing bone FTIR spectra, the PO₄ and CO₃ peaks of the hydroxyapatite are identifiable in the 500–700 and 900–1500 cm⁻¹ regions, the peaks corresponding to Amides I–III, A and B in the 1200–1700 and 3000–3700 cm⁻¹ regions, and the peaks characteristic of the lipids² in the 700–1800 and 2800–3000 cm⁻¹ regions. Additionally, some overlapping has to be considered. In the 500–700 cm⁻¹ region of the hydroxyapatite, a minor contribution from Amides IV–VII is present. Also, the peaks between 1300 and 1600 cm⁻¹ result from a combination of the mineral, Amides and lipids (Table 1, Figures 4–5) (Figueiredo *et al.* 2014, 322; Prinsloo *et al.* 2014, 735).

In the context of archaeological bones and their chemical composition, FTIR spectroscopy provides information on the crystallinity of the apatite (Weiner and Bar-Yosef 1990), the amount of carbonate (Wright, Schwarcz 1996), the amount of the organic matrix (Greco *et al.* 2007) and the ratio of organic to inorganic components (Trueman *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2009). Furthermore, a closer look at the peaks can reveal structural changes of the mineral and collagen (Trueman *et al.* 2004; Lebon *et al.* 2008; Chadeaux *et al.* 2009; Anastassopoulou *et al.* 2015).

Example

With the intention of presenting the usefulness of FTIR spectroscopy, fresh and archaeological sheep bone samples and bone samples exposed to different taphonomic factors were analysed; the fresh bones derived from the butcher, the archaeological bones from an archaeological site. The exposed samples were subjected to aggressive environments with a high hydrological conductivity and a low pH. For the samples altered due to high temperatures, cremated human remains from an archaeological site were used (Table 4; Figures 6–9).

The FTIR analysis of all the samples was performed in the Attenuated Total Reflectance (ATR) mode. Each sam-

² Lipids were recognized using FTIR-ATR spectroscopy but will not be discussed further as they are beyond the scope of this contribution.

ple was scanned 32 times. Infrared spectra were obtained between 400 cm^{-1} and 4000 cm^{-1} , with a spectral resolution of 4 cm^{-1} and data interval of 0.1 cm^{-1} . For each sample, the scanning procedure was repeated three times. The obtained spectra were exported into OriginPro 2016 in order to analyse and measure the heights of the peaks (Figures 10–11). Based on the peak positions, the presence of specific functional groups was determined. Peak position, height and width were examined. For more objective analyses, ratios (Table 5) were calculated.

Comparing the results obtained from the fresh samples and from the samples exposed to different taphonomic processes revealed clear differences in the collagen and mineral preservation. Due to the different absorption of the samples, the comparison of the spectra (Appendix 1) only offers a rough indication of the changes and is further examined using calculated ratios (Table 7).

Changes in the mineral show extreme losses in the low pH environment. The obtained spectrum is actually closely comparable to that of pure collagen and collagen with less than 50% of calcium phosphate (Figures 12–13). The mineral changes in the environment with a high hydraulic conductivity presented high losses of phosphates. The losses were caused by dissolution and removal of the crystals from the bone, combined with a lack of recrystallization due to water flow. The mineral in the archaeological sample was barely affected, presenting only slightly increased crystal size. Thus, a stable archaeological environment with minimal influences on the mineral dissolution and ion exchange was deduced. The spectrum of the samples exposed to high temperatures proved an exposure to temperatures above 700°C and a purification of the mineral lattice.

Furthermore, the $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ peak positions (Table 6) indicated different effects of the bone mineral, determined by the environmental factors and/or time of exposure.

Due to the loss of the mineral in the sample from the acidic environment, the collagen concentrations increased. However, the structural components of the Amide I peak presented collagen denaturation. High hydraulic conductivity caused a loss of collagen and its denaturation, which is in agreement with the loss of mineral and an interdependence between the mineral and collagen in the bone. A similar pattern is seen in the archaeological sample, where limited loss of collagen occurred. This is in accordance with only

slightly affected mineral, offering further protection to the collagen. As expected, the exposure to high temperatures caused a complete loss of collagen.

Conclusions

The contribution presents the basic methodological procedures for the FTIR-ATR spectroscopy in osteoarchaeological analyses. Even though the included examples are limited, the usefulness of the technique is clear. It offers an insight into the chemical changes in the mineral and collagen caused by different taphonomic processes. The FTIR-ATR spectroscopy is thus opening up new possibilities for studying the preservation state of the bones and their potential for further analyses (e.g. isotopic aDNA). Furthermore, understanding the taphonomic processes, FTIR-ATR spectroscopy can provide means for deducing the characteristics of the environment surrounding the bones in the past.

Literatura / References

- ANASTASSOPOULOU, J., M. KYRIAKIDOU, S. KYRIAZIS, T. H. KORMAS, A. F. MAVROGENIS, V. DRITAS, P. KOLOVOU, T. THEOPHANIDES 2015, An FT-IR Spectroscopic Study of Metastatic Cancerous Bones. – V/In: T. Theophanides (ur. / ed.), *Infrared Spectroscopy - Anharmonicity of Biomolecules, Crosslinking of Biopolymers, Food Quality and Medical Applications*, Rijeka, 89–100.
- BARTH, A. 2007, Infrared spectroscopy of proteins. – *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767 (9), 1073–1101.
- BEASLEY, M. M., E. J. BARTELINK, L. TAYLOR, R. M. MILLER 2014, Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. – *Journal of Archaeological Science* 46, 16–22.
- BERNA, F., A. MATTHEWS, S. WEINER 2004, Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window. – *Journal of Archaeological Science* 31, 867–882.
- BESHAH, K., C. REY, M. J. GLIMCHER, M. SCHIMIZU, R. G. GRIFFIN 1990, Solid state carbon-13 and proton NMR studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel. – *Journal of Solid State Chemistry* 84 (1), 71–81.
- BRODSKY, B., J. A. M. AMSHAW 1997a, The collagen triple-helix structure. – *Matrix Biology* 15, 545–554.
- BRODSKY, B., J. A. M. RAMSHAW 1997b, *The collagen triple-helix structure*. Germany.
- CAZALBOU, S., D. EICHERT, C. DROUET, C. COMBES, C. REY 2004, Minéralisations biologiques à base de phosphate de calcium. – *Comptes Rendus Palevol* 3, 563–572.
- CHADEFAUX, C., A. S. LE HÔ, L. BELLOT-GURLET, I. REICHE 2009, Curve-fitting Micro-ATR-FTIR studies of the amide I and II bands of type I collagen in archaeological bone materials. – *e-PRESERVATION Science* 6, 129–137; (<http://www.morana-rtd.com/e-preservation-science/2009/Chadefaux-04-07-2008.pdf>).
- CHANG, M. C., J. TANAKA 2002, FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. – *Biomaterials* 23, 4811–4818.
- CHI, Z., X. G. CHEN, J. S. W. HOLTZ, S. A. ASHER 1998, UV Resonance Raman-Selective Amide Vibrational Enhancement: Quantitative Methodology for Determining Protein Secondary Structure. – *Biochemistry* 37, 2854–2864.
- CLARKE, B. 2008, Normal Bone Anatomy and Physiology. – *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3, 131–139.
- COATES, J. 2000, Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. – V/In: R. A. Meyers (ur./ ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, 10815–10837.
- COLLINS, M. J., C. M. NIELSENMARSH, J. HILLER, C. I. SMITH, J. P. ROBERTS, R. V. PRIGODICH, T. J. WESS, J. CSAPÒ, A. R. MILLARD, G. TURNER WALKER 2002, The survival of organic matter in bone: a review. – *Archaeometry* 44, 383–394.
- COLLINS, M. J., M. S. RILEY, A. M. CHILD, G. TURNER WALKER 1995, A Basic Mathematical Simulation of the Chemical Degradation of Ancient Collagen. – *Journal of Archaeological Science* 22, 175–183.
- CURREY, J. D. 2002, *Bones: Structure and Mechanics*. New Jersey.
- EFREMOV, I. 1940, Taphonomy: new branch of paleontology. – *Pan-American Geologist* 74, 81–93.
- EL-BASSYOUNI, G. T., O. W. GUIRGUIS, W. I. ABDEL-FATTAH 2013, Morphological and macrostructural studies of dog cranial bone demineralized with different acids. – *Current Applied Physics* 13, 864–874.
- FARLAY, D., G. PANCZER, C. REY, P. D. DELMAS, G. BOIVIN 2010, Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. – *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28, 433–445.
- FIGUEIREDO, M., S. CUNHA, G. MARTINS, J. FREITAS, F. JUDAS, H. FIGUEIREDO 2011, Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. – *Chemical Engineering Research and Design* 89, 116–124.

- FIGUEIREDO, M. M., J. A. F. GAMELAS, A. G. MARTINS 2012, Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy. – V/In: T. Theophile, (ur./ed.), *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences*, Rijeka, 315–338.
- FRATZL, P., R. WEINKAMER 2007, Nature's hierarchical materials. – *Progress in Materials Science* 52, 1263–1334.
- GARVIE-LOK, S. J., T. L. VARNEY, M. A. KATZENBERG 2004, Preparation of bone carbonate for stable isotope analysis: the effects of treatment time and acid concentration. – *Journal of Archaeological Science* 31, 763–776.
- GONG, J. K., J. S. ARNOLD, S. H. COHN 1964, Composition of trabecular and cortical bone. – *The Anatomical Record* 149, 325–331.
- GRECU, R., V. COMAN, V. AVRAM, M. BĂCIUȚ, G. BĂCIUȚ 2007, Bone Matrices of Different Origins Studied by FTIR Spectroscopy. – V/In: S. Vlad, R. V. Ciupa (ur./eds.), *Proceedings of the 1st International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology*, Cluj-Napoca, 429–432.
- HABERMEHL, J., J. SKOPINSKA, F. BOCCAFOSCHI, A. SIONKOWSKA, H. KACZMAREK, G. LAROCHE, D. MANTOVANI 2005, Preparation of Ready-to-use, Stockable and Reconstituted Collagen. – *Macromolecular Bioscience* 5, 821–828.
- HACKETT, C. J. 1981, Microscopical Focal Destruction (Tunnels) in Exhumed Human Bones. – *Medicine, Science and the Law* 21, 243–265.
- HEDGES, R. E. M. 2002, Bone diagenesis: an overview of processes. – *Archaeometry* 44-3, 319–328.
- HEDGES, R. E. M., A. R. MILLARD 1995, Bones and Groundwater: Towards the Modelling of Diagenetic Processes. – *Journal of Archaeological Science* 22, 155–164.
- HEDGES, R. E. M., A. R. MILLARD 1995, Measurements and Relationships of Diagenetic Alteration of Bone from Three Archaeological Sites. – *Journal of Archaeological Science* 22, 201–209.
- HOLLUND, H. I., F. ARIESE, R. FERNANDES, M. M. E. JANS, H. KARS 2013, Testing an Alternative High-throughput Tool for Investigating bone Diagenesis: FTIR in Attenuated Total Reflection (ATR) Mode. – *Archaeometry* 55, 507–532.
- HULMES, D. J. 2002, Building Collagen Molecules, Fibrils, and Suprafibrillar Structures. – *Journal of Structural Biology* 137, 2–10.
- JACKES, M., R. SHERBURNE, D. LUBELL, C. BARKER, M. WAYMAN 2001, Destruction of microstructure in archaeological bone: a case study from Portugal. – *International Journal of Osteoarchaeology* 11, 415–432.
- JANS, M. M. E. 2005, *Histological characterisation of diagenetic alteration of archaeological bone*. Amsterdam.
- JANS, M. M. E., C. M. NIELSEN-MARSH, C. I. SMITH, M. J. COLLINS, H. KARS 2004, Characterisation of microbial attack on archaeological bone. – *Journal of Archaeological Science* 31, 87–95.
- KOON, H. E. C. 2006, *Detecting cooked bone in the archaeological record: a study of the thermal stability and deterioration of bone collagen*. Doktorska disertacija. Univerza v Yorku, York (neobjavljeno/unpublished).
- LANDIS, W. J. 1996, Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives. – *Connective Tissue Research* 34, 239–246.
- LANDIS, W. J., K. J. HODGENS, J. ARENA, M. J. SONG, B. F. McEWEN 1996, Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. – *Microsc Res Tech* 33, 192–202.
- LEBON, M., I. REICHE, J. J. BAHAIN, C. CHADEFAY, A. M. MOIGNE, F. FRÖHLICH, F. SÉMAH, H. P. SCHWARCZ, C. FALGUÈRES 2010, New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry. – *Journal of Archaeological Science* 37, 2265–2276.
- LEBON, M., I. REICHE, F. FRÖHLICH, J. J. BAHAIN, C. FALGUÈRES 2008, Characterization of archaeological burnt bones: contribution of a new analytical protocol based on derivative FTIR spectroscopy and curve fitting of the ν_1 ν_3 PO₄ domain. – *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 1479–1488.

- LEBON, M., I. REICHE, X. GALLET, L. BELLOT-GURLET, A. ZAZZO 2016, Rapid Quantification of Bone Collagen Content by ATR-FTIR Spectroscopy. – *Radiocarbon* 58, 131–145.
- LEGEROS, R. Z., J. P. LEGEROS 1984, Phosphate Minerals in Human Tissues. – V/In: J. O. Nriagu, P. B. Moore (ur./ed.), *Phosphate Minerals*, Berlin, 351–385.
- LESKOVAR, T. 2016, *Insight into the Diagenesis of Fresh and Archaeological Sheep bone in Three Controlled Burial Environments*. Master of Science, Univerza v Bradfordu, Bradford (neobjavljeno/unpublished).
- LODISH, H., A. BERK, S. L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, P. BALTIMORE, J. DARNELL 2000, *Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix*. New York.
- LOWENSTAM, H. A., S. WEINER, I. EBRARY 1989, *On biomineralization*. New York.
- MARGARIS, A. V. 2014, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR): Applications in Archaeology. – V/In: C. Smith (ur./ed.), *Encyclopedia of Global Archaeology*, New York, 2890–2893.
- MILLARD, A. R. 2001, Deterioration of bone. – V/In: D. Brothwell, M. Pollard (ur./ed.), *Handbook of Archaeological Sciences*, Chichester, 633–643.
- NIELSEN-MARSH, C. M., R. E. M. HEDGES 2000, Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments. – *Journal of Archaeological Science* 27, 1139–1150.
- NIELSEN-MARSH, C. M., R. E. M. HEDGES, T. MANN, M. J. COLLINS 2000, A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone. – *Thermochimica Acta* 365, 129–139.
- NIELSEN-MARSH, C. M., C. I. SMITH, M. M. E. JANS, A. NORD, H. KARS, M. J. COLLINS 2007, Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations. – *Journal of Archaeological Science* 34-9, 1523–1531.
- OLSZTA, M. J., X. CHENG, S. S. JEE, R. KUMAR, Y. Y. KIM, M. J. KAUFMAN, E. P. DOUGLAS, L. B. GOWER 2007, Bone structure and formation: A new perspective. – *Materials Science and Engineering: Reports* 58, 77–116.
- PASCHALIS, E. P., E. DiCARLO, F. BETTS, P. SHERMAN, R. MENDELSON, A. L. BOSKEY 1996, FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. – *Calcified Tissue International* 59, 480–487.
- PASTERIS, J. D., B. WOPENKA, J. J. FREEMAN, K. ROGERS, E. VALSAMI-JONES, J. A. M. VAN DER HOUWEN, M. J. SILVA 2004, Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. – *Biomaterials* 25, 229–238.
- PAVIA, D. L., G. M. LAMPMAN, G. S. KRIZ, J. R. VYVYAN 2014, *Introduction to Spectroscopy*. Stamford.
- PAYNE, K. J., A. VEIS 1988, Fourier transform infrared spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. – *Biopolymers* 27, 1749–1760.
- PETIBOIS, C., K. WEHBE, K. BELBACHIR, R. NOREEN, G. DÉLÉRIS 2009, Current trends in the development of FTIR imaging for the quantitative analysis of biological samples. – *Acta Physica Polonica-Series A General Physics* 115, 507–512.
- PRYSTUPA, D. A., A. M. DONALD 1996, Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. – *Polymer Gels and Networks* 4, 87–110.
- RAMACHANDRAN, G. N. 1967, *Treatise on collagen*. London.
- RENUGOPALAKRISHNAN, V., G. CHANDRAKASAN, S. MOORE, T. B. HUTSON, C. V. BERNEY, R. S. BHATNAGAR 1989, Bound water in collagen: evidence from Fourier transform infrared and Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopic study. – *Macromolecules* 22, 4121–4124.
- REY, C., J. L. MIQUEL, L. FACCHINI, A. P. LEGRAND, M. J. GLIMCHER 1995, Hydroxyl groups in bone mineral. – *Bone* 16, 583–586.
- REY, C., M. SHIMIZU, B. COLLINS, M. J. GLIMCHER 1990, Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phospha-

- te in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the PO_4 domain. – *Calcified Tissue International* 46, 384–394.
- SMITH, B. C. 1999, *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*. Florida.
- SMITH, C. I. 2002, *Modelling Diagenesis in Archaeological Bone*. Newcastle.
- SMITH, C. I., C. M. NIELSEN-MARSH, M. M. E. JANS, M. J. COLLINS 2007, Bone diagenesis in the European Holocene I: patterns and mechanisms. – *Journal of Archaeological Science* 34, 1485–1493.
- STUART, B. H. 2004, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Hoboken.
- SUROVELL, T. A., M. C. STINER 2001, Standardizing Infra-red Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach. – *Journal of Archaeological Science* 28, 633–642.
- THOMAS, D. B., R. E. FORDYCE, R. D. FREW, K. C. GORDON 2007, A rapid, non-destructive method of detecting diagenetic alteration in fossil bone using Raman spectroscopy. – *Journal of Raman Spectroscopy* 38, 1533–1537.
- THOMPSON, T. J. U. 2004, Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology. – *Forensic Science International* 146, S203–S205.
- THOMPSON, T. J. U., M. GAUTHIER, M. ISLAM 2009, The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. – *Journal of Archaeological Science* 36, 910–914.
- THOMPSON, T. J. U., M. ISLAM, M. BONNIERE 2013, A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. – *Journal of Archaeological Science* 40, 416–422.
- TRUEMAN, C. N. G., A. K. BEHRENSMEYER, N. TUROSS, S. WEINER 2004, Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. – *Journal of Archaeological Science* 31, 721–739.
- TÜTKEN, T., T. W. VENNEMANN 2011, Fossil bones and teeth: Preservation or alteration of biogenic compositions? – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 310, 1–8.
- WEINER, S., O. BAR-YOSEF 1990, States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey. – *Journal of Archaeological Science* 17, 187–196.
- WEINER, S., W. TRAUB 1992, Bone structure: from angstroms to microns. – *The FASEB Journal* 6, 879–885.
- WRIGHT, L. E., H. P. SCHWARCZ 1996, Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications. – *Journal of Archaeological Science* 23, 933–944.
- ZHANG, W., Z. L. HUANG, S. S. LIAO, F. Z. CUI 2003, Nucleation Sites of Calcium Phosphate Crystals during Collagen Mineralization. – *Journal of the American Ceramic Society* 86, 1052–1054.