

### 3 Methoden

#### 3.1 Die Kollagen-Gelatine-Extraktion

Für die Untersuchung der stabilen Stickstoff- und Kohlenstoffisotope wird lyophilisiertes (gefriergetrocknetes) Kollagen verwendet. Kollagen kann mittels der Gelatineextraktion aus den Knochen gewonnen werden.

Für die vorliegende Untersuchung wurden für die Analyse der stabilen Isotope meist Rippen zugrunde gelegt (vgl. Tabelle 9 bis Tabelle 11). Da es sich um eine invasive Methode handelt, bei der die Probe zerstört wird, mussten Knochen verwendet werden, die für anthropologische Untersuchungen bzw. die Bestimmung von Paläopathologien nicht so ausschlaggebend sind wie z. B. die Langknochen oder der Schädel. Wenn Rippen nicht vorhanden waren, wurde auf Teile anderer Knochen zurückgegriffen. Die Knochenproben wurden mit Hilfe einer Bügelsäge bzw. eines Tischbohrers (Hanseatic H-TBM 13-350) mit einem eigens dafür angefertigten Bohrkranz (Fa. Schütz, Berlin) entnommen.

Die ca. 3 g schwere Knochenprobe wurde zuerst mechanisch und dann im Ultraschallbad (Fa. Elma, Transsonic T420) mit destilliertem Wasser gereinigt und getrocknet. Nach dem Trocknen wurde sie zu Knochenmehl homogenisiert. Dies erfolgte zuerst manuell in einem Mörser und anschließend maschinell in einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Typ MM 200).

Die folgende Kollagen-Gelatine-Extraktion wird modifiziert nach Ambrose (1993) durchgeführt:

500 mg des entstandenen Knochenpulvers werden für die Kollagenextraktion benötigt. Auf die Einwaage (Ohaus Analysenfeinwaage Analytical Plus, AP 250 D) werden 10 ml 1 M Salzsäure (HCl) gefüllt und für 20 min auf einen Rollenschüttler (Marke IKA Vibrax VXR/VX2) gestellt. Dadurch werden sowohl die mineralische Phase als auch adsorbierte Karbonate entfernt. Danach wurde die Probe für 5 min bei 3.000 U/min zentrifugiert (Hettich Universal Zentrifuge) und bis zur Neutralität mit Aqua dest. gewaschen. Dieser Schritt erforderte ein mehrmaliges Zentrifugieren der Probe, Abfiltrieren des Überstandes mittels einer Wasserstrahlpumpe und erneutes Auffüllen der Probe mit destilliertem Wasser. Das übrig gebliebene Pellet wird mit 5 ml 0,125 M Natronlauge (NaOH) resuspendiert, aufgeschüttelt und über Nacht auf

dem Rollenschüttler inkubiert. Diese Laugenbehandlung löst Huminsäuren und Fette aus dem demineralisierten Knochen heraus. Huminsäuren reflektieren in ihrer Isotopenzusammensetzung die lokale pflanzliche Biomasse und können die Kohlenstoffisotopien von Kollagen beeinflussen. Die Kohlenstoffisotopenwerte der im Knochen enthaltenen Fette können 6-12 ‰ negativer sein als das Knochenkollagen (Ambrose 1990).

Nach ca. 20 Stunden wird die Probe abermals bei 3.000 U/min zentrifugiert, der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Diese Schritte werden bis zur Neutralität der Probe wiederholt. Sie wird dann in 5 ml 0,001 M Salzsäure (HCl) überführt und für 10 bis 17 Stunden ins Wasserbad (Fa. Memmert) gestellt, wodurch die Gelatine aufgrund der hohen Temperatur und der leicht sauren Umgebung gelöst wird. Das im Übersatz gelöste Kollagen wird durch Nutschen (Fa. Schott Duran, 100 ml) und mit Rundfiltern (MN 615, 22s, Durchmesser 5,5 cm, Dicke: 0,16 mm) ausgelegten Filternutschen (Fa. Schott Duran, 50 ml, Porosität 3) abfiltriert. Dieser Schritt ist notwendig, um fremdes organisches Material zu entfernen, welches durch Wurzelhaare, Pilzhyphen und Mikroben in den Knochen eingedrungen sein kann (Grupe & Piepenbrink 1989, Piepenbrink 1986). Die Proben werden dann in Schnappdeckelgläser überführt. Diese werden mit Alufolie verschlossen, die mit einigen Löchern versehen ist. Die durchlöchernte Alufolie dient dazu, dass beim Aufbau des Vakuums in der Gefriertrocknungsanlage (Fa. Christ, Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LDC-1M, Vakuumpumpe RZ-2) die Probe im Glas verbleibt. Nach drei bis vier Tagen des Gefriertrocknens hat das Kollagen eine helle, wattige Konsistenz.

### **3.2 Die Aminosäureanalyse**

Nach dem Gefriertrocknen des Kollagens wird es gewogen und der prozentuale Anteil am Trockengewicht errechnet. Gut erhaltenes Kollagen ergibt eine Ausbeute von mehr als 1 % (Ambrose 1993). Nach Schwarcz und Schoeninger (1991) muss jedoch eine Kollagensausbeute von 5 % vorliegen, um valide Ergebnisse aus der Isotopenanalyse zu erhalten. Ausbeuten von unter 1 % deuten auf sehr schlecht erhaltenes Kollagen hin, welches für die Analyse der stabilen Isotope nicht verwendet werden sollte. In diesen Fällen können die  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte um bis zu +15 ‰ verschoben sein (Schwarcz & Schoeninger 1991).

Für Kollagen einzigartig ist, dass es über 30 % Glycin enthält und Hydroxyprolin (Hare 1980).

Für diese Arbeit wurden Proben, die eine Ausbeute von mehr als 5 % aufwiesen ohne Güteprüfung durch die Aminosäureanalyse verwendet. Für Proben, die eine Kollagenausbeute von 1-5 % aufwiesen, wurde ein Aminosäureprofil erstellt. Es gab keine Knochenproben, bei denen die Kollagenausbeute unter 1 % lag (vgl. Kapitel 4.1.1 Die Kollagenausbeute).

Da jede Aminosäure über ein eigenes Isotopenverhältnis verfügt, kann der selektive Abbau einzelner Aminosäure das Gesamtprofil verschieben und hätte somit Auswirkungen auf die gemessenen  $\delta^{13}\text{C}_{\text{K}_0}$  und  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte (Ambrose 1993).

Zur Überprüfung des Kollagens sind folgende fünfzehn Aminosäuren herangezogen worden: Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Hydroxylysin, Lysin, Arginin, Hydroxyprolin und Prolin.

Aminosäuren im gut erhaltenen Kollagen zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus (nach Grupe 1992a und Schwarcz & Schoeninger 1991):

- 1 mg Protein soll mehr als 250 nmol Aminosäuren enthalten
- Der relative Anteil von Glycin soll ca. 33 % betragen (Grupe 1992a)
- Prolin, Hydroxyprolin und Alanin sollen zusammen ebenfalls einen relativen Anteil von etwa 33 % ergeben (Grupe 1992a)
- Der prozentuale Anteil von Prolin und Hydroxyprolin beläuft sich auf ca. 20-25 % (Schwarcz & Schoeninger 1991).

Das gemessene Aminosäureprofil wird mit einem im rezenten Knochen gemessenen (Ambrose 1993) verglichen. Die Messungen für diese Arbeit erfolgten durch die Firma aminoNova (Hennigsdorf, Berlin). Für die qualitative und quantitative Untersuchung des gefriergetrockneten Kollagens wurden ca. 500 µg des Lyophilisats eingewogen und eine Konzentrationsmessung der einzelnen Aminosäuren durchgeführt. Die Messungen wurden durch Frau Barbara Lynar durchgeführt. Als interner Standard diente Norleucin.

### 3.3 Die Karbonatextraktion

Die Aufbereitung des Knochens bis zur pulvrigen Konsistenz erfolgt analog zur Aufbereitung für die Gelatine-Kollagen-Extraktion (s. S. 39). Zur Karbonatextraktion nach Balasse et al. (1999) werden je ca. 100 mg Knochenpulver mit 5 ml 4-prozentiger NaOCl-Lösung versetzt für 2-3 Tage auf einem Rollenschüttler belassen<sup>18</sup>, um mittels Oxidation den organischen Anteil zu entfernen (Koch et al. 1997). Dann wird der NaOCl-Überstand abgenommen und die Probe mit 2100 g (3.800 U/min) zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wird bis zur Neutralität mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Proben werden nun in 5 ml 1 M Essigsäure-Kalzium-Acetat-Puffer (pH 4,75) resuspendiert und abermals einen halben Tag auf dem Rollenschüttler belassen. Die Zugabe des Puffers soll aus dem Umgebungssediment des Knochens adsorbierte Karbonate entfernen, welche die Isotopie des strukturellen Karbonats verändern könnten, da jene negativere Kohlenstoffwerte aufweisen als das strukturelle Karbonat (Lee-Thorp & van der Merwe 1991, Lee-Thorp 1989 et al.). Danach wird wiederum zentrifugiert bis zur Neutralität gewaschen und das Pellet mit wenig Wasser in Schnappdeckelgläser überführt. Anschließend werden die Proben drei bis vier Tage gefriergetrocknet. Danach wurde das Karbonat in Eppendorf-Cups eingewogen und mit offenem Deckel mehrere Stunden bei 50 °C in den Trockenschrank gestellt, um auf diese Weise das „Störgeräusch“<sup>19</sup> durch das Wasser bei der folgenden Messung im Massenspektrometer zu verringern.

### 3.4 Die Messung der stabilen Isotope

Vor der Messung der stabilen Isotope aus dem Kollagen muss die Güte durch das molare C/N-Verhältnis bestimmt werden. Charakteristisch für Kollagen ist ein Wert um 3,0 (DeNiro 1985). Kollagen mit Werten zwischen 2,9 und 3,6 kann für die Analyse von stabilen Isotopen verwendet werden. Auch der Anteil des Kollagens am Trockengewicht des Knochens kann Aussagen über die Güte geben. In rezenten Knochen macht die organische Komponente einen Anteil von 20 % - 25 % aus (Fizet

---

<sup>18</sup> Die Probe sollte auf dem Rollenschüttler belassen werden, bis keine Bläschenbildung mehr zu beobachten ist. Bei manchen Proben muss nach einem Tag das NaOCl gewechselt werden.

<sup>19</sup> ein störender Hintergrund durch den in Wassermolekülen enthaltenen Sauerstoff

et al. 1995, Hare 1980). Kollagen enthält ca. 90 % der organischen Matrix (Hare 1980). Kollagenausbeuten von über 5 % sind notwendig, um sie für die Analyse der stabilen Isotope zu nutzen (Schwarcz & Schoeninger 1991).

Die Einwaage der gefriergetrockneten Proben erfolgte selbstständig am Geo-ForschungsZentrum Potsdam. Die Kollagenproben wurden in Zinnkapseln eingewogen. Die Messung der stabilen Isotope erfolgte im Massenspektrometer<sup>20</sup> (Fa. Finnigan, DELTAplusXL, Carlo-Erba CN2500-Elementanalytiker) des Geo-ForschungsZentrum Potsdam durch Frau Dr. Birgit Mingram. Zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Kollagens werden gasförmige kalibrierte Laborstandards benötigt: IAEA (International Atomic Energy Agency) Standards CH-7 (eine Polyethylenfolie) und USGS24 für  $\delta^{13}\text{C}_{\text{K}_0}$  und IAEA N1 (ein Ammoniumsulfat) für  $\delta^{15}\text{N}$ . Für  $\delta^{13}\text{C}_{\text{K}_a}$  und  $\delta^{18}\text{O}$  dienen folgende Materialien zur Referenz: IAEA CO8, CO1 und Marmor. Die Isotopenzusammensetzung dieser Referenzmaterialien ist bekannt. So wird die Vergleichbarkeit der Werte untereinander und mit den Werten anderer Labors gewährleistet.

Die analytische Präzision betrug für  $\delta^{13}\text{C}_{\text{K}_0}$  und  $\delta^{15}\text{N} < 0,2 \text{ ‰}$  und für C und N  $< 5 \text{ ‰}$  (pers. Mitteilung Mingram). Für die Isotopenverhältnisse im Karbonat werden folgende Laborstandards benötigt: VPDB<sup>21</sup> für  $\delta^{13}\text{C}$  und NBS19 für  $\delta^{18}\text{O}$ . Die analytische Präzision liegt hier jeweils bei unter  $0,01 \text{ ‰}$  (pers. Mitteilung Mingram).

Da die schweren Isotope nur einen geringen Anteil eines Elements ausmachen, wird nicht die absolute Menge des schweren Isotops bestimmt, sondern das Verhältnis von schwerem und leichtem Isotop in der Probe gegenüber diesem Verhältnis in einem Standard angegeben (McKinney et al. 1950).

---

<sup>20</sup> Die Messung im Massenspektrometer macht sich die unterschiedliche Masse von Elementen und ihren Isotopen zunutze. Die zu untersuchende Probe muss dazu gasförmig und ionisiert vorliegen. Die Ionisation kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen. Bei der Untersuchung organischer Proben wird meist die Elektronen-Ionisation angewendet (Rameckers 1994). Die Ionen werden in ein homogenes gebogenes Magnetfeld (Analytiker) gegeben und dort entsprechend ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis abgelenkt. Leichte Ionen werden stärker abgelenkt als schwere. Die unterschiedlich weit abgelenkten Ionen können durch einen Detektor registriert und so die chemische Struktur der Probe bestimmt werden.

<sup>21</sup> Vienna-PDB, ein vergleichbares Standardmaterial zum PDB (vgl. Fußnote 22)

Konventionsgemäß wird die Konzentration der stabilen Kohlenstoffisotope als Verhältnis des schweren zum leichten Kohlenstoffisotop ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in der Probe gegen dieses Verhältnis im Standard, den Peedee-Belemniten (PDB)<sup>22</sup> (Craig 1957), angegeben:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Probe}} = [({}^{13}\text{C}_{\text{Probe}}/{}^{12}\text{C}_{\text{Probe}} / {}^{13}\text{C}_{\text{PDB}}/{}^{12}\text{C}_{\text{PDB}}) - 1] \times 1000 \text{ [‰]}$$

Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert ist für die in dieser Arbeit untersuchten Proben negativ, da die Proben im Vergleich zum Standard PDB weniger schweren Kohlenstoff  $^{13}\text{C}$  enthalten.

Analog zum Kohlenstoff wird die Konzentration der stabilen Stickstoffisotope als Verhältnis des schweren zum leichten Stickstoffisotop ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) in der Probe gegen dieses Verhältnis im Luftstandard (AIR, Ambient Inhalable Reservoir) (Mariotti 1983) angegeben:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{Probe}} = [({}^{15}\text{N}_{\text{Probe}}/{}^{14}\text{N}_{\text{Probe}} / {}^{15}\text{N}_{\text{AIR}}/{}^{14}\text{N}_{\text{AIR}}) - 1] \times 1000 \text{ [‰]}$$

Die Luft hat definitionsgemäß einen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von 0 ‰.

Die Isotopenverhältnisse im Karbonat werden relativ gegen PDB in der konventionellen Delta-Notation ( $\delta^{18}\text{O}$  bzw.  $\delta^{13}\text{C}$ ) dargestellt. So gilt für  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Ka}}$  die gleiche Formel wie für  $\delta^{13}\text{C}$  des Kollagens. Für  $\delta^{18}\text{O}$  gilt folgende Formel:

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{Probe}} = [({}^{18}\text{O}_{\text{Probe}}/{}^{16}\text{O}_{\text{Probe}} / {}^{18}\text{O}_{\text{PDB}}/{}^{16}\text{O}_{\text{PDB}}) - 1] \times 1000 \text{ [‰]}$$

Die positiven  $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der Proben zeigen an, dass in den Proben mehr vom schweren Sauerstoffisotop enthalten ist als in dem Luftstandard.

Vor der Messung aller Proben wurden von insgesamt 41 Kollagenproben Mehrfachmessungen gemacht. Diese ergaben für  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Ko}}$  und  $\delta^{15}\text{N}$  Standardabweichungen von ca. 0,3 ‰ (vgl. Tabelle 15, Tabelle 17 und Tabelle 19). Diese ist nur wenig höher als der analytische Messfehler. Gleiches gilt für die relativen Kohlenstoff- und Stickstoffanteile im Kollagen. Bei diesen beträgt der analytische Fehler unter 5 ‰. Für alle drei Bevölkerungen wurde ein Fünftel der Proben mehrfach gemessen und im Durchschnitt geringere Standardabweichungen ermittelt (s. Tabelle 16, Tabelle 18 und

---

<sup>22</sup> Die PeeDee-Formation in South Carolina enthält einen Kalk des *Belemnitella americana* eines Belemniten, der am Ende der Kreidezeit ausstarb. Die Belemniten gehören zur Klasse der Kopffüßer und werden auch Donnerkeile oder Teufelsfinger genannt.

Tabelle 20). Daher erfolgten für die restlichen Proben Einfachmessungen. Für die Proben, bei denen Mehrfachmessungen durchgeführt wurden, ging ein aus diesen Werten errechneter Mittelwert in die Ergebnisse ein.

### **3.5 Die Aufbereitung der Proben für die Spurenelementanalyse**

Konventionsgemäß erfolgt die Entnahme von 2 g Knochenkompakta aus der Diaphyse des Femur (Grupe 1992a) mittels eines Tischbohrers bzw. einer Bügelsäge. Bei einem Teil der Knochen wird ein separates Probenstück für die spätere Einbettung in Kunstharz und der histologischen Überprüfung der Knochenbinnenstruktur im Dünnschliffpräparat (vgl. Kapitel 3.8.1 Die Anfertigung der Knochendünnschliffe, S. 48) entnommen. Der für die Analyse bestimmte Probenteil wird, um anhaftendes Sediment zu entfernen, im Ultraschallbad mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Spongiosareste werden – sofern sie in der Markhöhle noch vorhanden sind - manuell entfernt. Es folgt eine vierstündige Ätherextraktion im Soxhlet (Fa. Schott-Duran), um organische Bestandteile wie z. B. Fette aus dem Knochen herauszulösen. Zur Entfernung von Kontaminationen der Oberfläche und möglicher liegezeitbedingter Rekristallisationsprodukte aus den Hohlräumen der Knochen wird die Probe anschließend ca. 5 min mit konzentrierter Ameisensäure (HCOOH) im Überschuss geätzt. Danach erfolgt ein mehrmaliges Spülen im Ultraschallbad mit Aqua dest., welches der quantitativen Entfernung der Lösungsprodukte dient. Die Lösung der Rekristallisationsprodukte erfolgt durch die aufsteigende pH-Reihe. Durch das Waschen wird nach einer sukzessiven Abnahme der Elementkonzentrationen ein stabiles Konzentrationsniveau erreicht. (vgl. Grupe & Bach 1993, Grupe 1992a). Nach dem Waschen wird die Probe bis zur Gewichtskonstanz bei 50 °C getrocknet.

Zur Entfernung des organischen Anteils wird die Probe für 12 Stunden im Muffelofen (Heraeus Labor-Muffelofen, M 104, Fa. Kendro Laboratory Products) bei 500 °C verascht und nachfolgend manuell homogenisiert. Das Veraschen verhindert auch eine Verflüchtigung der analyserelevanten Elemente sowie thermische Modifikationen der mineralischen Matrix. Vor und nach dem Veraschen wurde ein Großteil der Proben gewogen, um zu überprüfen, ob das Verhältnis von organischem zu mineralischem Anteil dem in rezenten Knochen (ca. 30:70) entspricht (vgl. Kapitel 9.9 Ergebnisse der Ausbeute des anorganischen Anteils für die

Spurenelementmessungen, Tabelle 28 - Tabelle 30). Abweichende Verhältnisse können durch die Bodenlagerung bedingt sein. Sie geben neben der histologischen Untersuchung zusätzliche Informationen über den Erhaltungszustand des Knochens.

100 mg homogenisiertes Knochenpulver werden für den Druckaufschluss benötigt. Der Aufschluss erfolgt im Trockenschrank (Fa. Memmert) in 1 ml konzentrierter suprapurer Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) in einer speziellen Druckaufschlussapparatur (Fa. Seif) für sechs Stunden bei 160 °C. Nach dem Aufschluss ist die Probensubstanz vollständig in der Säure gelöst. Der Aufschluss wird mit 5 ml Aqua dest. aufgefüllt und in Polyethylengefäßen tiefgefroren aufbewahrt<sup>23</sup>. Um zu überprüfen, ob die chemische Zusammensetzung einer Probe durch den Druckaufschluss verändert wird, wurde in regelmäßigen Abständen ein Standard (Bone Ash 1400) bekannter chemischer Zusammensetzung mit aufgeschlossen und gemessen (vgl. auch 3.6 Die Messung der Spurenelemente).

Des Weiteren werden zum Vergleich skelettnahe Bodenproben untersucht, (vgl. Kapitel 3.7 Die Aufbereitung und Analyse der Bodenproben).

Aufgrund der Kontaminationsgefahr ergaben sich Anforderungen an die spurenanalytische Reinheit aller im Labor verwendeten Gegenstände. Deshalb wurden alle für die Probenaufbereitung benutzten Glasgefäße mit 65 %-iger Salpetersäure ausgedämpft. Der Benutzung aller Kunststoffmaterialien ging eine Reinigung mit 2 %-iger Salpetersäure im Ultraschallbad voraus. Jegliche Gefäße zur Aufbewahrung wurden ebenso behandelt. Den Abschluss der Reinigung bildete stets das Spülen der Gegenstände in Aqua dest. und die Trocknung bei 50 °C.

---

<sup>23</sup> Die Haltbarkeit verlängert sich so von wenigen Wochen in nicht gefrorenem Zustand auf 1-1,5 Jahre (Grupe & Bach 1993).



### 3.6 Die Messung der Spurenelemente

Die Messung der Spurenelemente erfolgt durch die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)<sup>24</sup> Es werden folgende Elemente gemessen: Kalzium (Ca), Barium (Ba), Strontium (Sr), Kupfer (Cu), Zink (Zn), Blei (Pb), Arsen (As), Cadmium (Cd), Eisen (Fe), Magnesium (Mg), Mangan (Mn), Nickel (Ni), Aluminium (Al), Kobalt (Co) und Phosphor (P). Dabei gelangen je nach zu erwartendem Gehalt und der Empfindlichkeit des zu messenden Elementes die ICP- (Inductive Coupled Plasma), die Graphitrohr- bzw. die Flammen-AAS zur Anwendung (s. Tabelle 27, Seite 308). Die Elemente Al, Ba, Cu, Fe, Mg, Mn, Sr und Zn wurden vor der Messung 1:5 verdünnt. Für die Messung von Ca und P wurde vor der Messung eine Verdünnung von 1:1000 hergestellt. Zur Messung von Cd, Co, Ni und Pb wurde eine 1:10 verdünnte Lösung hergestellt. As wurde mittels einer Fließinjektion gemessen und musste nicht verdünnt werden.

Um die Vergleichbarkeit der Werte untereinander zu gewährleisten wurden mit den aufbereiteten Proben Referenzmaterialien (Bone Ash 1400) bekannter Spurenelementzusammensetzung zur Messung gegeben. Da die Messung des Referenzmaterials mit der angegebenen Zusammensetzung übereinstimmte, kann davon ausgegangen werden, dass die Proben bei der Aufbereitung bzw. Messung nicht kontaminiert wurden.

Die Messungen der Spurenelemente erfolgten durch Frau Elke Heyde am Institut für Geologische Wissenschaften der Freien Universität Berlin.

### 3.7 Die Aufbereitung und Analyse der Bodenproben

Von jeder der drei untersuchten Serien wurde eine Bodenprobe genommen, um sie auf die auch in den Knochen gemessenen 15 Elemente zu untersuchen (vgl. Kapitel 3.6 Die Messung der Spurenelemente). Dazu wurden 281 mg des Tasdorfer, 313 mg

---

<sup>24</sup> Die AAS macht sich die Aufnahme optischer Strahlung durch die Atome zunutze: Die Atome der zu messenden Substanzen werden durch Licht bestimmter Wellenlängen in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Es wird umso mehr Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert, je größer die Anzahl der Atome des zu bestimmenden chemischen Elements ist. Über die Schwächung, also Extinktion, des Lichtstrahles kann auf die Konzentration des absorbierenden Stoffes geschlossen werden (Welz 1983).

des Brandenburger und 308 mg des Anklamer Bodens eingewogen und unter Druck in Königswasser gelöst. Der gewonnene Aufschluss wurde je nach eingewogener Menge mit einer entsprechenden Menge Aqua dest. aufgefüllt und die Spurenelemente entsprechend den Knochenproben gemessen.

Die Herstellung der Aufschlusslösung sowie die Messungen der Spurenelemente führte Frau Elke Heyde am Institut für Geologische Wissenschaften der Freien Universität Berlin durch.

### **3.8 Die Histologie**

Die Anfertigung von Dünnschliffen erfolgte nur exemplarisch für einen Teil der ausgewählten Individuen. Es handelt sich hierbei um eine invasive Methode, die am Knochen deutliche Spuren hinterlässt (ein Loch von ca. 1-2 cm Durchmesser). Daher wurde sie nicht generell für alle Proben durchgeführt.

Die Histologie eines Knochens gibt Aufschlüsse über den Erhaltungszustand des Knochens und dient somit der Überprüfung der Güte. So kann zum Beispiel die Erhaltung eines Knochens danach unterschieden werden, ob noch einzelne Osteone in der Knochenbinnenstruktur erkennbar sind, Tunnel, die auf Mikroorganismen hinweisen und Ablagerungen, z. B. durch Huminstoffe, vorhanden sind.

Nach Fabig (2002) ist die Histologie eines Knochens eines der wichtigsten Kriterien der Auswahl der Knochen für die Analyse der Spurenelemente. Allerdings wurde diese Arbeit konzipiert bevor Fabig seine Ergebnisse veröffentlichte. Als Gütekriterium wurde der Ca/P-Quotient im Knochen angesetzt (vgl. Kapitel 5.1 Problematik der Diagenese).

#### 3.8.1 Die Anfertigung der Knochendünnschliffe

Für diese Arbeit wurden nur histologische Schliffe von menschlichen Langknochen analysiert. Die Proben wurden den Knochen mit Hilfe des Tischbohrers bzw. einer Bügelsäge entnommen und auf ein Format von ca. 1 cm Kantenlänge zurechtgesägt. Die Schnitte wurden parallel zur Ebene des späteren Schliffes ausgeführt.

Dann erfolgte die Einbettung des Knochenstücks in Harz, damit beim Sägen und Schleifen des Knochens keine größeren Teile der Oberfläche mehr entfernt werden bzw. keine Veränderungen an der Knochenbinnenstruktur eintreten konnten. Vor der Einbettung in das Zweikomponentenharz Reckli Injektionsharz EP<sup>®</sup>, welches im

Verhältnis 3:1 (Harz:Härter) gemischt werden muss, wurde das Knochenstück von Fett befreit und getrocknet. Die Proben wurden so eingebettet, dass die Haverschen Kanäle senkrecht orientiert waren. Diese Orientierung ermöglichte die Verdrängung der noch in den Haverschen Kanälen befindlichen Luft durch das die Kanäle aufsteigende Harz. Somit waren die Schlitze frei von störenden Luftblasen.

Nach dem Aushärten wurde die in Harz eingebettete Knochenprobe mittels einer Kreissäge (Fa. Conrad, *WOCO50*<sup>®</sup>) auf eine an den gewählten Objektträger (Fa. Menzel, 50 x 50 mm, Stärke 1,2-1,5 mm) angepasste Größe geschnitten. Anschließend wurde der eingebettete Knochen nahe der Dünnschliffebene durchgeschnitten. Die neue entstandene Oberfläche der Dünnschliffebene wurde nun glattgeschliffen, um alle Rillen, die durch das Sägen entstanden sein konnten, zu entfernen. Das Schleifen erfolgt auf einer Schleifmaschine (Fa. GMN, *MPS 2 120*<sup>®</sup>), auf der die zu schleifenden Präparate mittels einer Magnethalterung befestigt waren. Nach dem Schleifen wurden Präparat sowie Objektträger sorgfältig mit Aceton und einem staubfreien Tuch entfettet und dann die Probe auf den Objektträger geklebt. Das vorherige Entfetten ist nötig, da das Kühlwasser der Schleifmaschine mit einem ölhaltigen Korrosionsschutz versetzt ist, der beim Schleifen das Präparat benetzt. Der Kleber (Fa. Sikora, *Körapox 439*<sup>®</sup> Mischung Harz:Härter im Verhältnis 2:1) musste nun über Nacht unter einer Federpresse aushärten. Nach dem Aushärten des Klebers wurde der Objektträger von Kleberresten befreit und auf der Vakuumpalte der Schleifmaschine so lange geschliffen bis das Präparat leicht durchsichtig erschien. Beim Schleifen wurde zwischendurch die Dicke des Präparats mit einer Mikrometerschraube kontrolliert, da der Dünnschliff eine Dicke von 50-70 µm aufweisen sollte. Ferner wurde auch mikroskopisch untersucht, ob die noch vorhandene Knocheninnenstruktur gut sichtbar ist. Nachdem der Dünnschliff erfolgt ist, wurde das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt, welches mit ebenfalls mit *Körapox 439*<sup>®</sup> aufgeklebt wurde.

### 3.8.2 Die Anfertigung der Bilder

Die Dünnschliffe wurden durch ein Olympus Vanox Mikroskop unter verschiedenen Vergrößerungen (Lupe bis 100fache Vergrößerung) betrachtet. Die Bilder wurden mittels einer auf dem Mikroskop befestigten Kamera (Olympus C-35AD) gemacht. Um den Auslöser nicht direkt an der Kamera betätigen zu müssen, wurde die Kamera

an ein „Exposure Control Unit“ angeschlossen, an welchem die Einstellungen automatisch vorgenommen wurden und das Auslösen erfolgte.

Für das Erstellen der Bilder wurde ein Kunstlichtfilm E6 benutzt. Die entstandenen Dias wurden mittels eines Scanners (Fa. UMAX, PowerLook 1120) digitalisiert.

### **3.9 Statistische und graphische Auswertung**

Bis auf die Rohdaten der Aminosäureanalyse, die von der Fa. aminoNova in Papierform übermittelt wurden, lagen sämtliche Messergebnisse in digitalen Tabellen (Microsoft Excel Premium 2000) vor. Alle Rohdaten wurden für jede der drei Skelettserien in jeweils eine Tabelle eingearbeitet, in welcher für jedes Individuum alle Werte vorlagen. Diese MS Excel-Tabellen war die Grundlage für die Erstellung der graphischen Abbildungen. Sie wurden in das genutzte Statistik-Programm (SPSS 12.0) eingepflegt. Diese Tabellen waren ihrerseits die Grundlage für die statistischen Auswertungen.

Zuerst wurden die Werte sämtlicher Variablen und untersuchten Untergruppen mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Wird bei diesem Test eine Signifikanz festgestellt, weicht die empirische Verteilung innerhalb der untersuchten Variablen signifikant von der Normalverteilung ab. Da dies bei der vorliegenden Untersuchung in allen Tests der Fall war, wurde bei den Tests der Ergebnisse auf Signifikanz immer der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wird überprüft, ob zwei unabhängige Gruppen aus derselben Population stammen oder nicht. Dazu müssen die Daten mindestens auf dem Ordinalniveau vorliegen. Er stellt eine brauchbare Alternative zum t-Test dar.

Für alle Tests ist als Signifikanzniveau 5 % festgelegt worden. Die Überschreitungswahrscheinlichkeiten werden von  $p \leq 0,05$  (signifikant) über  $p \leq 0,01$  (hoch signifikant) bis  $p \leq 0,001$  (höchst signifikant) angegeben. Werte, die kleiner als  $p \leq 0,001$  sind, werden ebenfalls als  $p \leq 0,001$  aufgeführt.

Phosphor wird nur für die Berechnung des Ca/P-Quotienten genutzt, Kalzium für die Berechnung des Ca/P-, Sr/Ca- und Ba/Ca-Quotienten. Kalzium und Phosphor werden nicht separat graphisch dargestellt. Die Abbildungen für die Ergebnisse für Nickel und Kobalt werden nur im Anhang aufgeführt und nicht diskutiert.