

3 Methoden

3.1 Kollagen-Gelatine-Extraktion

Mit der Kollagen-Gelatine-Extraktion kam eine invasive Methode zur Anwendung. Dem Knochen wurde eine für Fragestellungen hinsichtlich der Morphologie entbehrliche Stelle mittels einer Bügelsäge, bzw. eines Tischbohrers (Hanseatic H-TBM 13-350) und eines eigens dafür angefertigten Bohrkranzes (Fa. Schütz, Berlin) abgetrennt. Das Gewicht einer solchen Probe sollte etwa zwei bis drei Gramm betragen. Die überwiegend aus Kompakta bestehenden Knochenproben wurden zunächst mechanisch, unter fließendem Wasser, dann im Ultraschallbad (Fa. Elma, Typ MM 200) in destilliertem Wasser gereinigt und anschließend zuerst per Hand mittels eines Mörsers und dann mit Hilfe einer Schwingmühle (Fa. Retsch, Typ MM 200) homogenisiert.

Es wurden jeweils ca. 500 mg Knochenpulver (Ohaus Analysenfeinwaage Analytical Plus, AP 250 D) eingewogen und anschließend folgende Extraktionsschritte durchgeführt (modifiziert nach AMBROSE 1993):

Zunächst erfolgte eine 20-minütige Extraktion in 10 ml 1M HCl auf dem Rollenschüttler (Marke IKA-Vibrax-VXR). Dieser Schritt dient dem Herauslösen der mineralischen Phase des Knochens und des absorbierten Karbonats. Anschließend wurde der Ansatz für fünf Minuten bei 300 rpm zentrifugiert und mit destilliertem Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Danach wurde das Pellet in 10 ml 0,125M NaOH überführt, wobei der Probenansatz für 20 Stunden auf dem Rollenschüttler blieb. Durch diese Behandlung werden Huminsäuren aus dem Substrat gelöst. Hiernach wurde erneut zentrifugiert und bis zur Neutralität gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit 10ml 0,001 M HCl versetzt und 10 bis 17 Stunden bei 90°C im Wasserbad (Fa. Memmert) inkubiert. Durch die hohe Temperatur und das leicht saure Milieu wird das Kollagen als Gelatine aus dem verbleibenden Pellet herausgelöst. Danach wurde das in Lösung befindliche Kollagen über Nutschen (Fa. Schott Duran, 100 ml) und Filternutschen (Fa. Schott Duran, 50 ml, Porosität 3), die zusätzlich mit Rundfiltern (MN 615, 22s, Durchmesser 5,5 cm, Dicke: 0,16 mm) versehen sind, in Schnappdeckelgläser überführt. Dieser Schritt dient der Entfernung organischer Substanz-Partikel. Die Gläschen wurden mit Alufolie abgedeckt und mit einigen Löchern versehen. Anschließend wurde das Kollagen in Lösung drei bis vier Tage lyophilisiert (Fa. Christ, Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LDC-1M, Vakuumpumpe RZ-2), bis es die erforderliche weiße, wattige Konsistenz erreichte.

3.2 Aminosäureanalyse

Kollagen vom Typ I ist der hauptsächliche Bestandteil des Knochens. Ein selektiver Verlust von Aminosäuren, der eventuell auch die Isotopenmessungen beeinträchtigen kann, wird durch die Qualitätskontrolle mittels der Aminosäureanalyse erkannt. Jede Aminosäure hat eigene Isotopenverhältnisse. Somit hat ein signifikanter Abbau einer oder mehrerer Aminosäuren Auswirkungen auf die δC - und δN -Werte des Kollagens eines Individuums.

Aminosäuren (AS) sind aliphatische oder aromatische Verbindungen, deren physikalisch-chemisches Verhalten ebenso wie ihr umfangreiches Reaktionsvermögen auf die gleichzeitige Anwesenheit einer basischen Aminogruppe ($-\text{NH}_2$) und einer sauren Carboxylgruppe ($-\text{COOH}$) zurückzuführen ist. Weitere funktionelle Gruppen wie zusätzliche Amino- oder Carboxylgruppen, Hydrox-, Mercapto- und Aminocarbonylgruppen, sowie heterocyclische, aliphatische und aromatische Substituenten verleihen den AS vielfältige Eigenschaften. Als proteinogen werden diejenigen 20 AS bezeichnet, für die im genetischen Code die Information zur Biosynthese vorhanden ist.

Die Aminosäureanalyse wurde durchgeführt, um einen Überblick über die Qualität des Kollagens zu gewinnen. Diese ist im Hinblick auf die Untersuchung der stabilen Stickstoffisotope von eminenter Bedeutung, da stark degradiertes Kollagen die Isotopieverhältnisse verändert und damit zu falschen Schlussfolgerungen führen kann (BALZER ET AL., 1997; TURBAN-JUST, 1997). Bodenlebende Bakterien, die zu einem großen Teil am Abbau des Knochens beteiligt sind, besitzen Enzyme (Kollagenasen), die das menschliche Kollagen abbauen können. Während dieses Abbaus werden Peptidbindungen gespalten und ein Teil des im Kollagen enthaltenen Stickstoffs wird von den Bakterien aufgenommen. GRUPE und TURBAN-JUST (1998) stellten fest, dass dabei vorzugsweise das schwerere Stickstoffisotop im Knochen zurückbleibt und damit die Isotopie des gesamten verbleibenden Kollagens um bis zu 5,8 ‰ angereichert wird.

Auch der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert kann sich durch starke Dekomposition verändern, da Bakterien aus energetischen Gründen bevorzugt Aminosäuren mit mehr als 5 Kohlenstoffatomen oder z.B. auch Alanin, welches ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand ist, abbauen. Weil die unterschiedlichen Aminosäuren sehr variable $\delta^{13}\text{C}$ -Werte besitzen, führt dieser selektive Verlust bestimmter Aminosäuren zu einer Veränderung des gesamten Isotopieverhältnisses des Kollagens (AMBROSE, 1993 vgl. auch FOGEL & TUROSS, 2002).

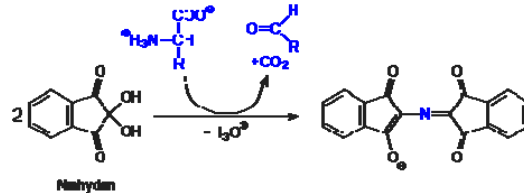
Für diese Arbeit wurden nur makro- und mikroskopisch gut erhaltene Knochen ausgewählt (vgl. 3.5 Histologie, Seite 33). Da alle Proben ein C/N-Verhältnis zwischen 2,9 und 3,6 aufwiesen, wurden für die Aminosäureanalyse nur diejenigen Kollagenproben ausgewählt, die zwischen 1 und 5 % Lyophilisat-Ausbeute lagen. Laut AMBROSE (1993) besitzt gut erhaltener Knochen mehr als 1 % Kollagen Ausbeute im

METHODEN

Verhältnis zu seinem Trockengewicht. Proben, die über 5 % Ausbeute ergaben, wurden ohne nochmalige Qualitätskontrolle durch die Aminosäureanalyse für die Auswertung verwendet. Laut SCHWARCZ und SCHOENINGER (1991) können Knochenproben, die einen Proteinanteil unter 5 % zeigen trotzdem für die Untersuchungen der stabilen Isotope geeignet sein, wenn eine kollagentypische Zusammensetzung an Aminosäuren festgestellt werden kann. Lediglich ein Anteil unter 1 % lasse auf ein für diese Untersuchungen ungeeignetes Kollagen schließen, da sich die $\delta^{15}\text{N}$ -Werte unter diesen Bedingungen um bis zu +15 ‰ verschieben können.

Kollagen Typ I ist bei allen Säugetieren identisch aufgebaut (BALZER ET AL., 1997; HARE, 1980), daher waren keine gravierenden Unterschiede bei den humanen und tierischen Proben zu erwarten.

Bei der Nachsäulenderivatisierung erfolgt die Markierung der AS, nachdem die chromatographische Trennung erfolgt ist. Die Markierung erfolgte mit dem Reagenz Ninhydrin, das mit primären AS zu einem violetten Komplex, dem sog. Ruhemanns Purpur, reagiert und bei einer Wellenlänge von 570 nm detektierbar ist. Die sekundären AS (z.B. Prolin und Hydroxyprolin) reagieren ebenfalls mit Ninhydrin – dieser Farbkomplex wird bei einer Wellenlänge von 440 nm detektiert. Die nachfolgende Grafik stellt die Reaktion vereinfacht dar:



Die aufgetrennten und derivatisierten AS wurden im Photometer bei den o.g. Wellenlängen quantitativ bestimmt. Die Absorptionwerte werden entlang einer Zeitachse als Chromatogramm dargestellt. Die Flächenwerte der einzelnen Peaks sind proportional zur Menge des absorbierenden Derivates. Diese Flächenwerte werden mit den Flächenwerten eines Standardchromatogramms verglichen, in dem definierte Mengen aller AS aufgetrennt sind und nach dem das System kalibriert ist.

Nachfolgende Grafik gibt ein stark vereinfachtes Fließschema der Nachsäulenderivatisierung mit dem A200 wieder:

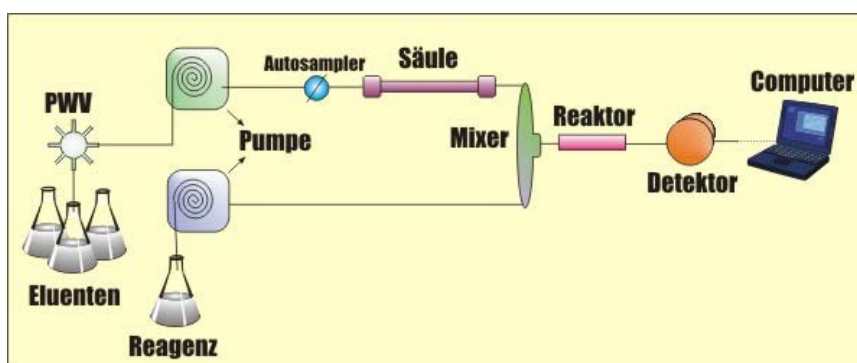


Abbildung 11: Stark vereinfachtes Fließschema der Analyse mit dem A200 (mit freundlicher Genehmigung der Firma aminoNova).

Beim A200 werden die Eluenten-, Wasch- und Regenerationspuffer über ein Pufferwahlventil (PWV) zur Doppelkolbenpumpe gefördert. Die Pumpe befördert ebenfalls das Ninhydrin-haltige Reagenz. Über den Autosampler wird die zu analysierende Probe dem System zugeführt. Nachdem sie die Trennsäule passiert hat, wird das Eluat mit dem Ninhydrin-Reagenz gemischt (Mixer) und im Reaktor bei 120°C zur Farbreaktion gebracht. Die Absorption wird im Detektor gemessen und die Daten in einem Computer verarbeitet.

Die Analyse der Aminosäuren wurde von Frau BARBARA LYNAR von der Firma aminoNova in Hennigsdorf durchgeführt.

3.3 Karbonat-Extraktion

Die Vorbehandlung der Knochen, einschließlich der Homogenisierung, ist im Rahmen unter 3.1 Kollagen-Gelatine-Extraktion, Seite 28 beschrieben.

Jeweils ca. 100 mg Knochenpulver wurden folgenden Extraktionsschritten unterzogen (modifiziert nach BALASSE ET AL., 1999): Extraktion in 5 ml NaOCl-Lösung („Chlorbleiche“) auf dem Rollenschüttler, bis keine Bläschenbildung mehr zu erkennen ist. Die Behandlung sollte insgesamt zwei bis drei Tage dauern, eventuell musste nach einem Tag das NaOCl gewechselt werden. Dieser Schritt dient zum Entfernen des organischen Anteils mittels Oxidation (KOCH ET AL., 1997). Anschließend wurde das Knochenpulver für jeweils fünf Minuten bei 2100 g zentrifugiert und mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Danach wurde das Pellet in 5 ml 1M Ca-Acetat-Essigsäure-Puffer (pH 4,75) überführt und der Extraktionsansatz für ca. fünf Stunden auf dem Rollenschüttler belassen. Durch diese Behandlung wird adsorbiertes Karbonat entfernt (LEE-THORP & VAN DER MERWE, 1991). Nach diesem Schritt wurde wieder zentrifugiert und bis zur Neutralität gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit wenig Wasser in Schnappdeckelgläser überführt und drei bis vier Tage lyophilisiert. Danach wurden sie in Eppendorf-Cups eingewogen und mit offenem Deckel mehrere Stunden bei 50°C in den Trockenschrank gestellt. Auf diese Weise wird das „Störgeräusch“ durch das

Wasser, ein störender Hintergrund durch den in Wassermolekülen enthaltenen Sauerstoff, bei der Massenspektrometrie verringert.

3.4 Aufbereitung für die Spurenelementmessungen

Hierfür wird ca. 1 g kompakte Knochensubstanz benötigt, die an einem standardisierten Probenentnahmeort entnommen wurde. Konventionsgemäß wählt man hierfür international Femurkompakta, möglichst aus der Diaphysenmitte (vgl. EZZO, 1994a; GRUPE, 1992a). Die Proben wurden mittels eines Tischbohrers (Erwachsenen-Femora) oder einer Bügelsäge (Kinder-Femora) aus dem proximalen Drittel des Femurs, anterior entnommen (siehe Abbildung 12: Ort der Probenentnahme am menschlichen Femur).

Ein Teil der Probe wurde einer Einbettung in Kunstharz zugeführt und diente der histologischen Überprüfung der Knochenbinnenstruktur im Dünnschliffpräparat. Hierbei wurden erste Informationen zugänglich über mögliche diagenetische Veränderungen des Knochens durch Mikroorganismen.

Der für die Analyse bestimmte Probenteil wurde schonend mit Leitungswasser von anhaftendem Sediment befreit und getrocknet. Etwaige Spongiosareste in der Markhöhle wurden entfernt. Anschließend erfolgte eine 4-stündige Ätherextraktion im Soxhlet (Fa. Schott-Duran), um organische Bestandteile, z.B. Fette aus dem Knochen herauszulösen. Danach wurde die Probe im Ultraschallbad je nach Dicke 3 – 5 Minuten mit konzentrierter HCOOH im Überschuss geätzt. Hierdurch wurden Kontaminationen der Oberfläche und mögliche liegezeitbedingte Rekristallisationsprodukte aus den natürlichen Hohlräumen der Knochen (weitestgehend) entfernt. Hiernach erfolgte ein mehrmaliges Spülen mit Aqua dest. bis zur pH-Neutralität im Ultraschallbad zur Entfernung der Lösungsprodukte der Verunreinigungen. Die Rekristallisationsprodukte wurden durch die aufsteigende pH-Reihe gelöst. Zwischen zehn und zwanzig Waschlösungen sind erforderlich, bis nach einer sukzessiven Abnahme der Elementkonzentrationen ein stabiles Konzentrationsniveau erreicht ist (vgl. GRUPE & BACH, 1993; GRUPE, 1992a).

Im Anschluss an den Waschvorgang wurde die Probe bis zur Gewichtskonstanz bei ca. 50°C getrocknet. In einem Muffelofen (Heraeus-Labor-Muffelofen, M 104, Fa. Kendro Laboratory Products) wurde die Probe anschließend bei 500°C für 12 Stunden verascht. Bei dieser Temperatur wird der organische Anteil des Knochengewebes weitgehend zerstört. Gleichzeitig werden eine Verflüchtigung der analyserelevanten Elemente sowie thermische Modifikationen der mineralischen Matrix vermieden (vgl. GRUPE & BACH, 1993; GRUPE, 1992a).

Vor und nach der Veraschung wurde die Probe gewogen, um zu prüfen, ob der Gewichtsverlust annähernd dem prozentualen Anteil entspricht, den die organische Knochenkomponente gegenüber dem mineralischen Anteil unter physiologischen Bedingungen ausmacht (organisch : mineralisch ca. 30 : 70). Abweichende Verhältnisse können liegemilieubedingt sein und geben zusätzliche Informationen über den



Abbildung 12: Ort der Probenentnahme am menschlichen Femur

Erhaltungszustand des Knochens. Die veraschte Probe wurde nach Abkühlung gründlich homogenisiert und 100 mg Substanz einem Druckaufschluss zugeführt. Der Aufschluss erfolgte in 1ml konz. HNO_3 suprapur für 6 Stunden bei 160°C (Aufschlussapparatur Fa. Seiff) im Trockenschrank (Fa. Memmert). Nach dem Aufschluss sollte die Probensubstanz vollständig in der Säure gelöst sein. In seltenen

Fällen kann ein geringer Bodensatz zurückbleiben, der ein Absaugen des Aufchlusses über einen Glasfilter erforderlich machen würde. Dieser Fall trat bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben nicht auf. Der Aufschluss wurde mit 5 ml Aqua dest. aufgefüllt. Diese Stammlösung ist Grundlage für die anschließenden Analysen und wird in Polyethylengefäßen aufbewahrt. Tiefgefroren haben diese Lösungen in PE-Gefäßen Standzeiten von 1 - 1,5 Jahren, in nicht gefrorenem Zustand mehrere Wochen (vgl. GRUPE & BACH, 1993; GRUPE, 1992a).

Des Weiteren wurden die Spurenelementgehalte der Bodenproben gemessen (siehe 3.8 Analyse der Bodenproben, Seite 40).

3.5 Histologie

Die Betrachtung der Knochenhistologie kann Aufschluss über den Erhaltungszustand des Knochens, das Individualalter und eventuell über vorhandene, makroskopisch nicht detektierbare Pathologien geben.

Die histologische Begutachtung der in dieser Arbeit untersuchten menschlichen Knochen durch lichtmikroskopische Verfahren diente der Qualitätskontrolle.

Bevorzugt wurden Probenstücke von menschlichen Langknochen analysiert. Sie wurden mit Hilfe des Tischbohrers bzw. einer Bügelsäge entnommen und in ein geeignetes Format gebracht, wobei sich Probenstücke mit einer Kantenlänge von 10 mm x 10mm als ausreichend erwiesen. Wo dies nicht möglich war, wurden andere

oder kleinere Bruchstücke verwendet. Die Schnitte erfolgten etwa parallel zur Ebene des späteren Schliffes.

Zur Stabilisierung der Feinstrukturen beim späteren Sägen und Schleifen wurde das Knochenstück in Harz eingebettet. Sobald der Knochen stabil eingebettet war, war ein Herausreißen von großen Oberflächenteilen oder ein Verschieben feinsten Gefäßstrukturen nicht mehr möglich.

Das Präparat musste für die Einbettung möglichst fettfrei und vor allem trocken sein.

Das Einbetten geschah mit Reckli Injektionsharz EP[®], einem Zweikomponentenepoxidharz. Da es sich um Langknochen handelte, wurden die Stücke so orientiert, dass die Haverschen Kanäle senkrecht standen. Dadurch konnte das Harz leichter die Luft aus den Kanälen verdrängen.

Nach dem Aushärten wurde der Harzblock mit Hilfe einer Kreissäge auf eine Größe geschnitten, die auf den gewählten Objektträger passt. Durch den eingebetteten Knochen wurde nun nahe der Dünnschliffebene ein Schnitt gemacht.

Die Oberfläche der Dünnschliffebene musste vor der weiteren Verarbeitung von allen durch das Sägen möglicherweise entstandenen Riefen und Rillen befreit werden. Dies geschah durch Glattschleifen der Oberfläche mittels einer Schleifmaschine mit Magnethalterung.

Das geschliffene Präparat wurde danach auf einem Objektträger geklebt. Da das Kühlwasser der Schleifmaschine mit einem ölhaltigen Korrosionsschutz vermischt ist, mussten Präparat und Objektträger vor dem Kleben sorgfältig entfettet werden. Hierzu wurden die geschliffenen Oberflächen mit Aceton und einem staubfreien Tuch gereinigt. Das Aushärten des Klebers geschah unter einer Federpresse.

Nach dem Reinigen der Objektträger von Kleberesten erfolgte der Dünnschliff auf der Vakuumplatte der Schleifmaschine. Die Präparate wurden so weit geschliffen, bis sie leicht durchsichtig erschienen. Dann wurde an Hand von Messungen mit einer Mikrometerschraube das Präparat auf die angestrebte Stärke geschliffen (ca. 50 µm).

Um die Dünnschliffe vor Beschädigungen zu schützen, wurden sie mit einem Deckglas abgedeckt. Dieses wurde mit Körapox 439[®] auf das Präparat geklebt.

Zur Betrachtung der Schnitte wurde ein Durchlichtmikroskop mit Digitalkamera (Olympus BX 61, Color View Soft Imaging System) verwendet.

Jeder Schnitt wurde unter verschiedenen Vergrößerungen betrachtet und jeweils ein bis drei geeignete Stellen pro Knochenprobe wurden fotografiert. Mittels der Software „Color View Soft Imaging System“ erfolgte der Transfer der Bilder auf den PC.

In Bezug auf den Erhaltungszustand wurden folgende Merkmale betrachtet:

- einzelne Osteone sind noch erkennbar
- der Grad des mikrobiellen Befalls, erkennbar an der Durchtunnelung des Knochens durch Bohrkanäle,
- Ablagerungen, z.B. von Huminstoffen,
- Vorhandensein von Brewster-Kreuzen¹⁰

Der Erhaltungszustand der Knochen wird hier in drei qualitative Kategorien unterteilt (vgl. FABIG, 2002):

- *gut*: Anteil der intakten Struktur → größer als 85 %.
- *moderat*: Anteil der intakten Struktur → zwischen 15 % und 85 %.
- *schlecht*: Anteil der intakten Struktur → kleiner als 15 %.

Durch diese Einteilung sind mit *gut* und *schlecht erhalten* zwei klar abgegrenzte Histologiegruppen definiert. Die mittlere Gruppe ist durch den weiten Bereich der möglichen Einordnung per se sehr heterogen. Trotzdem ergaben sich für diese Gruppe nur wenige Proben, was sicherlich auch an der Vorauswahl der Knochen lag. Bei den betrachteten Proben war die Knochenbinnenstruktur entweder großflächig unverändert oder nahezu vollständig zerstört.

Für diese Arbeit wurden lediglich gut erhaltene Proben ausgewählt, um die Problematik der Diagenese möglichst gering zu halten (siehe 5.1.1 Problematik der Diagenese, Seite 138).

3.6 Massenspektrometrie

Die Isotope eines bestimmten Elements unterscheiden sich in ihrer Neutronenzahl und damit geringfügig auch in ihrem Gewicht. Bei Reaktionen, an denen Enzyme beteiligt sind, kommt es zu einer Diskriminierung wegen des Massenunterschieds; das eine oder andere Isotop kann bevorzugt werden. Dadurch kann das Endprodukt ein anderes Verhältnis der verschiedenen Isotope aufweisen als das Ausgangsprodukt. Dieses Phänomen wird als Isotopenfraktionierung bezeichnet (BOCHERENS, 1997). Je höher der Gehalt des schweren Isotops ist, desto positiver ist der δ -Wert der Probe (HERRMANN ET AL., 1990).

¹⁰ Die hochgeordnete Struktur des Knochens, bestehend aus Mineral und Kollagenfibrillen, verhält sich bei intakter Kollagen/Mineralbindung optisch anisotrop, d.h. in polarisiertem Licht entstehen Interferenzen. Diese werden in Osteonen u. a. als kreuzförmige Hell-Dunkel-Unterschiede sichtbar, die so genannten Brewster-Kreuze (HERMANN ET AL., 1990).

METHODEN

Bei der Massenspektrometrie wird die zu untersuchende Substanz verdampft und mit einem Elektronenstrahl beschossen. Dadurch entstehen positiv geladene Ionen. Diese werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend in einem Magnetfeld (Analysator) je nach Masse unterschiedlich stark abgelenkt. Am Ende des Analysatorrohrs werden die Teilchen von einem Ionensammler aufgefangen und erzeugen ein elektrisches Signal, dessen Intensität ein Maß für die relative Häufigkeit der erzeugten Ionen ist.

Ionen mit einer anderen Masse können durch Variation der magnetischen Feldstärke auf die passende Flugbahn zum Austrittsspalt geführt werden. So kann man durch die passende Wahl der Feldstärke jede Ionensorte einzeln den Detektor erreichen lassen.

Das Kollagen-Lyophilisat wird in Zinnkapseln eingewogen und verbrennt in einem sauerstoffhaltigen Heliumstrom vollständig zu N_2 und CO_2 . Stickoxide, die dabei entstehen, werden bei $600^\circ C$ an Kupfer zu elementarem Stickstoff reduziert, das Verbrennungswasser an einer mit Phosphopentoxid und Magnesiumperchlorat bestückten Wasserfalle absorbiert und CO_2 an einer Ascarit-Gasfalle absorbiert. Die Isotopenverhältnismessung für Stickstoff kann dann im Massenspektrometer stattfinden. Für die Kohlenstoffmessung wird die Ascarit-Gasfalle durch einen Bypass umgangen, die Verhältnisbestimmung erfolgt ebenfalls im Massenspektrometer.

Die Isotopenverhältnisse des Kollagens werden über einen kalibrierten gasförmigen Laborstandard bestimmt. Die Kalibrierung wurde mittels der IAEA (International Atomic Energy Agency) Standards CH-7 (eine Polyethylenfolie) und USGS24 für $\delta^{13}C$ und IAEA N1 (ein Ammoniumsulfat) für $\delta^{15}N$ vorgenommen. Die Messungen erfolgten mit dem DELTAplusXL Finnigan-Massenspektrometer und mit dem Carlo-Erba CN2500-Elementanalytiker. Die analytische Präzision betrug für $\delta^{13}C$ und $\delta^{15}N$ $<0,2\%$ und für C und N $<5\%$.

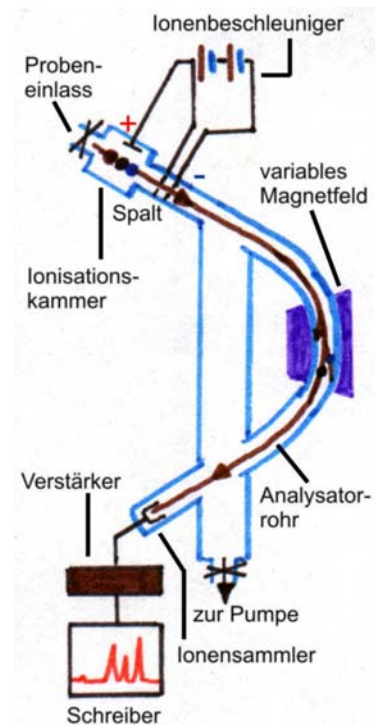


Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung eines Massenspektrometers.

METHODEN

Die Unterschiede im Verhältnis der stabilen Kohlenstoffisotope $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ werden in promille-Konzentration gegen das Verhältnis in den Peedee-Belemniten (PDB) angegeben (vgl. II Stabile Isotope, Seite 6):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Probe}} = \left[\frac{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{Probe}}}{^{13}\text{C}/^{12}\text{C}_{\text{Standard}}} - 1 \right] \times 1000$$

Die stabilen Stickstoffisotope $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ werden in promille-Konzentration gegen das Verhältnis in der Luft (AIR) angegeben:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{Probe}} = \left[\frac{^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{Probe}}}{^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{Air}}} - 1 \right] \times 1000$$

Die Ermittlung der Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs und Sauerstoffs in den Karbonat-Proben erfolgte mit einer Kiel III Karbonataufbereitung, welche online an ein ThermoFinnigan 252 Massenspektrometer gekoppelt ist. Die Kiel III Karbonataufbereitung ermöglicht Isotopenanalysen an kleinsten Probenmengen (ab 0.04 mg CaCO_3) mit einer hohen Präzision und einem relativ hohen Probendurchsatz. Die Karbonatproben werden unter Vakuum mit 100 %-iger H_3PO_4 zu Reaktion gebracht, CO_2 in einer Kühlfalle bei -196°C ausgefroren, und online an das Massenspektrometer überführt. Der maximale Probendurchsatz liegt bei 46 Proben (40 Proben, 6 Standards) pro 24 Stunden. Die Reproduzierbarkeit der Sauerstoff- und Kohlenstoffisotopenanalysen an Karbonaten ist besser als 0.06 ‰ (1 Std.Abw.). In diesem Fall 0,02 ‰ für $\delta^{13}\text{C}$ und 0,02 ‰ für $\delta^{18}\text{O}$.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde mittels den Laborstandards V-PDB für $\delta^{13}\text{C}$ und NBS19 für $\delta^{18}\text{O}$ getestet.

Die Isotopenverhältnisse werden relativ gegen PDB in der konventionellen Delta-Notation ($\delta^{18}\text{O}$ bzw. $\delta^{13}\text{C}$) in Promille dargestellt.

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{Probe}} = \left[\frac{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{Probe}}}{^{18}\text{O}/^{16}\text{O}_{\text{PDB}}} - 1 \right] \times 1000$$

Die Einwaagen der Lyophilisate für die Messungen der stabilen Isotope aus dem Kollagen erfolgten eigenhändig am Geoforschungszentrum Potsdam. Die dazugehörigen Messungen wurden von DR. BIRGIT MINGRAM am Geoforschungszentrum Potsdam durchgeführt.

Die Einwaagen und Messungen der Karbonate erfolgten im Isotopenlabor der Universität Erlangen bei PROF. DR. WERNER BUGGISCH und PD DR. MICHAEL JOACHIMSKI.

3.7 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Elemente zeigen typische Absorptionslinien im elektromagnetischen Spektrum, in der AAS wird der ultraviolette oder sichtbare Bereich verwendet. Atomisiert (d.h. in einzelne, anregbare Atome überführt) werden die Atome hierbei entweder durch eine Flamme (Ethin/Luft-Gemisch oder Ethin/Lachgas), in die die zu analysierende Lösung hineinerstäubt wird, oder durch schnelles, starkes Erhitzen (elektrisch in einem Graphitrohr), in das zuvor eine geringe Menge der Lösung hineingegeben wurde.

Ein Lichtstrahl wird durch diese Flamme (bzw. durch das Graphitrohr) geleitet. Hinter der Flamme wird gemessen, wieviel des eingestrahnten Lichtes einer bestimmten Wellenlänge durch die zu messenden Elemente absorbiert wird. Mit steigender Konzentration des Analyten in der Probe steigt proportional die Schwächung des eingestrahnten Lichtes (Extinktion). Nach dem Lambert-Beer'sches Gesetz (gültig für niedrige Konzentrationen) wird die Extinktion für bekannte Konzentrationen aufgenommen, eine Kalibrationskurve erstellt und Proben mit unbekannter Konzentration gegen diese Kalibration aufgenommen und die Konzentration abgelesen.

15 Spurenelemente (Ca, P, Mg, Fe, Mn, Zn, Al, Ba, Sr, Cu, Pb, Ni, Cd, As, Co), die sich bei Untersuchungen zur Ernährungs- und Lebensrekonstruktion als sinnvoll erwiesen haben, wurden mit Hilfe des Atomabsorptionsspektralanalyse (AAS) quantitativ analysiert. Die eigentliche Durchführung der Spurenelementanalysen erfolgte je nach dem Gehalt und der Empfindlichkeit des zu messenden Elements entweder mit der ICP (Inductive Coupled Plasma-Spektroskopie), der Flammen-AAS oder der Graphitrohrofen-AAS.



Abbildung 14: Skizze eines Atomabsorptionsspektrometers (AAS). Diese Analysenmethode ermöglicht die Bestimmung einer Vielzahl von Elementen. In der AAS werden jeweils elementspezifische Lampen verwendet.

Bei der Flammentechnik wird die gelöste Probe zunächst in ein Aerosol überführt. Dazu wird die Probe mit einem pneumatischen Zerstäuber in eine Mischkammer zerstäubt und mit Brenngas und Oxidanz verwirbelt. Es bildet sich ein feiner Nebel, das Aerosol. Um die Tropfengröße noch kleiner und gleichmäßiger zu machen, trifft das Aerosol zunächst auf eine Prallkugel aus Keramik und anschließend ggf. auf einen

METHODEN

Mischflügel, der nur feine Tröpfchen in die Mischkammer lässt. Ein geringer Teil des ursprünglichen Aerosols gelangt schließlich aus der Mischkammer in die dahinter geschaltete Flamme. Dort verdampft zunächst das Lösungsmittel und die festen Probenbestandteile schmelzen, verdampfen und dissoziieren schließlich.

Bei der Graphitrohr-AAS macht man sich dem Umstand zu nutze, dass Graphit Strom leitet und sich beim Anlegen eines elektrischen Stromes durch seinen elektrischen Widerstand erhitzt. Die Probelösung wird in einen Graphitrohrföfen gebracht und in mehreren Schritten erhitzt. Die Temperaturen sind natürlich abhängig vom Analyten und können stark abweichen. Vorteilhaft gegenüber der Flammtechnik ist, dass die Probe quantitativ in den Strahlengang gebracht werden kann und dort auch längere Zeit (bis zu 7 Sekunden) verbleibt. Weiter können oft störende Matrixbestandteile durch unterschiedliche Verdampfungstemperaturen abgetrennt werden; entweder verdampfen sie vorher, oder sie bleiben zurück. Die Nachweisgrenzen sind daher bis zu 3 Zehnerpotenzen besser als bei der Flammtechnik, oder der ICP.

Die Methode der ICP, des induktiv gekoppelten Plasmas, beruht auf der Verwendung eines sehr heißen (ca. 10000 K- 12000 K) Argonplasmas zur Anregung der optischen Emission der zu analysierenden Elemente. Die Energieübertragung erfolgt dabei nach der Zündung durch einen Funken durch das in den Spulen anliegende Hochfrequenzfeld. Freie Elektronen werden nun durch das anliegende Feld beschleunigt und heizen durch Kollision mit den Atomrümpfen das Plasma auf.

Die Elemente Al, Ba, Cu, Fe, Zn, Mg, Mn und Sr wurden aus einer 1 : 5 verdünnten Lösung mit der ICP gemessen.

Ca und P wurden aus einer 1 : 1000 verdünnten Lösung ebenfalls mit der ICP gemessen. Die Elemente Co, Pb, Cd und Ni wurden aus einer 1 : 10 verdünnten Lösung mit dem Graphitrohr gemessen. As wurde mit der FIAS AAS (Fließinjektion) gemessen. Als Qualitätskontrolle diente der Standard 1400-Bone Ash.

Da für die AAS-Messungen die Verdünnungen der Probenstammlösungen jeweils optimalen Analysebedingungen angepasst wurden, brauchten Nachweisgrenzen hierbei nicht berücksichtigt werden.

Die Messungen wurden von Frau ELKE HEYDE am Institut für Geologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

3.8 Analyse der Bodenproben

Alle Bodenproben wurden vor der Analyse gewogen. Die Massen betragen 3286,00 mg für die Bernauer Probe, 233,50 mg für die Tasdorfer Probe und 249,40 mg für die Usedomer Probe. Zunächst wurden die Bodenproben mit Königswasser unter Druck in Lösung gebracht. Die Aufschlusslösung wurde je nach Probenmenge mit einer entsprechenden Menge Aqua dest. aufgefüllt und die gleichen Spurenelemente wie bei den Knochenproben mittels AAS, ICP und Graphitrohrföfen gemessen.

Die Messungen wurden von Frau ELKE HEYDE am Institut für Geologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Zusätzlich zu der Bestimmung der im Boden enthaltenen Spurenelemente sollten die enthaltenen Minerale ermittelt werden. Da jedoch die Tonmineralbestimmung der normalen Pulverpräparate aus den „Rohproben“ keine eindeutig auswertbaren Röntgendiagramme ergab, da insbesondere der Gehalt an Quarz noch viel zu hoch war, wurden Pipettenpräparate hergestellt. Die Röntgenphasenanalyse diente zur Identifikation der unterschiedlichen Haupt-, Neben- und Spurenelementphasen.

Die mineralogische Analyse hat vor allem zum Ziel, die einzelnen mineralischen Sedimentkomponenten zu bestimmen; sie geht im Allgemeinen von den vorgegebenen Kornfraktionen aus.

Die Tonminerale werden aus der Fraktion $< 2\mu$ bestimmt, die zuvor durch H_2O_2 -Behandlung weitgehend von störenden organischen Substanzen befreit worden ist. Die Probe wird mit Ultraschall desintegriert und auf einem Glas-Objektträger aufsuspendiert. Diese Tonpräparate werden nacheinander im lufttrockenen Zustand, nach Behandlung mit Ethylenglykol sowie nach Erhitzen auf $350^\circ C$ bzw. $550^\circ C$ im Winkelbereich von $2-32^\circ$ (CuK α -Strahlung), mit dem Röntgendiffraktometer abgefahren. Die einzelnen Mineralkomponenten werden aus der Lage ihrer Basisreflexe bestimmt, wobei im allgemeinen Kaolinit und Chlorit durch die Reflexaufspaltung unterschieden werden können.

Herstellung von Pipettenpräparaten (Texturpräparate) mit der Fraktion $< 63\mu m$:

Die jeweilige Gesamtmenge der Fraktion $< 63\mu m$ (3,7-0,09g) wurde in schmalen 50 ml Bechergläsern mit 20 - 30ml Aqua dest. und 100 μl 1m NH_4-OH -Lösung, welche als Antikoagulationsmittel dient, versetzt und 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde umgerührt und ca. 2 Stunden stehen gelassen. Danach befinden sich in den oberen 2 cm der Suspension nur noch Partikel $< 2\mu$, mit einer Pipette wurden dann 3 – 5 ml Suspension aus den oberen 2 cm abpipettiert und die Suspension

auf zwei Glasobjektträger verteilt. Nach Trocknung der Tonpräparate wurden von jeder Probe folgende Röntgenpräparate¹¹ mit folgenden Winkeln erstellt:

1. Nach Trocknen des Tonfilters 2 - 37° 2 θ
2. Nach Ethylenglycol-Behandlung 2 - 15° 2 θ
(Über Nacht bei 60°C in einer Ethylenglycolatmosphäre)
3. Nach 550°C-Behandlung: ca. 1,5 Stdn. im Muffelofen

Die Röntgen- und Pipettenpräparate wurden von DR. RÖPER am Institut für Geologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

3.9 Statistik

Alle Daten und Parameter für die erforderlichen Konzentrations- und Quotientenberechnungen sind im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2003 gespeichert worden. Dies ermöglichte die Durchführung aller Berechnungen innerhalb dieses Datensystems, teils unter Verwendung selbstdefinierter Rechenverknüpfungen. Diese Form der Datenauswertung gewährleistete die ständige Verfügbarkeit der Rohmeßdaten. Die Transparenz der Berechnungen mit Hilfe der internen Verknüpfungen der einzelnen Auswertungsschritte trug zur Verbesserung der Datensicherheit durch eine erleichterte Kontrolle und Fehlerkorrektur bei. Für die statistische Auswertung wurde das computergestützte Programm SPSS 12.0 genutzt. Alle Messreihen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Enthielt die Stichprobe weniger als 50 Werte, wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet, waren es mehr als 50, gelangte der Kolmogorov-Smirnov-Test zur Anwendung. Wird der Test signifikant, weicht die empirische Verteilung signifikant von einer Normalverteilung ab.

Um auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Ergebnissen zu testen, wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwendet. Dies ist ein nichtparametrischer Zwei-Stichproben-Test für zwei unabhängige Stichproben analog zum t-Test für unverbundene Stichproben. Dieser Test setzt für die Messgröße keine Normalverteilung voraus. Die Nullhypothese entspricht der des t-Tests für unverbundene Stichproben.

Für einen Ausschluss extremer Spurenelement- bzw. Isotopendaten von den Auswertungen bedarf es einer sachlogischen Begründung. Die biologische bzw. biochemische Variabilität schließt aber prinzipiell einen großen Bereich der Merkmalsausprägung ausdrücklich ein. Gleichfalls sind bei bodenchemischen Prozessen stochastische Phänomene mit resultierenden Extremkonzentrationen nicht auszuschließen. Dies und die Komplexität biochemisch-geochemischer Wechselwirkungen erlaubte keine Definition

¹¹ CuK α -Strahlung, 36 KeV, 24mA.

von Bereichen für wahrscheinliche Elementkonzentrationen. Für die anderen quantifizierten und auswertungsrelevanten Daten der Vorbereitung der Knochenproben, wie z.B. Masseverluste, ist eine solche Limitierung aus den gleichen Gründen ebenfalls nicht möglich. Es ermangelt somit prinzipiell einer sachlogischen Ausreißerdefinition. Jegliche dergestalt Datenreduktion wäre also willkürlich.

Die Spurenelemente der einzelnen Gruppen wurden auf ihre Korrelationen hin getestet. Um diesen Korrelationen eine Gewichtung zu geben, wurde anschließend eine Faktorenanalyse durchgeführt. Die Faktorenanalyse ist ein statistisches Daten reduzierendes und Hypothesen generierendes Verfahren. Die Faktorenanalyse stellt Zusammenhänge zwischen mehreren Variablen dar, indem sie diese anhand ihrer Korrelationen in möglichst wenige, nicht überlappende Gruppen (Faktoren) klassifiziert. Die Zusammenfassung soll so erfolgen, dass ein möglichst großer Teil der gemeinsamen Varianz der Variablen erklärt und berücksichtigt wird (siehe 9.1 Statistik, Seite 279).