

A close-up photograph of a microscope objective lens, showing its metallic body and the 'USA' logo. The lens is positioned over a sample, with a blue-tinted background.

MODERNÍ CHEMICKÁ

Petr Bednář,
Lukáš Kučera (eds.)

ANALÝZA

V ARCHEOLOGII

A photograph of an archaeological excavation site. In the foreground, a human skeleton is visible, partially covered by a large, flat, circular object, possibly a metal disc or a piece of pottery. The background shows a rocky, uneven terrain.

I. díl

Moderní chemická analýza v archeologii I. díl

Petr Bednář, Lukáš Kučera (eds.)

Olomouc 2021

Odborní recenzenti:

Mgr. Michaela Langová, Ph.D.

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Kniha vznikla za podpory Grantové agentury České republiky řešením projektu č. 17-17346S s názvem „Moderní chemická analýza zbytků organických materiálů v archeologickém kontextu“ a Evropského fondu pro regionální rozvoj, Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání řešením projektu č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007378 s názvem „OA ITI – ARTECA: Pokročilé fyzikálně-chemické metody ve výzkumu a ochraně kulturního a uměleckého dědictví“.

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

1. vydání

© Petr Bednář, Lukáš Kučera (eds.), 2021

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2021

DOI: 10.5507/prf.21.24459486

ISBN 978-80-244-5948-6 (print)

ISBN 978-80-244-5949-3 (iPDF)

Seznam autorů

Bednář Petr, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, petr.bednar@upol.cz

Beková Martina, Muzeum a galerie Orlických hor v Rychnově nad Kněžnou, martina.bekova@moh.cz

Beneš Jaromír, Laboratoř archeobotaniky a paleoekologie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, benes.jaromir@gmail.com

Dehnerová Hana, Národní památkový ústav, územní odborné pracoviště v Olomouci, odbor archeologie, dehnerova.hana@npu.cz

Fojtík Pavel, Ústav archeologické památkové péče Brno, oddělení archeologických výzkumů Prostějov, fojtik@uapp.cz

Golec Martin, Katedra historie, Filozofická fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, golec@seznam.cz

Hlas Jindřich, Národní památkový ústav, územní odborné pracoviště v Ostravě, odbor archeologie, hlas.jindrich@npu.cz

Janus Hlavičková Lucie, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, lucie.hlavickova@upol.cz

Jagošová Klára, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, klara.jagosova01@upol.cz

Kučera Lukáš, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, lukas.kucera@upol.cz

Kučerová Pavla, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, pavla.kuceroval@upol.cz

Kurka Ondřej, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, ondrej.kurka@upol.cz

Marethová Barbara, Národní památkový ústav, územní odborné pracoviště v Ostravě, oddělení archeologických výzkumů, marethova.barbara@npu.cz

Maříková Lucie, Muzeum a galerie Orlických hor v Rychnově nad Kněžnou, marikova@moh.cz

Mírová Zuzana, Ústav pro archeologii, Univerzita Karlova v Praze, mirova.z@seznam.cz

Ondrkál Filip, Ústav pro archeologii, Univerzita Karlova v Praze, filip.ondrkal@seznam.cz

Pavelka Jaroslav, Centrum biologie, geověd a envigogiky, Západočeská univerzita v Plzni, japetos@cbg.zcu.cz

Peška Jaroslav, Archeologické centrum Olomouc, peska@ac-olomouc.cz

Richtera Lukáš, Ústav chemie a biochemie, Mendelova univerzita v Brně, lukas.richtera@mendelu.cz

Smetana Jakub, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, jakub.smetana02@upol.cz

Sokolovská Diana, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, dia.sokolovska@gmail.com

Šlézar Pavel, Národní památkový ústav, územní odborné pracoviště v Olomouci, odbor archeologie, slezar.pavel@npu.cz

Zapletalová Barbora, Archeologické centrum Olomouc, zapletalova@ac-olomouc.cz

Zemek Vojtěch, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, vojtech.zemek01@upol.cz

Žingor Zbyněk, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, zbynek.zingor01@upol.cz

Obsah

1	Úvod	11
2	Základní pojmy používané v archeologii a souvisejících vědních oborech	13
	Archeologie	13
	Archeometrie	14
	Antropologie	14
	Archeobotanika	15
	Archeozoologie	16
	Dendroekologie a dendrochronologie	16
	Archeogenetika	17
3	Analytické metody používané v archeologii a příbuzných oborech	18
3.1	Klasické chemické metody	19
3.1.1	Gravimetrie (vážková analýza)	19
3.1.2	Volumetrie (odměrná analýza)	23
3.2	Instrumentální metody	25
3.2.1	Metody spektrální	25
3.2.1.1	Atomová (optická) emisní (OES) a atomová absorpční spektrometrie (AAS)	26
3.2.1.2	Metody využívající rentgenové záření	34
3.2.1.3	Hmotnostní spektrometrie	38
3.2.1.4	Vibrační spektroskopie	52

3.2.2	Metody separační a spojené techniky	57
3.2.2.1	Plynová chromatografie (GC) a její spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)	57
3.2.2.2	Kapalinová chromatografie (LC) a její spojení s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)	91
3.2.3	Metody elektrochemické	122
4	Analýza (bio)makromolekul v archeologických nálezech a problémy kontaminace nálezů	125
4.1	Archeogenetika	125
4.2	Haploskupiny v archeogenetice	129
4.2.1	Ženská linie: mtDNA	130
4.2.2	Mužská linie: chromozom Y	150
4.3	Lidská DNA	167
4.3.1	Muž z ledovce, Ötzi	167
4.3.2	Neandrtálci	168
4.3.3	Denisované	170
4.4	Archeogenetika zvířat	171
4.5	Paleomikrobiologie	176
4.6	Geny pro trávení laktózy u dávných populací a mutace 13910*T	179
4.7	Proteiny v paleogenetice	182
4.8	Proteiny a zbytky potravin na archeologické keramice	183
4.8.1	Proteiny a jejich identifikace pomocí protilátek	183
4.8.2	Vybrané výsledky plynoucí z testů pomocí protilátek	184
4.8.3	Metoda ELISA a Rapid 3-D testy	185
5	Databáze a dokumentace	212
5.1	Databázování v archeologii	212
5.1.1	Relační databáze	213
5.1.2	Nástroje pro tvorbu databáze	214
5.1.2.1	HTML	215
5.1.2.2	PHP	216
5.1.2.3	MySQL	217
5.1.3	Struktura databáze	218
5.1.3.1	Zabezpečení přístupu	218
5.1.3.2	Zabezpečení souborových dat	219
5.1.3.3	Vkládání nových záznamů	220

5.1.3.4	Prohlížení databáze a vyhledávání	223
5.1.3.5	Úprava existujících záznamů	227
5.1.4	Další existující archeologicko-chemické databáze	228
5.1.4.1	Databáze standardů	228
5.1.4.2	Databáze obsahující informace o anorganických složkách	229
5.1.4.3	Databáze obsahující informace o organických reziduích	231
5.1.4.4	Ostatní databáze	231
5.1.4.5	Online databáze	231
5.2	Dokumentační činnost, evidence a konzervace-restaurování archeologických nálezů	232
5.2.1	Dokumentační a evidenční činnost	232
5.2.2	Průzkum a konzervace-restaurování	234
5.2.2.1	Keramické archeologické nálezy	235
5.2.2.2	Kovové archeologické nálezy	235
5.2.2.3	Jantarové a kostěné archeologické nálezy	237
5.2.2.4	Archeologické dřevo	237
5.2.2.5	Archeologická useň	237
5.2.2.6	Archeologické sklo	238
5.2.2.7	Archeologické a funerální textilie	238
6	Vybrané lokality archeologického výzkumu a studie využívající chemické analýzy	244
6.1	Halštatská Býčí skála – 153 let přírodovědných analýz	244
6.1.1	Zájem přírodovědců v letech 1868–2019	246
6.1.2	Současnost a budoucnost lokality Býčí skála	252
6.1.3	Závěr	256
6.2	Středověké nálezy a analýza obsahu středověkých nádob	262
6.2.1	Podrobnější popis historických souvislostí nálezů	265
6.2.2	Chemická analýza materiálu nalezeného v keramické nádobě	267
6.3	Studium chemického složení zbytků v keramických nádobách z Orlové (sirné mléko)	271
6.4	Úzké žlábký s „V“ profilem (Schlitzgruben)	273
6.5	Nejstarší proso v pravěku střední Evropy z Držovic na Prostějovsku	278
6.6	Fosfátová analýza – jedinečný pomocník (na pohřebištích Přerov-Předmostí 5 /KZP/ a Olomouc-Slavonín, Arbesova ulice /MŠK a ÚK/)	283
6.7	Kultovní vozík nebo závěsná nádoba s labutí protomou z doby popelnicových polí ze Slovenska	288

1

Úvod

Tato kniha se zabývá současnými možnostmi analytické chemie při zkoumání objektů a materiálů nalezených při archeologickém výzkumu. Je určena odborníkům z řad archeologů, jimž si klade za cíl zpřístupnit moderní techniky chemické analýzy. Pozornost v tomto ohledu věnuje zejména tomu, jaké informace může chemická analýza (zejména instrumentální) archeologovi přinést. Na druhou stranu se snaží být nápomocna chemikovi, který je postaven před úkol provádět chemický rozbor archeologických nálezů. Informuje o způsobu práce, specifikách a úskalích této oblasti a možnostech, jak podat kolegovi archeologovi optimální informaci. Chce v tomto smyslu maximálně usnadnit komunikaci mezi archeologem a chemikem. Typickým problémem vyskytujícím se na rozhraní vědních oborů je posun v pojmech. Úkolem knihy je tedy i správně vymezit pojmy používané v oblasti archeologie a analytické chemie, vysvětlit používané odborné termíny a zkratky. Je třeba zdůraznit, že chemická analýza je jen jednou částí archeometrie, přes kterou komunikuje s řadou dalších přírodovědných a technických oborů přispívajících k poznání naší minulosti. Není posláním této knihy pojmově ani metodicky pokrýt celý záběr archeometrie. Autoři by však rádi na knihu navázali dalšími publikacemi, v nichž se k řadě zde málo zmíněných oborů archeometrie (a jejich bližšímu vztahu k chemii) dostanou podrobněji.

Archeolog se velmi často podílí na odběru, transportu nebo i zpracování vzorku pro chemickou analýzu. Při manipulaci se vzorkem může vznikat, a jistě vzniká, celá řada chyb s vážným důsledkem pro správnost analytických dat. Práci se vzorkem je tedy věnována patřičná pozornost v řadě kapitol. Množství dat, která jsou produkována při instrumentální chemické analýze, je obrovské a často řádově přesahuje lidské možnosti je, byť i jen zběžně, prohlédnout. Kniha se proto zabývá i problematikou optimálního zpracování výsledků, získání podstatné

informace ze „surových“ dat, jejím vhodným zobrazením a postavením do kontextu již známých faktů a předešlých výzkumů. Klíčové je i přehledné uchovávání získaných chemických informací, tedy jejich „databázování“ a propojení s archeologickými daty v takovém prostředí, které umožní (pokud možno „bezbolestné“ a interaktivní) prohledávání při dalším studiu a výzkumu. Jen dobře promyšlená systematizace dá získaným datům dlouhověkost a plně je vytěží. I této oblasti se kniha věnuje. Velkou roli v analýze archeologických kontextů sehrávají bioanalytické metody, včetně (archeo)genetické analýzy, které navazují na chemické metody, a získané výsledky z obou oblastí se vzájemně doplňují, což je důležité pro správnou interpretaci dat.

Autoři se při psaní maximálně snažili o přístupnost knihy pro co nejširší okruh odborné veřejnosti. Kniha je doplněna řadou aplikací a případových studií autorů ukazujících možnosti a limity analytických metod. Podané informace by do budoucna mohly zlepšit vzájemné mezioborové porozumění odborníků z oblasti archeologie a analytické chemie.

Příjemné čtení!

Za autorský kolektiv,
Petr Bednář a Lukáš Kučera

2

Základní pojmy používané v archeologii a souvisejících vědních oborech

Jaromír Beneš, Petr Bednář, Lukáš Kučera

Archeologie

je věda studující minulé lidské společnosti prostřednictvím archeologických pramenů a bohatě strukturovaných dat z příbuzných oborů studujících minulost. Mezi ně patří lidské výtvořiny (artefakty), ale i zbytky přírodního původu, které byly člověkem úmyslně nebo neúmyslně ovlivněny (ekofakty). V kontrastu k historiografii se tudíž jedná o velmi komplexní pohled na minulost člověka a jeho prostředí. Děje se tak prostřednictvím artefaktů (*artefaktuální archeologie*) nebo ekofaktů (*environmentální archeologie*). Artefaktuální archeologie zkoumá minulost prostřednictvím hmotných pozůstatků přímo vytvořených člověkem. Tyto hmotné pozůstatky vydávají svědectví o době svého vzniku, kulturních vzorcích, které artefakty formovaly, a o vztazích mezi komplexy artefaktů v čase a v geografickém prostoru. V rámci artefaktuální archeologie existuje velmi mnoho oborových specializací, zaměřených na určitou (pre)historickou dobu nebo geografickou oblast (*archeologie pravěku, klasická archeologie, archeologie středověku, archeologie starověkého Egypta, arktická archeologie*), nebo jsou tyto specializace definovány teoretickým přístupem a metodou zkoumání (*teoretická archeologie, etnoarcheologie, krajinná archeologie, behaviorální archeologie*). Jmenované obory archeologie, založené na studiu artefaktů a jejich prostorových struktur, využívají převážně teorii a metodologii společenských věd, ale do určité míry i přírodovědeckou metodologii. Hranice mezi společenskými vědami a přírodovědou je v archeologii neostrá, záleží vždy na předmětu zkoumání a kladených otázkách. Artefaktuální archeologie byla v minulosti formována dějinami umění a historiografií.

Převážně přírodovědecké postupy využívá *environmentální archeologie*. Navazuje na druhou větev dějin archeologie, kdy byl tento obor v devatenáctém

století součástí geologie. Environmentální archeologie se člení na geoarcheologii a bioarcheologii. Geoarcheologie zkoumá člověkem přímo vytvořené (antropické) uloženiny nebo vrstvy lidskou činností podmíněné. Geoarcheologie využívá řadu geologických metod, jako je sedimentologie nebo nauka o minerálech a horninách. Biologický charakter lidských a zvířecích pozůstatků, ale i biologický obsah uloženin, vrstev a biologických stop na artefaktech zkoumá bioarcheologie. Ta se člení na antropologickou archeologii, archeozoologii a archeobotaniku. Tyto samostatné obory do značné míry využívají k získávání dat metod archeometrie.

Archeometrie

je rychle se rozvíjející interdisciplinární vědní obor založený na spolupráci mezi archeology a přírodovědci. Archeometrii je možné rozdělit na pět základních částí: 1) vyhledávání archeologických nalezišť nedestruktivními postupy (geofyzika, LIDAR, letecká archeologie), 2) analýza a charakteristika materiálů a technologií používaných v minulosti, včetně určení provenience, 3) analýza lidských pozůstatků a veškeré lidské činnosti včetně stravy, pěstování rostlin a chovu zvířat, stavby obydlí atd., 4) datovací metody a 5) metody konzervace artefaktů. Zkoumá objekty a materiály z archeologického výzkumu metodami přírodních a technických věd: fyziky, chemie, biologie, biochemie, metalurgie, geologie a mnoha dalších. Přináší do archeologického výzkumu velké množství objektivních dat a po propojení s klasickými metodami archeologie poskytuje detailní informace o naší minulosti. Tato kniha se podrobně zabývá právě možnostmi chemie. Velice atraktivní je přesah archeometrických postupů do dalších oblastí lidského bádání, ale i běžného života. Za zmínku určitě stojí podobnost práce a vzájemné propojení postupů s kriminalistickou a forenzní praxí. Pro bližší informace je možno zájemce odkázat na publikaci Martina Hložka (Hložek, 2008).

Antropologie

je klíčová pro výzkum historie lidského druhu. Je to věda o člověku v nejširším slova smyslu. Fyzická antropologie studuje lidské tělo, od anatomie se liší hlavně zájmem o vznik a vývoj člověka. Kulturní a sociální antropologie se zabývá člověkem jako společenskou a kulturní bytostí. Patří mezi vědy holistické – snaží se vytvořit celkový obraz člověka, zabývá se všemi lidmi ve všech dobách a zároveň také všemi rozměry lidství. Od sociologie se liší důrazem na jednotlivého člověka a snahou porozumět jeho specifickým, od etnografie snahou o zobecnění a postihu společného. Existuje samostatný obor *archeologická antropologie*. Má stejný zájem jako *sociokulturní antropologie*, neboť se zabývá studiem společností a kultur, s tím rozdílem, že studuje ty zaniklé. Rozdíl mezi oběma subdisciplínami tedy spočívá v povaze času. Archeologové studují zaniklé společnosti a kultury,

zatímco sociokulturní antropologové proměny současných společností a kultur v čase. Archeologická antropologie rekonstruuje a interpretuje zaniklé společnosti a kultury pomocí hmotných pramenů, které archeologové získávají při archeologickém terénním výzkumu. Cílem archeologie je detailní popis minulosti lidstva. Platí, že čím hlouběji se do minulosti lidstva noříme, tím chudší znalostí detailů o minulosti lidstva disponujeme. Pro bližší poučení o antropologii lze doporučit česky psanou knihu *Antropologie – Teorie člověka a kultury* (Soukup, 2011).

Archeobotanika

je obor zabývající se vyhledáváním, separací a vyhodnocením rostlinných zbytků z různých nálezových prostředí především archeologických nalezišť. Jde o kulturní vrstvy a výplně archeologických objektů na běžných „suchých“ nalezištích, mezi něž obvykle počítáme většinu pravěkých a středověkých sídlišť a pohřebišť, nebo o výplně trvale zamokřených lokalit a objektů, například studní, jímek, vodovodů, sklepů, ale i jezer nebo slepých ramen řek. Hledanými objekty jsou především semena rostlin nebo části plodů, ale i jehličí, pupeny, plevy obilnin, zbytky slámy. Na základě nalezené druhové skladby rostlin je pak možno usuzovat, jaké hlavní užitkové rostliny (obilniny, luštěniny, ovoce, zelenina, koření, technické plodiny) byly na lokalitě pěstovány či sbírány, ale nejen to. Podle nalezených semen planě rostoucích druhů lze alespoň přibližně popsat nejbližší okolí lokality, tj. pole, louky, rumiště, podmáčená stanoviště, lesy, křovinaté formace apod.

Archeobotanika se v současné době profiluje do tří hlavních větví definovaných charakterem zkoumaných botanických pozůstatků. První metodou archeobotaniky je analýza rostlinných makrozbytků, druhou metodou je analýza dřeva a uhlíků (*xylotomie* a *antrakologie*), třetí metodou je analýza rostlinných mikrozbytků, především pylu, rostlinných fytolitů, škrobů a tzv. nepylových objektů. Analýza rostlinných makrozbytků je do značné míry založena na metodě karpologie, tj. na morfologii, tvarové a funkční variabilitě semen rostlin, ale i dalších částí rostlin. Ty se mohou dochovat v zuhelnatělé, vysušené nebo mineralizované formě. Častým případem, kdy se rostlinné makrozbytky dobře dochovaly, je jejich trvalé zamokření ve vodním prostředí. Analýza rostlinných makrozbytků dřev je prováděna metodami xylotomie a antrakologie, které se aplikují na nespálené i spálené fragmenty. Mikroskopické určování dřev a uhlíků patří ke standardním postupům archeobotaniky. Nálezy fragmentů nespáleného dřeva a uhlíků tvoří viditelnou a nápadnou frakci archeologických uloženin a situací. Mezi rychle se rozvíjející archeobotanické specializace patří analýza fytolitů a škrobů. Fytolity jsou mikroskopická tělíska, která se vytvářejí v listech, stoncích, kořenech, květech nebo plodech rostlin. Nejčastěji se jedná o inkrustace vznikající vně nebo uvnitř buněk hromaděním oxidu křemičitého (tzv. silikátové fytolity), šťavelanu

vápenatého, případně uhličitanů. Inkrustovány mohou být specifické typy buněk či jejich části nebo celé soubory buněk (například epidermis), a to buď jejich vnitřky, buněčné stěny nebo obojí zároveň. Analýza škrobu se začala používat pro účely archeologického bádání v posledních třech dekadách. Analýza škrobových zrn je spojena s odpověďmi na otázky ohledně zpracování a konzumace rostlin a složení rostlinné složky lidské potravy. Tato technika je vhodná také pro zkoumání funkce nástrojů, domestikaci rostlin a vegetační historii.

Specifickým předmětem analýzy rostlinných mikrozbytků je pyl rostlin. Jde o biologický materiál schopný přežívat v podstatě v nezměněné formě po velmi dlouhou dobu. Jeho studium přináší celou řadu poznatků o rostlinách a jejich využití v evolučních a historických souvislostech. Obor palynologie, který pyl zkoumá, je situovaný mezi geologií, botanikou a paleoekologií. Na základě určení zachovalých pylových zrn získaných při archeologických výzkumech lze provést rekonstrukci vegetačního pokryvu určité geografické oblasti, ale rovněž přiblížit, jaké rostliny byly minulými civilizacemi používány v zemědělství a v počátcích řemeslné výroby. Pyl je možno mikroskopicky pozorovat a hodnotit velikost, tvar, barvu a morfologii povrchu pylových zrn. V dalších kapitolách bude pojednáno detailněji o možnostech chemické analýzy pylových zrn a ostatních rostlinných mikrozbytků.

Archeozoologie

je vědecká disciplína, která studuje zbytky zvířat z archeologických nalezišť, např. kosti, zuby, rohovinu, schránky měkkýšů apod. Jejím cílem je lépe porozumět vztahu člověk-zvíře v minulosti. Archeozoologie využívá a úzce propojuje poznatky přírodovědných a humanitních oborů, přináší např. cenné informace o výživě člověka, které vycházejí z předpokladu, že maso zvířat tvořilo vedle rostlin významnou složku potravy. Nálezy pozůstatků zvířat nemusí nutně souviset pouze s konzumací. Některým zvířatům byl přisuzován také symbolický a rituální význam, ocitala se v roli domácího společníka nebo byla cenným zdrojem surovin (např. kožešin, vlny, mléka). Archeozoologie má řadu specializací a poskytuje řadu výstupů. Předmětem jejího zkoumání nejsou jen pouhým okem viditelné tkáně obratlovců a bezobratlých, ale také jejich DNA, nízkomolekulární organická rezidua, stopové prvky nebo stabilní izotopy obsažené v kostech či zubech.

Dendroekologie a dendrochronologie

Dendroekologie je věda zabývající se působením prostředí na tvorbu letokruhů. Z letokruhových řad je možné některé z faktorů působení prostředí v minulosti určit a objasnit tak některé ekologické aspekty v historii stanoviště. Pro dendrochronologii jsou vhodné dřeviny s roční periodickou činností kambia, tedy

prakticky všechny běžné dřeviny mírného pásma a některé byliny a dřeviny z jiných vegetačních zón, které mají podobnou pravidelnou periodicitu růstu. Dendroekologie dovoluje pochopení dynamiky lesních ekosystémů v dlouhodobém kontextu, detekovat geomorfologické a hydrologické změny stanoviště (svahové pohyby, laviny, záplavy apod.). Dendrochronologie je také často používána v klimatologických studiích. Je jednou z metod napomáhajících objasnit změny klimatu v minulosti s ohledem na časové a místní souvislosti.

Dendrochronologie je metoda datování dřevěných vzorků z historických, archeologických a fosilních nálezů. datování je založeno na porovnávání získaných letokruhových řad ze vzorků se standardními chronologiemi pro jednotlivé druhy dřevin. Křížové datování umožňuje konkrétní určení kalendářního roku, ve kterých jednotlivé letokruhy přirostly. Jedná se o jednu z nejpřesnějších metod datování dřevěných objektů. Pro úspěšné datování vzorku je nutná dostatečná délka letokruhové řady a vhodná regionální standardní chronologie. Rok smýcení stromu lze určit v případě, že je na vzorku zachován podkorní letokruh. Chemická analýza dřevin a dřeva v souvislosti s taxonomií a stářím poskytuje celou řadu zajímavých informací rozebraných v kapitolách zaměřených na hmotnostní spektrometrii (kap. 3.2.1.3), chromatografické techniky (kap. 3.2.2.1 a kap. 3.2.2.2) a techniky umožňující prvkovou analýzu (kap. 3.2.1).

Archeogenetika

Genetika je obor zabývající se zákony dědičnosti v žijících organismech. Na základě informací známých o rodičích dokáže predikovat vlastnosti potomků. V archeogenetice se pracuje opačným směrem. Tento obor odhaluje na základě informací o potomcích vlastnosti předchůdců. Archeogenetika může být tedy definována jako studium lidské minulosti za použití moderních molekulárních metod. Podrobné informace o těchto metodách přináší kapitola 4.1. Zevrubně jsou v knize popisovány migrace starověkých národů, kterými docházelo k přenosu genetických informací mezi tehdejšími kulturami.

Literatura

Hložek M., *Encyklopedie moderních metod v archeologii*,
1. vyd., Libri, 2008 (ISBN: 978-80-7277-230-8).

Soukup V., *Antropologie – Teorie člověka a kultury*. Portál,
s. r. o., 2011 (ISBN: 8073674327, 9788073674328).

3

Analytické metody používané v archeologii a příbuzných oborech

Současná archeologie využívá prakticky všechny dostupné analytické metody. Úkolem této kapitoly je přinést informaci o principech používaných analytických metod a jejich využití pro různé aplikace. Důraz je přitom kladen na to, jaké otázky je možno na základě analytických výsledků v oblasti současné archeologie zodpovědět.

Analytické metody lze rozdělit na chemické (klasické) a instrumentální. U metod chemických při analýze používáme běžné laboratorní sklo, chemikálie, a případně jen velmi jednoduché přístroje (analytické váhy, pH-metr, konduktometr atd.). Naproti tomu instrumentální metody jsou obvykle opřeny o složitější přístroje založené na kombinaci několika fyzikálních a fyzikálně chemických procesů. Pro pochopení principů jednotlivých metod i jejich využití je obecně vhodné uvažovat rozdíly mezi anorganickou a organickou povahou vzorku. Protože v archeologii je takovéto rozdělení komplikovanější z důvodu komplexnosti vzorků a pro detailní průzkum vzorku potřebujeme obvykle udělat analýzu anorganických i organických komponent současně, není dělení metod na anorganické a organické striktní a techniky jsou představovány zejména podle toho, co mohou v archeologickém průzkumu nabídnout ve vzájemné kooperaci a synergii.

3.1 Klasické chemické metody

Lukáš Kučera, Lukáš Richtera, Petr Bednář

3.1.1 Gravimetrie (vážková analýza)

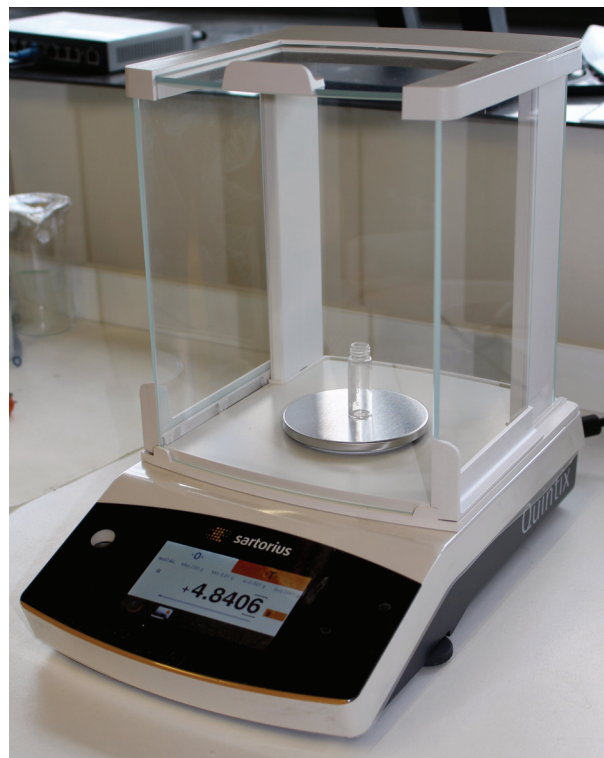
Metoda k analýze využívá vzorku vážení. Lze použít vážení neznámého materiálu a srovnat jej s hmotností odpovídajícího materiálu o známém složení (vlastnostech). **S využitím vážení je například možno určit hustotu neznámé slitiny kovů.** Srovnáním s hustotou slitin se známým složením lze potom odhadnout složení této neznámé slitiny. To je však použitelné u jednoduchých, například dvousložkových slitin (např. Caley, 1952). V tomto případě jde o metodu neinvazivní. Klasickým gravimetrickým postupem je však oddělení sledované látky ze vzorku, převedení na definovanou chemickou formu a její přesné zvážení. Ze zjištěné hmotnosti lze potom vypočítat obsah látky ve vzorku. Metoda se široce využívá zejména v analýze anorganických, ale i organických látek, a je destruktivní. Zejména významná je tato metoda pro přesné stanovení řady kovových prvků, pokud jsou přítomny ve vyšší koncentraci (pro stopovou analýzu gravimetrie vhodná není). Mezi běžně stanovované kovové prvky patří měď, olovo, cín, nikl, kobalt, zinek, železo a stříbro. Postupy pro tato stanovení lze najít např. v knize Holzbechera a kol. (1987). Výhodou gravimetrie je, že k provedení analýzy není potřeba složité technické zázemí. Obvykle postačuje základní laboratorní materiál a pomůcky, sušárna a/nebo muflová pec a analytické váhy. Analytické váhy pracují obvykle s přesností na 4 nebo 5 desetinných míst. Vysoká přesnost a správnost měření (ověřovaná vhodnými standardy) je pro získání spolehlivých výsledků kritická. Moderní analytické váhy měřící s přesností na 4 desetinná místa používané na pracovišti Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci (dále KACH) ukazuje **obrázek 3-1**.

Gravimetricky byl například určen obsah cínu v římských mincích (Dizé, 1790; Pollard, 2013). Zkoumány byly touto technikou i vlastnosti kovových zbytků (bronzu) v archeologických půdách. Vážením byly sledovány úbytky hmotnosti vzniklé rozpouštěním korozních produktů v kovových artefaktech (Hassairi a kol., 2007). Existuje velké množství studií využívajících přímé gravimetrie k analýze různých slitin historického významu, velmi často např. v oblasti numismatiky.¹ Řada těchto numismatických studií však přináší více či méně zavádějící výsledky a jejich relevantnost je proto nutné posuzovat velmi kriticky. Spornou skutečností je i destruktivní povaha této analýzy, která je proto vhodná spíše pro

¹ Více informací o numismatických článcích zabývajících se chemickou analýzou mincí je možné nalézt na stránce cnspg.cz v sekci „O nás“ a „Pro Vás/Databáze“.

méně hodnotné exempláře, poškozené kusy a zlomky. Problematičnost některých studií pramení z nepochopení struktury mincovní slitiny (která je úzce spjata s technologií výroby slitiny a ražby mincí) a z neznalosti jejího aktuálního stavu. **Je totiž nutné rozlišovat pojmy, jako je aktuální (v době analýzy) a originální ryzost (v době ražby).** Typickým a velmi běžným příkladem, kdy gravimetrické stanovení selhává, jsou stříbrné slitiny s původně nižší ryzostí, u nichž došlo díky korozi k citelné ztrátě mědi. Bez znalosti, jaké množství mědi bylo ze slitiny ztraceno, jsou výsledky gravimetrického stanovení zkreslené – výsledky ukazují aktuální ryzost (Richtera a kol., 2011; Kučera a kol., 2018). Rovněž přítomnost některých dalších prvků, které se běžně ve starověkých i středověkých mincích mohou vyskytovat v poměrně vysokých koncentracích (typicky např. Pb, Sb, Bi), mohou výsledky gravimetrické analýzy zkreslovat. Uvedené problémy poměrně jasně dokreslují omezení gravimetrické analýzy, která by proto měla být spíše doplňkovou analytickou metodou pro jednoduchý a explicitně definovaný úkol.

Související technikou je **termogravimetrie (TGA), která sleduje změny ve hmotnosti vzorku, ke kterým dochází při definované se zvyšující teplotě.** Ačkoli lze měření realizovat i poměrně jednoduše, obvykle jsou prováděna pomocí speciálního přístroje (programovatelná pec s integrovanými vahami). TGA byla



Obrázek 3-1 Moderní analytické váhy

použita pro bližší charakterizaci zbytků cihel, omítek a malt v archeologických nálezech. V práci Barona a kol. byla TGA použita pro výzkum stavebního materiálu kostela na Sicílii (Baron a kol., 2004). V jiné práci byl pomocí TGA zjišťován obsah vápence v omítce. K největším ztrátám hmotnosti docházelo v teplotním rozsahu 580–775 °C, což odpovídá uvolnění oxidu uhličitého. Výsledky například ukázaly, že omítková směs, která byla použita pod malby v byzantském kostele v Ananii (Turecko), obsahovala téměř 90 % vápence (Demir a kol., 2018). V roce 2001 se Branda a kol. zaměřili na studium antického pucolánového betonu pomocí TGA. Se vzrůstající teplotou od 400 do 900 °C autoři pozorovali vznik silikátu obohaceného o CaO (analýza pomocí infračervené spektrometrie) a hmotnostní úbytek z důvodu vzniku CO₂ (Branda a kol., 2001). Při zkoumání mineralogického složení keramiky je velmi vhodné kombinovat termogravimetrii s dalšími technikami, jako je rentgenová difrakční analýza (XRD) a skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Další techniky jako optická emisní spektrometrie nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES; ICP-MS) a/nebo rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF) se poté uplatňují při detekci minoritních prvků (Kilic a kol., 2017; Meyvel a kol., 2012). Podobně byly pomocí termogravimetrie zkoumány nálezy hliněných střepů (Issi a kol., 2011) a kůže (Plavan a kol., 2013). Spalovací a termogravimetrické experimenty pomohly charakterizovat nálezy tmavých kostek bohatých na oxidy manganu. Na základě výsledku experimentu byla vyslovena hypotéza, že neandrtálci používali materiály obsahující oxidy manganu pro cílené zapalování ohně (Heyes a kol., 2016). Zajímavým využitím termogravimetrie je stanovení stáří dřeva v archeologických nálezech. Campanella a kol. využili termogravimetrii pro analýzu dřeva z 13., 15. a 17. století. Jejich výzkum poukázal na úzkou spojitost mezi poměrem celulózy a ligninu v souvislosti se stářím dřeva (Campanella a kol., 1991, Campanella a kol., 2003). Termogravimetrie je také jednoduchým způsobem, jak zjistit obsah vody ve zkoumaném vzorku pomocí jeho sušení, resp. žíhání do konstantní hmotnosti. K tomuto účelu je možné použít běžné analytické váhy anebo zvlášť upravené váhy (sušicí váhy, termováhy), které na základě předvolených parametrů proceduru provedou automaticky.²

² Bližší informace jsou dostupné např. na www.levnevahy.cz, detaily viz Literatura.

Literatura

- Barone G., Branca C., Gresta S., Imposa S., Leone A., Majolino D., Geoarcheometric and geophysical methodologies applied to the study of cultural heritage: "St. Agata la Vetere" in Catania (Sicily, Italy), *J. Cult Herit* 2004, 5, 263–271.
- Branda F., Luciani G., Costantini A., Piccioli C., Interpretation of the thermogravimetric curves of ancient pozzolan concrete, *Archaeometry* 43 (4), 447–453.
- Caley E. R., Estimation of Composition of Ancient Metal Objects – Utility of Specific Gravity measurements, *Anal. Chem.* (1952) 24, 676–681.
- Campanella L., Favero G., Rodante F., Tomassetti M., Vecchio S. Thermogravimetric and kinetic methods to date wood finds. First results. *Ann. Chim.* 2003, 93, 897–907.
- Campanella L., Tomassetti M., Tomellini R., Thermoanalysis of ancient, fresh and waterlogged woods, *J. Therm. Anal.* 1991, 37, 1923–1932.
- Demir S., Serifaki K., Böke H., Execution technique and pigment characteristics of Byzantine wall paintings of Anania Church in Western Anatolia, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018, 17, 39–46.
- Dizé M. J. J., Analyse du cuivre, avec lequel les Anciens fabriquaient leurs Médailles, les Instruments tranchans. *Observations sur la Physique, sur l'Histoire Naturelle et sur les Arts* 1790, 36, 272–276.
- Hassairi H., Bousselmi L., Triki E., Ingo G. M., Assessment of the interphase behaviour of two bronze alloys in archaeological soil, *Corros. Mater.* 2007, 58, 121–128.
- Heyes P. J., Anastasakis K., de Jong W., van Hoesel A., Roebroeks W., Soressi M., Selection and Use of Manganese Dioxide by Neanderthals, *Sci. Rep.* 2016, 6, 22159.
- Holzbecher Z., Churáček J. a kol., *Analytická chemie*, SNTL, Praha 1987 (ISBN 04-612-87).
- <https://www.levnehahy.cz/analyzer-vlhkosti-sartorius-ma-35-sid-anv1105-detail>, staženo dne: 29.3. 2021.
- Issi A., Kara A., Alp A. O., An investigation of Hellenistic period pottery production technology from Harabe-bezikan/Turkey, *Ceram. Int.* 2011, 37, 2575–2582.
- Kılıç N. C., Kılıç S., Akgül H. C., An archaeometric study of provenance and firing technology of halaf pottery from Tilkitepe (Eastern Turkey), *Mediterr. Archaeol. Archaeom.* 2017, 17, 35–48.
- Kučera L., Richtera L., Zmrzlý M., Jarošová M., Kučerová P., Bednář P., Determination of the Fineness of Medieval Coins – Evaluation of Methods in the Case Study of a Medieval Pfennig, *Archaeometry* 2018, 60, 325–341.
- Meyvel S., Sathya P., Velraj G., Thermal characterization of archaeological pot sherds recently excavated in Nendunkur, Tamilnadu, India, *Cerâmica* 2012, 58, 338–341.
- Plavan V., Miu L., Gordienko I., Ibragimova A., Gavruluk N., Determination of the Amino Acid Composition, Structure and Properties of the Archaeological Leather Before and After Restoration, *Revista de Chimie* 2013, 64, 603–605.
- Pollard A. M., From Bells to Cannon – The Beginnings of Archaeological Chemistry in the Eighteenth Century, *Oxford J. Archaeol.* 2013, 32, 335–341.
- Richtera L., Zmrzlý M., Videman J., Grossmannová D., Kučera L., Moravské denáry fénikového typu Přemysla Otakara II. z nálezu Třebíč-Borovina (II) a jejich analýza, *Folia Numismatica* 2011, 25.

3.1.2 Volumetrie (odměrná analýza)

Volumetrie je další základní analytická technika. Do skupiny volumetrických technik řadíme všechny postupy, u kterých ze změřeného objemu vypočítáme obsah sloučeniny (nebo skupiny sloučenin s podobnými vlastnostmi), která nás zajímá. V nejjednodušším případě měříme přímo objem látky (např. vhodně oddělené od vzorku). Další možností je ke sledované látce přidávat roztok jiné látky (titrační činidlo). Titrační činidlo s analytem dobře reaguje a rovnováha reakce je posunuta jednoznačně ve prospěch produktu (reakce má vysokou hodnotu rovnovážné konstanty, obvykle $K_{\text{ekv}} \geq 10^6$). Vhodnou reakcí sledujeme, jaké množství (objem) titračního činidla způsobí zreagování všech molekul naší látky. Základní kroky při volumetrické titraci jsou: 1. odvážení/odměření vzorku, 2. příprava roztoku k titraci, 3. titrace, 4. výpočet koncentrace analytu. Při titracích lze použít všech běžných druhů reakcí, tedy reakcí protolytických, komplexotvorných (nejčastěji chelatometrie), srážecích a oxidačně-redukčních. Volumetrie je ekonomickou a dostupnou alternativou pro aplikované laboratoře, ve kterých chybí nákladné instrumentální analytické zázemí.

Pomocí volumetrické analýzy lze například určit množství vody (vlhkosti) oddestilované ze vzorku buď přímo, nebo lépe pomocí azeotropní destilace s organickým nemísitelným rozpouštědlem, např. xylenem nebo benzenem (Fetzer, 1951; Sair a kol., 1942) – principem je měření objemu vody po jejím kvantitativním vydestilování ze vzorku (a v případě azeotropní destilace po rozdělení směsi vody a organického rozpouštědla). Časté je použití volumetrie ke stanovení iontů. Volumetrická titrace byla použita například pro stanovení množství chloridových iontů přítomných v železných artefaktech nalezených v rámci archeologických výzkumů na New Foundlandu. Analýza poskytla informace pro jejich vhodnou konzervaci. Množství chloridů má přímý vztah k procesu koroze. Nálezy byly ponořeny do vodných roztoků hydroxidu sodného (2 % w/v) a ethylendiaminu (2 % w/v). Tento obecně známý postup konzervace materiálů se nazývá desalinace. Chloridy byly vyextrahovány do těchto roztoků a následně stanoveny pomocí argentometrické titrace. Jako titrační činidlo byl použit odměrný roztok dusičnanu stříbrného a bod ekvivalence (objem titračního činidla, kdy právě zreagovaly všechny chloridové ionty přítomné v roztoku) byl určen pomocí potenciometrie, tedy měřením napětí mezi indikační a referentní elektrodou (Selwyn a Argyropoulos, 2005). Argentometrická titrace s určením bodu ekvivalence pomocí měření vodivosti (konduktometrie) byla použita i pro kontrolu odstranění chloridů z objektů nalezených v mořské vodě (Batis a kol., 2015). Stanovení obsahu stříbra ve slitině (např. mincovní) je možné provést pomocí argentometrické titrace. K provedení analýzy je vhodné dbát klasických zásad odběru vzorku, mimo jiné je nutné zohlednit homogenitu slitiny a případnou změnu složení slitiny vlivem ko-

roze. Rovněž navážka zkoumaného materiálu by měla být dostatečně vysoká, aby bylo možné zanedbat chybu při vážení a malé spotřebě titračního činidla. Stejně jako v předchozí stati o gravimetrii může nekritický přístup k provádění analýzy či k interpretaci výsledků vést k chybným závěrům. Např. analýza nízkopakostní slitiny mědi a stříbra, z níž byla vlivem korozních procesů odstraněna téměř veškerá měď, může vést k závěru, že slitina obsahuje 95 % Ag namísto původních 30 % Ag. Naopak přítomnost chloridu stříbrného, tj. poměrně běžného korozního produktu na povrchu předmětů ze stříbra o vysoké ryzosti, může vést ke zjištění nižšího obsahu stříbra, např. 85 % namísto skutečných 95 %.³ Z obou uvedených příkladů je zjevné, že bez znalosti a zohlednění skutečného stavu zkoumané slitiny nelze pomocí jediné metody stanovit původní ryzost zkoumané slitiny, ale výsledkem je (v lepším případě) aktuální ryzost zkoumané slitiny. Zjištění vyššího obsahu stříbra v mincovní slitině, než je jeho skutečný obsah odpovídající originální ryzosti, je běžnější a jeho příkladem může být studie Richtery a kol. (2011). V uvedené studii bylo sérii analýz podrobeno deset exemplářů moravských feniků denárového typu, které byly do značné míry poškozeny korozí. Argentometrickou titrací dle Volharda⁴ byl průměrný obsah stříbra stanoven na 91,4 %, povrchovou RFA analýzou (viz kap. 3.2.1.2) byla průměrná ryzost stanovena na 93,8 % Ag a pomocí povrchové analýzy s využitím energiově disperzního spektrometru, EDS (viz. kap. 3.2.1.1), na 92,3 % Ag. Přestože se takto získané výsledky jeví jako navzájem konzistentní, je zjištěná vysoká ryzost v rozporu s očekávanou ryzostí těchto mincí. Teprve korekce provedené s využitím výsledků hydrostatických zkoušek jednotlivých exemplářů a destruktivních analýz (optická i elektronová mikroskopie metalografického výbrusu na řezu mince) poskytly výsledek přibližně 73,3 % Ag, což je hodnota, která je v dobrém souladu s očekávanou původní ryzostí tohoto typu mince. Právě až zmíněná hydrostatická zkouška a elektronová mikroskopie odhalily hrubé poškození mincovní slitiny vlivem koroze a zásadní úbytek mědi, který měl za následek relativní nárůst obsahu stříbra. Podrobněji byla koncepce vzájemně se doplňujících analýz (včetně využití výsledků volumetrické analýzy) rozpracována a názorně objasněna v případové studii věnované analýze širokého feniku nejisté (rakouské či moravské) provenience (Kučera a kol., 2018).

³ Na uvedený výsledek mají vliv hned dvě skutečnosti. Jednak je analyzovaný předmět díky přítomným chloridům těžší (a tím je obsah stříbra nižší), zároveň je však stříbro vázané v AgCl nerozpustné a tudíž nelze stanovit, což vede ke zjištění ještě nižšího množství stříbra.

⁴ Vzorky byly zmineralizovány zředěnou kyselinou dusičnou (zředění 1 : 1 V/V), vzniklý roztok byl po rozpuštění slitiny zředěn na definovaný objem a alikvotní díl roztoku byl titrován odměrným roztokem thiokyanatanu amonného. Bod ekvivalence byl určen pomocí roztoku síranu amonno-železitého tvorbou barevných komplexů reakcí thiokyanatanových aniontů s železitými kationty.

Literatura

- Batis G., Zacharopoulou A., Zacharopoulou E., Siova H., Argyropoulos V., Dechlorination of large marine iron artifact using a novel technique involving impressed current, *Anti-Corr. Method M.* 2015, 62, 259–269.
- Fetzer W. R., Determination of Moisture by Distillation, *Anal. Chem.* 1951, 23, 1062–1069.
- Kučera L., Richtera L., Zmrzlý M., Jarošová M., Kučerová P., Bednář P., Determination of the Fineness of Medieval Coins-Evaluation of Methods in a Case Study of a Medieval Pfennig, *Archaeometry* 2018, 60, 325–341.
- Sair, L., Fetzer, W. R., The Determination of Moisture in the Corn Wet Milling Industry, Parts I–VI, *Cereal Chem.* 1942, 19, 633–720.
- Selwyn L. S., Argyropoulos V., Removal of Chloride and Iron Ions from Archaeological Wrought Iron with Sodium Hydroxide and Ethylenediamine Solutions, *Stud. Conserv.* 2005, 50, 81–100.
- Richtera L., Zmrzlý M., Videman J., Grossmannová D., Kučera L., Moravské denáry fenikového typu Přemysla Otakara II. z nálezu Třebíč-Borovina (II) a jejich analýza, *Folia Numismatica* 2011, 25.

3.2 Instrumentální metody

Podle fyzikálně-chemického principu je dělíme na optické (zejm. spektrální), separační a elektrochemické.

3.2.1 Metody spektrální

Lukáš Kučera, Lukáš Richtera, Petr Bednář, Vojtěch Zemek, Zbyněk Žingor, Klára Jagošová

Spektrální metody jsou, jak již název napovídá, metody, při kterých měřením získáme spektrum. Velká část spektrálních technik je založena na interakci vzorku se zářením (fotony). Vedle toho jsou k dispozici techniky, u kterých využíváme interakci složek vzorku s elektrony, atomy nebo molekulami a studujeme vlastnosti vznikajících částic. Těmi mohou být rovněž fotony, elektrony, atomy i molekuly. Dále budou v přehledu uváděny techniky, které jsou používány v souvislosti s archeologickým výzkumem a restaurátorstvím. V přehledu optických technik není v samostatné kapitole diskutována spektrofotometrie, která je v současné době kombinována s mikroskopickými a fotografickými technikami se silným přesahem do analýzy uměleckých děl. Tato rozsáhlá problematika bude popsána v dalším díle knihy. V archeologickém výzkumu je však hojně využívána spektrofotometrická analýza obsahu fosfátů v půdě (viditelná oblast spektra), a proto je

této problematice věnována samostatná kapitola 6.6 při analýze reálných vzorků (výplní hrobů).

3.2.1.1 Atomová (optická) emisní (OES) a atomová absorpční spektrometrie (AAS)

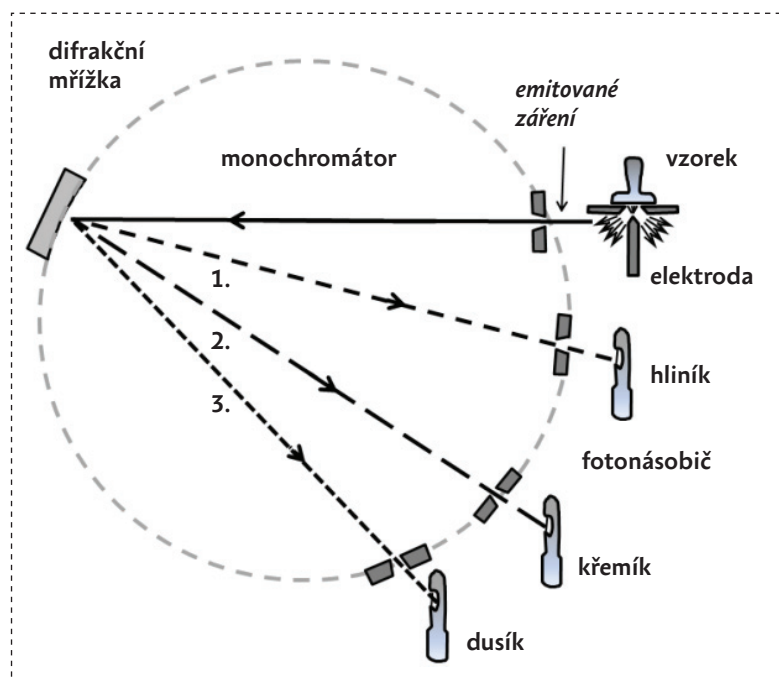
Optická emisní spektrometrie je založena na atomizaci vzorku (tj. jeho rozkladu na jednotlivé atomy), vybuzení získaných atomů vhodnou excitační energií a měření záření, které vybuzené atomy emitují (energie pro excitaci se dodá vhodným plamenem, elektrotermicky, výbojem nebo indukčně vázaným plazmatem). Takto získáme emisní spektrum, které je charakteristické pro přítomné prvky (čímž je detekujeme). Z intenzity charakteristického záření (vybraných spektrálních čar) potom vypočítáme množství příslušných prvků přítomných ve vzorku. Nejčastěji je energie vložena jiskrovým výbojem generovaným mezi elektrodou a kovovým vzorkem. Tím se odpařené atomy dostávají do excitovaného plazmatického stavu (**obrázek 3-2**). Na podobném principu funguje také AAS. Aerosol vzorku je zaveden do plamene nebo grafitového atomizátoru, kde dojde k odpaření a vzniku volných atomů. Vzniklé částice absorbují charakteristické záření procházející plamenem. Dochází tak k úbytku intenzity procházejícího světla a tento úbytek je dán Lambert-Beerovým zákonem. Záření je produkováno speciální výbojkou s dutou katodou vyrobenou ze stejného kovu, který je měřen.

OES byla použita pro studium korozních produktů – patiny na punských bronzových artefaktech nalezených při archeologickém průzkumu v Tharrosu na severní Sardinii (Ingo a kol., 2000). V jiné práci byly řadou technik analyzovány nálezy hrnců z raně mínojské doby (3. tisíciletí př. n. l.) z Kréty. OES byla použita pro analýzu následujících prvků: Na, Mg, Al, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Sr a Ba. Vedle toho byla použita i technika hmotnostní spektrometrie s ionizací indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), která bude popsána později. Získaná data byla zkoumána pomocí analýzy hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA) a bylo dosaženo rozlišení vzorků studovaných nádob ze dvou lokalit (Tsolakidou a Kilikoglou, 2002). OES metody vynikají velkou citlivostí a spolehlivostí. Získaná data jsou obvykle spolehlivá i mezilaboratorně dobře porovnatelná. Profily naměřených prvků bývají databázovány. Velká pozornost je věnována přípravě a použití geologických standardních referenčních materiálů (Hein a kol., 2002).

Technika byla dále použita na římské a punské nálezy olovených bronzových artefaktů (studium patiny, Ingo a kol., 2004), keramické střepy z etruských nálezů v Tarquinii (analýza Ca, Al, Mg, Fe, Ti, Cr, Cu, Ni, Zn, Mn, Zr, Sr, Na, K a Rb a hodnocení dat pomocí PCA a Kohonenových umělých neuronových sítí, Fermo a kol., 2004), kameninové nádoby z východní Asie (Grave a kol., 2005), artefakty nalezené při odkrytí pozdně antické pece (mj. nádoby na vaření, malované nádo-

by) v San Giusto, Lucera, Itálie (Gliozzo a kol., 2005), při hodnocení sedimentů z rané doby bronzové na Slovensku (jako referenční metoda k přenosnému RFA, Gauss a kol., 2013), sledování technologie výroby skla ve středověku (Vandini a kol., 2018) nebo studiu bioeroze archeologických kostí (Tjelliden a kol., 2018). Tento přehled demonstruje všestrannost OES při prvkové analýze.

ICP-OES a hmotnostní spektrometrie s ionizací indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) byly spolu s dalšími technikami použity i ve výzkumu sedimentů bohatých na guano (nahromaděný trus ptáků nebo netopýrů) v „great cave of Niah“ na Borneu, která je jednou z hlavních archeologických lokalit jihovýchodní Asie (Stephens a kol., 2007). ICP-OES analýzy mikrofosilií pomohly určit původ prehistorické kukuřice v severní Americe (Boyd a kol., 2008). Specifickou oblastí, kde se, z logiky věci, ICP-OES významně uplatňuje, je archeometalurgie (Ion a kol., 2008). Middleton a kol. (2010) poukázali na výhody kombinace ICP-OES a GC/MS pro jednoduché srovnávací (screeningové) studie zaměřené na analýzu archeologických povrchů. Častá je kombinace ICP-OES s mikrovlnným rozkladem vzorku. Ta byla použita například v práci Mannina a Orecchia (2011) zaměřené na původ sicilské starověké keramiky. Takto bylo analyzováno 14 minoritních prvků (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ga, Li, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, Tl, Zn) a šest majoritních (Al, Ca, Fe, K, Mg



Obrázek 3-2 Schéma optické emisné spektrometrie (1., 2., 3., rozdělené světelné paprsky s vlnovými délkami pro jednotlivé prvky; excitace prvků elektrickým výbojem; převzato a upraveno z www.shimadzu.com/an/elemental/oes/oes.html).

a Na). Jeden vzorek měl vysoký obsah Cr (3635 mg kg^{-1}) a Ni (1758 mg kg^{-1}), což bylo spojeno s jeho korintským původem.

V archeologických aplikacích bylo použito rovněž elektrotermické odpaření malého množství vzorku s jeho excitací v indukčně vázaném plazmatu (ETV-ICP-OES). Detcheva a kol. (2012) použili tuto techniku pro analýzu bezbarvých i barevných skleněných nálezů (starověké a středověké nálezy v Bulharsku). **Z výsledků bylo možno určit typ skla, použitá tavidla, barvicí a odbarvovací činidla a odhadnout použitou recepturu.** Perspektivní archeologickou a forenzní aplikací ICP-OES se jeví analýza zubních výplní u nálezů kosterních pozůstatků. Analýza poměru řady prvků dovoluje určit typ zubní výplně (např. měděný amalgám, stříbrný amalgám, cement tvořený fosfátem zinečnatým, silikátové cementy apod.). Metoda byla použita při studiu kosterních pozůstatků na předměstí Bělehradu. ICP-OES přispělo k poznání, že kosterní pozůstatky patřily německým vojákům zabitým v Srbsku během 2. světové války (Zelic a kol., 2013). Možnosti prvkové analýzy dřevěných materiálů ukázali Broda a Frankowski (2017). Analyzovali promáčené archeologické dřevo z jezera Lednica (Polsko) a určili obsah Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Si, Ti, V a Zn. **Znalost prvkového složení dřeva je významná nejen pro jeho bližší charakterizaci (včetně environmentálních souvislostí), ale zejména pro volbu optimálního restaurátorského a konzervačního zásahu.** Velmi zajímavá je nedávná studie Mortensena a kol. (2019) zabývající se stárnutím dřeva. Charakteristickým rysem nejen této studie je synergická kombinace dat z řady použitých analytických technik. Vedle ICP-OES byla využita rentgenová fluorescenční spektrometrie, rentgenová difrakce, skenovací elektronová mikroskopie s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, kapalinová chromatografie s vodivostní detekcí a pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a *in situ* silylací s hexamethyldisilazanem. O těchto technikách je pojednáno v dalších kapitolách.

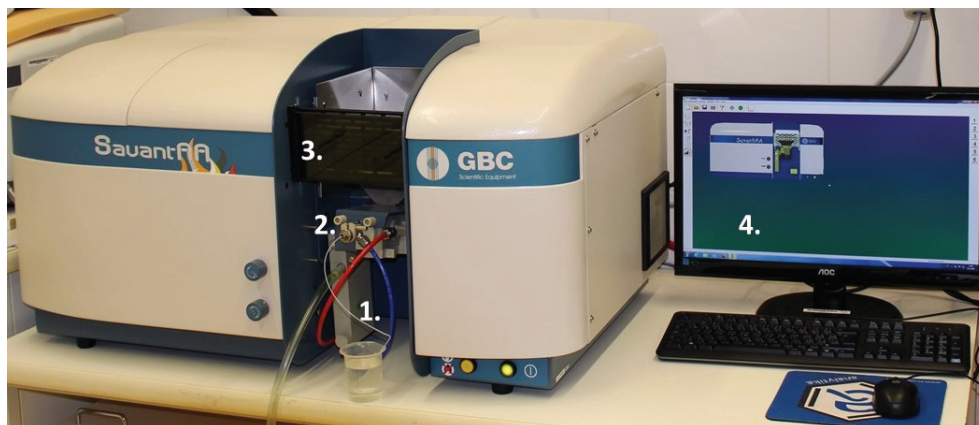
Zajímavou možností je použití spektrometrie laserem buzeného plazmatu (LIBS). U této techniky je materiál ablatován z povrchu vzorku pomocí laserových pulzů. Vzniklé mikromnožství atomů přítomných prvků je excitováno a nachází se v plazmatickém stavu. Měří se emisní záření uvolněné při deexcitaci těchto atomů. Technika byla použita pro řadu aplikací včetně analýzy archeologických materiálů, jak popisují přehledové články (Lee a kol., 2004; Fisher a kol., 2004 a 2005; Carter a kol., 2009, 2011, 2012, 2013, 2015). Snad až příliš optimisticky vyznívá práce Belkova a kol. (2007), který demonstruje možnost analýzy pevných a kapalných vzorků bez kalibrace. Autoři dále uvádí, že metoda je „blízká nedestruktivním metodám“, protože ablatované množství materiálu je velmi malé (pozn. editora: toto nelze bohužel paušalizovat a vždy záleží na konkrétním typu

vzorku). LIBS byla rovněž použita pro analýzu poměru Mg/Ca v lasturách měkkýšů v archeologických a geologických nálezech. Poměr Mg/Ca je možno do určité míry korelovat s teplotou mořské vody v době života měkkýšů (s ohledem na druh měkkýše a lokalitu výskytu) a poskytuje i zajímavé informace pro studium způsobu stravování prehistorických společností (Garcia-Escarzaga a kol., 2018). LIBS technika byla použita také na analýzu sasánovských mincí. Na povrchu těchto mincí byla detekována rtuť, což je poněkud neobvyklé. Na několika různých mincích byla provedena mikroablace za účelem určení tloušťky této vrstvy a zároveň stanovení koncentrace sedmi prvků – Hg, Au, Si, Cu, Pb, Ag, Ca (Gaudiuso a kol., 2019).

Atomová absorpční spektrometrie byla využita například pro studium složení mincovní slitiny. Nespornými výhodami této metody jsou naprosto minimální požadavky na množství vzorku a obecně vysoká citlivost. Přesto, že se jedná o metodu destruktivní, minimální nároky na množství vzorku umožňují využití nepatrných úlomků hrany menších mincí či nabízejí možnost opatrného odvrtání malého množství vzorku z hrany mince.⁵ Bohužel, stejně jako v řadě již dříve zmíněných případů, se lze setkat s nevhodným využitím této techniky či s její chybnou interpretací. Stejně jako v předchozích případech je shodným markantem těchto chyb opět neznalost, nepochopení či přehlédnutí specifík pramenících z výroby mincovní slitiny, z výroby mincí samotných a z korozních procesů, kterým mince podléhají. Z výhody se tak snadno stává nevýhoda. Hrana mince je tím nejméně vhodným místem k odběru vzorku. U dobře zachovaných stříbrných mincí s nižší ryzostí je hrana mince místem ze tří stran obklopeným kovem vyšší ryzosti (z důvodu využívání technologie bělení) a výsledný obsah stříbra tak logicky vychází nadhodnocený. Podobný výsledek, ale zatížený ještě větší chybou, lze získat analýzou mincí poškozených korozí, u nichž došlo k výraznější ztrátě mědi. Opět tedy platí, že pokud není dostatečně přesvědčivě zdokumentován stav analyzované mincovní slitiny, nelze výsledky AAS analýzy považovat za relevantní. Metoda AAS byla koncem 60. let nebo na počátku 70. let 20. století použita k analýze pěti pražských grošů Vladislava II. Jagellonského (odebráno 50–100 mg vzorku) a jednoho pražského groše Ludvíka Jagellonského (odebráno cca 30 mg). V této studii byl využit přístroj Techtron AA-4 (Techtron Appliances). Autoři této studie (Hásková a Polívka, 1971) si zřejmě již tehdy velmi dobře uvědomovali problematiku nehomogenity mincovní slitiny, neboť uvádí: „Mince byly zkoušeny jako celek, tj. nebyl zkoumán zvlášť povrch a vnitřek ražby“. Je ovšem velká škoda, že tuto dobrou znalost uvedené problematiky ve své práci plnohodnotně nezúročili. Není totiž možné jednoznačně doložit, že poměr množství odebraných

⁵ I přesto, že množství potřebného vzorku z hrany mince může být zdánlivě minimální a laickému oku může přijít nepozorovatelné, je nutné vždy a za všech okolností odběr vzorku slitiny z hrany mince předem konzultovat s odborníkem.

vzorků z povrchové a vnitřní vrstvy správně odrážel distribuci kovů ve studovaném mincovním materiálu. Uvedená tvrzení, tj. že zjištěné ryzosti jsou v souladu s očekávanými ryzostmi, jsou tak spíše než bezchybnými výsledky šťastnou shodou okolností. Podobně interpretačně diskutabilní jsou i závěry AAS analýz celkem 23 mincí z denárového depotu z raně středověkého pohřebiště z Vrbna u Mělníka (Nechvátal a kol., 2010). V této studii je, co se stavu numismatického materiálu a odběru vzorků z tohoto materiálu týče, doslova uvedeno: „...byly silně zkorodovány...“ a „Navážka ~ 50 mg vzorku (odebráno z okraje mince)...“. Ani tyto samotnými autory výslovně uvedené skutečnosti je nenabádají k opatrnosti při interpretaci získaných výsledků a na základě zcela chybných závěrů (zkoumaným denárům na základě chybně interpretovaných analýz přisuzují více jak 2× vyšší obsah stříbra) nekriticky navrhuji přehodnocení stávající relativní chronologie: „Analýzy jsou nejen cenným příspěvkem, ale současně i podnětem k zamyšlení, zda následné řazení jednotlivých typů není někdy spíše mechanické než chronologické. Budou jistě podkladem nejen dalšího studia, ale rozšíří základnu našeho poznání.“ Podrobnější diskusi týkající se chybných předpokladů a závěrů této práce lze nalézt ve studii věnované denáru Jindřicha Břetislava z nálezů u Mělníka (Videman a kol., 2014). Přes uvedené problematické aspekty, které je však v plné míře nutné přisuzovat nevhodnému odběru vzorku či špatné interpretaci naměřených dat, představuje metoda **AAS díky obecně příznivým detekčním limitům (jednotky µg/ml) cennou a přínosnou techniku**, jejíž potenciál ještě nebyl pro potřeby analýz numismatického materiálu plně doceněn. Metoda AAS může být např. velice vhodnou a pohodlnou alternativou pro zjištění koncentrací minoritních a stopových prvků v roztocích po čištění a desalinaci mincí a dalších kovových artefaktů. Využít ji lze např. i pro zjištění koncentrací stopových prvků, jejichž přítomnost v některých případech dovoluje usuzovat na původ použitého kovu (pro tyto účely je však vhodnější a spolehlivější izotopická analýza). **Obrázek 3-3** ukazuje přístroj umožňující emisní i absorpční atomovou analýzu většiny kovových prvků s atomizací/excitací plamenem.



Obrázek 3-3 Přístroj pro emisní i absorpční prvkovou analýzu (1. kapilára nasávající vzorek, 2. zmlžovač vzorku, 3. ochranná přepážka, za kterou hoří plamen, ve kterém dochází k atomizaci, resp. emisi, 4. řízení přístroje a sběr dat počítačem se specializovaným softwarem, laboratoř KACH)

Literatura

- Belkov M. V., Burakov V. S., Kinis V. V., Raikov S. N., in Matvienko G. G., Ivanov A. P., Nikitin P. I., Voropay E. S., Khodasevich M. A., Panchenko V. Y., Golubev V. S. (eds.), Calibration-free laser-induced plasma spectrometry for direct analysis of solid and liquid materials, International Conference on Lasers, Applications and Technologies 2007: Environmental Monitoring and Ecological Applications, Optical Sensors in Biological, Chemical and Engineering Technologies and Femtosecond Laser Pulse Filamentation, Proceedings of SPIE, 2007, sv. 6733.
- Boyd M., Varney T., Surette C., Surette J., Reassessing the northern limit of maize consumption in North America: stable isotope, plant microfossil, and trace element content of carbonized food residue, *J. Archaeol. Sci.* 2008, 35, 2545–2556.
- Broda M., Frankowski M., Determination of the content of selected elements in medieval waterlogged oak wood from the Lednica lake – a case study, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 24, 23401–23410.
- Carter S., Fisher A. S., Goodall P. S., Hinds M. W., Lancaster S., Shore S., Atomic spectrometry update. Industrial analysis: metals, chemicals and advanced materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2009, 24, 1599–1656.
- Carter S., Fisher A. S., Goodall P. S., Hinds M. W., Lancaster S., Shore S., Atomic spectrometry update. Industrial analysis: metals, chemicals and advanced materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26, 2319–2372.
- Carter S., Fisher A. S., Hinds M. W., Lancaster S., Atomic spectrometry update. Industrial analysis: metals, chemicals and advanced materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2012, 27, 2003–2053.
- Carter S., Fisher A. S., Hinds M. W., Lancaster S., Marshall J., Atomic spectrometry update. Review of advances in the analysis of metals, chemicals and materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2013, 28, 1814–1869.

- Carter S., Fisher A., Garcia R., Gibson B., Lancaster S., Marshall J., Whiteside I., Atomic spectrometry update. Review of advances in the analysis of metals, chemicals and functional materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2015, 30, 2249–2294.
- Detcheva A., Hassler J., Georgieva R. Feasibility of ETV-ICP-OES for Characterization of Archaeological Glasses, *Anal. Lett.* 2012, 45, 603–612.
- Fermo P., Cariati F., Ballabio D., Consonni V., Gianni G. B., Classification of ancient Etruscan ceramics using statistical multivariate analysis of data, *Appl. Phys. A – Mater.* 2004, 79, 299–307.
- Fisher A., Goodall P., Hinds M. W., Nelms S. N., Penny D. M., Atomic spectrometry update. Industrial analysis: metals, chemicals and advanced materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 1567–1595.
- Fisher A. S., Goodall P. S., Hinds M. W., Penny D. M., Atomic spectrometry update. Industrial analysis: metals, chemicals and advanced materials, *J. Anal. At. Spectrom.* 2005, 20, 1398–1424.
- Garcia-Escarzaga A., Clarke L., Gutierrez-Zugasti I., Gonzalez-Morales M. R., Martinez M., Lopez-Higuera J. – M., Cobo A., Mg/Ca profiles within archaeological mollusc (*Patella vulgata*) shells: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Compared to Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 2018, 148, 8–15.
- Gaudiuso R., Uhlir K., Griesser M., Micro-invasive depth profile analysis by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): The case of mercury layers on Sasanian coins, *J. Anal. At. Spectrom.* 2019, 34, 2261.
- Gauss R. K., Batora J., Nowaczinski E., Rassmann K., Schukraft G., The Early Bronze Age settlement of Fidvár, Vráble (Slovakia): reconstructing prehistoric settlement patterns using portable XRF, *J. Archaeol. Sci.* 2013, 40, 2942–2960.
- Gliozzo E., Fortina C., Turbanti I. M., Turchiano M., Volpe G., Cooking and painted ware from San Giusto (Lucera, Foggia): The production cycle, from the supply of raw materials to the commercialization of products, *Archaeometry* 2005, 47, 13–29.
- Grave P., Lisle L., Maccheroni M., Multivariate comparison of ICP-OES and PIXE/PIGE analysis of east Asian storage jars, *J. Archaeol. Sci.* 2005, 32, 885–896.
- Hásková J., Polívka E., *Pražské groše z let 1471–1526: Vladislav II. – Ludvík I.* Hradec Králové: Česká numismatická společnost, 1971.
- Hein A., Tsolakidou A., Iliopoulos I., Mommsen H., Garrigos J. B. I., Montana G., Kilikoglou V., Standardisation of elemental analytical techniques applied to provenance studies of archaeological ceramics: an inter laboratory calibration study, *Analyst* 2002, 127, 542–553.
- Ingo G. M., Calliari I., Dabala M., Bultrini G., de Caro T., Chiozzini G., Microchemical study of the corrosion products on ancient bronzes by means of glow discharge optical emission spectrometry, *Surf. Interface Anal.* 2000, 30, 264–268.
- Ingo G. M., Angelini E., De Caro T., Bultrini G., Calliari I., Combined use of GDOES, SEM plus EDS, XRD and OM for the microchemical study of the corrosion products on archaeological bronzes, *Appl. Phys. A – Mater* 2004, 79, 199–203.
- Ion R. M., Boros D., Ion M. L., Dumitriu I., Radu-Claudiu F., Constantin R., Florea G., Bercu C., Combined spectral analysis (EDXRF, ICP-AES, XRD, FTIR) for characterization of bronze Roman Mirror, *Metal. Int.* 2008, 13, 61–65.
- Lee W. B., Wu J. Y., Lee Y. I., Sneddon J., Recent applications of laser-induced breakdown spectrometry: A review of material approaches, *Appl. Spectrosc. Rev.* 2004, 39, 27–97.

- Mannino M. R., Orecchio S., Chemical characterization of ancient potteries from Himera and Pestavecchia necropolis (Sicily, Italy) by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES), *Microchem. J.* 2011, 97, 165–172.
- Middleton W. D., Barba L., Pecci A., Burton J. H., Ortiz A., Salvini L., Rodriguez Suarez R., The Study of Archaeological Floors: Methodological Proposal for the Analysis of Anthropogenic Residues by Spot Tests, ICP-OES, and GC-MS, *J. Archaeol. Method Theory* 2010, 17, 183–208.
- Mortensen M. N., Chaumat G., Gambineri F., Kutzke H., Lucejko J. J., McQueen C. M. A., Modugno F., Tamburini D., Taube M., Climatically Induced Degradation Processes in Conserved Archaeological Wood Studied by Time-lapse Photography, *Stud. Conserv.* 2019, 64, 115–123.
- Nechvátal B. (technická spolupráce František Bek a Vladimír Sychra): Atomová absorpční analýza denárového depotu z raně středověkého pohřebiště z Vrbna u Mělníka, Památce Jarmily Háskové 1936–2008, *Archaeol. Hist.* 35, 2010, 451–461.
- Stephens M., Roberts R. G., Lian O. B., Yoshida H., Progress in optical dating of guano-rich sediments associated with the deep skull, west mouth of the great cave of Niah, Sarawak, Borneo, *Quat. Geochronol.* 2007, 1–4, SI, 330–336.
- Tjellden A. K. E., Kristiansen S. M., Birkedal H., Jans M. M. E., The pattern of human bone dissolution—A histological study of Iron Age warriors from a Danish wetland site, *Int. J. Osteoarchaeol.* 2018, 28, 407–418.
- Tsolakidou A., Kilikoglou V., Comparative analysis of ancient ceramics by neutron activation analysis, inductively coupled plasma-optical-emission spectrometry, inductively coupled plasma-mass spectrometry, and X-ray fluorescence, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 374, 566–572.
- Vandini M., Chinni T., Fiorentino S., Galuskova D., Kankova H., Glass production in the Middle Ages from Italy to Central Europe: the contribution of archaeometry to the history of technology, *Chem. Pap.* 2018, 72, 2159–2169.
- Videman J., Richtera L., Zmrzlý M., Denár Břetislava III. Jindřicha nalezený u Mšena. In: Videman J., Richtera L., Zmrzlý M., *Numismatické listy*, Praha: Národní muzeum, roč. 69, č. 3–4 (2014), s. 117–132.
- Zelic K., Djonc D., Neskovic O., Stoilkovic M., Nikolic S., Zivkovic V., Djuric M., Forensic or Archaeological Issue: Is Chemical Analysis of Dental Restorations Helpful in Assessing Time Since Death and Identification of Skeletonized Human Remains?, *J. Forensic Sci.* 2013, 58, 1284–1288.

3.2.1.2 Metody využívající rentgenové záření

Techniky využívající rentgenové záření mohou v případě kovových vzorků zkoumat jejich patinu a vrstvy blízko jejich povrchu, aniž by došlo k destrukci studovaného materiálu. Vzhledem k jejich nízkému průniku do středu (jádra) vzorku nedají informaci o celém materiálovém složení předmětu. Nejčastěji se využívá rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS), rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), spektroskopie částicově indukované emise rentgenového záření (PIXE) a rentgenová prášková difrakce (XRPD) (Kučera a kol., 2018; Kučera a kol., 2021; Manukyan a kol., 2019; Keturakis a kol., 2016). S využitím XPS lze měřit energii elektronů, které jsou z atomu prostřednictvím fotoelektrického jevu emitovány. Pomocí charakteristických vazebných energií je možné stanovit prvky ve zkoumaném vzorku. Kromě fotoelektrických elektronů jsou emitovány také elektrony Augerovy, jejichž energie není závislá na zdroji budicího záření. V případě Augerova jevu dochází k zaplnění díry po elektronu z vnitřní hladiny elektronem z hladiny vnější, přičemž uvolněná energie může vést k emisi Augerova elektronu, jehož kinetická energie odpovídá diferenci mezi energií počátečního iontu a dvojnásobně nabitého iontu na konci procesu. Jako budicí zdroj je obvykle využíváno nízkoenergetické rentgenové záření. Tyto fotony urazí v pevných materiálech řádově jednotky μm a jedná se tedy o metodu, kterou je možné měřit prakticky pouze povrch zkoumaného materiálu (Moulder a kol., 1992). Další technikou používající rentgenové záření je XRF. U této metody je vzorek ozářen rentgenovým zářením, které způsobí ionizaci atomu – vyrazení elektronu ze slupky blízko jádra, nejčastěji slupky K, L, M. Tento stav je nestabilní a vzniklá díra je následně zaplněna elektronem z vyšší slupky, přičemž dojde k vyzaření energie ve formě fotonů, která odpovídá diferenci mezi jednotlivými energetickými hladinami elektronů. Energie těchto fotonů je charakteristická pro jednotlivé prvky, čímž lze získat kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku. Spolu s fluorescencí se vyskytuje konkurenční proces, kterým je tvorba Augerových elektronů. Účinnost fluorescence je charakterizována fluorescenčním výtěžkem, který je definovaný jako poměr počtu fluorescencí emitovaných fotonů vůči počtu počátečních vakancí. Výtěžek fluorescence je závislý na protonovém čísle a pro lehké prvky je velmi malý. Z tohoto důvodu metoda XRF poskytuje pro jejich analýzu pouze nízkou citlivost. Rentgenové záření pronikne do hloubky desítek mikrometrů, což je více než u skenovací elektronové mikroskopie, nicméně i při průniku do této hloubky mohou být výsledky zkresleny povrchovým obohacením kovu jako například při analýze mincí prošlých procesem „bělení“ (Kučera a kol., 2018, Brouwer, 2010, Mestek, 2010). **Metodu XRF lze použít například pro semikvantitativní analýzu mince před použitím destruktivních metod.**

V případě mince, u které je domněnka, že by mohla být ze slitiny orichalcum,⁶ je pro potvrzení či vyvrácení vhodné použít metodu XRF pro dokázání přítomnosti zinku. Analýza povrchu mincí z orichalca ukázala jako hlavní složky slitiny měď a zinek spolu s železem, olovem a cínem. Dále byly přítomny chloridové ionty a v důsledku porozity horní korozní vrstvy byla u mincí zaznamenána přítomnost exogenních prvků z půdy, konkrétně Ca, S, Si, Al, P a Mn (Di Fazio a kol., 2019; Crosera a kol., 2019). V současné době je ve velké oblibě analýza obsahu fosfátů v půdních vzorcích a keramice pomocí energiově disperzního XRF (ED-XRF, resp. přenosného XRF, **obrázek 3-4**).

Problém u tohoto typu měření je v obsahu vápníku, jehož K linie je v blízkosti K linie fosfátu. Ve spektru je tedy signál fosforu v incidenci se signálem vápníku, což prakticky znemožňuje jeho stanovení. **V případě, že je obsah fosforu menší než jedno procento, je nutné k výsledkům přistupovat velmi kriticky** (Hunt a Speakman, 2015) a případně zvolit jinou metodu stanovení (např. extrakci dle Mehlich a následnou spektrofotometrii, která je popisována v aplikační kapitole 6.6, nebo vlnově disperzní XRF, WD-XRF, která má vyšší rozlišení v porovnání s ED-XRF). K analýze kovových artefaktů, typicky mincovního materiálu, je možné použít i částicově indukovanou emisi rentgenového záření (PIXE). Tato metoda pracuje na principu bombardování atomů nabitými těžkými částicemi, jejichž energie se pohybuje v řádu MeV, přičemž dojde k vyrazení elektronu. Při zaplnění mezery po tomto elektronu dochází ke vzniku charakteristického rentgenového záření anebo emisi Augerova elektronu. Pro bombardování jsou obvykle používány protony anebo α částice. Kromě vzniku charakteristického rentgenového záření pro jednotlivé prvky dochází též ke vzniku kontinuálního spektra brzděného rentgenového záření a γ záření, které je součástí šumu. **Metoda PIXE je vhodná pro analýzu stopových množství**, jelikož je zde mnohem menší míra šumu než při bombardování elektrony. Maximální dosažitelná hloubka při analýze metodou PIXE je přibližně 100 mikrometrů. Hlubší analýza není praktická, částice o energii nad 5 MeV mají za následek aktivaci mědi a vzorek musí být izolován po dobu než klesne radioaktivita (Manukyan a kol., 2019; Ishii, 2019).

Speciálním případem technik využívajících rentgenové záření je elektronová mikroskopie, která je velmi často kombinována s energiově disperzní spektroskopií (EDS). Mikroskopy můžeme na základě „osvitu“ vzorku dělit na běžně známé optické (světelné/ultrafialové) a elektronové. Rozlišení optického mikroskopu je značně sníženo difrakcí, což je u elektronového mikroskopu výrazně potlačeno tím, že jako zdroj využívá elektrony. Jelikož elektronové mikroskopy pracují při menší vlnové délce, projevují se negativní účinky difrakce až při mnohem menších

⁶ Jedná se o kov zmiňovaný v mnoha antických textech včetně zmínek o bájně Atlantidě. V numismatice je jako orichalcum označována slitina zlata a bronzu.

rozměrech zkoumaných objektů. Elektronové mikroskopy lze ještě rozdělit na rastrovací (SEM) a transmisní (TEM). SEM funguje na principu detekce sekundárních elektronů z interakce primárních elektronů s povrchem vzorku a/nebo zpětně odražených elektronů, zatímco TEM detekuje elektrony vzorkem prošlé (Akhtar a kol., 2018). Dopad elektronu může mít za následek vyrazení dalšího elektronu a při následném zaplnění jiným elektronem dojde k emisi rentgenového záření. **Při SEM s EDS je možné pomocí SEM získat detailní morfologické informace a prostřednictvím EDS chemickou analýzu povrchu** (Girao a kol., 2017; Papp a Kovács, 2013). Další možností je kombinace elektronového mikroskopu s vlnově-disperzní spektroskopií (WDS), která ovšem není tak běžná z důvodu nutné volby vhodné vlnové délky pro konkrétní typ měření (Hess a kol., 2018). Autoři He a kol. analyzovali pomocí SEM/EDS mince ze slitiny stříbra a mědi vyražené v roce 2006, jejichž ryzost byla 925/1000 stříbra. Na povrchu mince byla zjištěna přítomnost drobných útvarů (teček). Větší zvětšení, 2000× až 50000×, určilo jako původce vzniku většiny útvarů přítomných na minci výrobní proces mince. Metodou EDS zjištěné složení okolí teček se nelišilo od složení okolí, nicméně jedna ze zjištěných teček vykazovala velké zastoupení kyslíku a křemíku, což mohlo poukazovat na přítomnost oxidu křemičitého, který se mohl do mince dostat. Dále bylo na studované minci zjištěno, že jak na povrchu mědi, tak i stříbra, dochází k adsorpci kyslíku a oxidu uhličitého. Rozložení těchto prvků na povrchu mince

Obrázek 3-4 Přenosný přístroj pro rentgenovou fluorescenční analýzu (vložený obrázek ukazuje měření ve statickém módu, umožňující zlepšit spolehlivost výsledků; laboratoř KACH)



je homogenní, což je v kontrastu s nerovnoměrným rozložením mědi a stříbra. Obsah kyslíku může být navýšen interakcí vlhkosti s adsorbovaným kyslíkem prostřednictvím hydroxylových skupin (He a kol., 2011). Vedle analýzy kovových artefaktů je možné SEM využít pro analýzu dalších historických vzorků jako například polychromovaných vrstev na uměleckých objektech (Ménager a kol., 2021, van der Werf a kol., 2013).

Literatura

- Akhtar K., Khan S. B., Khan S. A., Asiri A. M., Scanning electron microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization, In: Sharma, Surender Kumar (ed.), *Handbook of Materials Characterization*, Springer International Publishing, 2018, str. 113–145.
- Brouwer P., Theory of XRF – Getting acquainted with principles, *PANalytical B.V.* 2010 (staženo ze stránek <https://home.iiserb.ac.in/~ramyasr/files/Manuals/XRF.pdf>, datum stažení: 23.3.2021).
- Crosera M., Baracchini E., Prenesti E., Giacomello A., Callegher B., Oliveri P., Adami G., Elemental characterization of surface and bulk of copper based coins of Byzantine-period by means of spectroscopic techniques, *Microchem. J.* 2019, 147, 422–428.
- Di Fazio M., Felici A. C., Catalli F., De Vito C., Microstructure and chemical composition of Roman orichalcum coins emitted after the monetary reform of Augustus (23 B. C.), *Sci. Rep.* 2019, 9, 12668.
- Girao A. V., Caputo G., Ferro M. C., Application of Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (SEM-EDS), *Compr. Anal. Chem.* 2017, 75, 153–168.
- He L., Liang J., Zhao X., Jiang B., Corrosion behavior and morphological features of archeological bronze coins from ancient China, *Microchem. J.* 2011, 99, 203–212.
- Hess M., MacDonald L. W., Valach J., Application of multi-modal 2D and 3D imaging and analytical techniques to document and examine coins on the example of two Roman silver denarii, *Herit. Sci.* 2018, 6, 5.
- Hunt A. M. W., Speakman R. J., Portable XRF analysis of archaeological sediments and ceramics, *J. Archaeol. Sci.* 2015, 53, 626–638.
- Ishii K., PIXE and Its Application to Elemental Analysis, *Quantum Beam. Sci.* 2019, 3, 12.
- Keturakis C. J., Notis B., Blenheim A., Miller A. C., Pafchek R., Notis M. R., Wachs I. E., Analysis of corrosion layers in ancient Roman silver coins with high resolution surface techniques, *Appl. Surf. Sci.* 2016, 376, 241–251.
- Kučera L., Richtera L., Zmrzlý M., Jarošová M., Kučerová P., Bednář P. Determination of the Fineness of Medieval Coins – Evaluation of Methods in the Case Study of a Medieval Pfennig, *Archaeometry* 2018, 60, 325–341.
- Kučera L., Rozsypal J., Bednář P., Březina M., Kalina L., Bezdička P., Mašláň M., Richtera L., „Gold Corrosion“: An alternative source of red stains on gold coins, *Materialia*, 2021, 101025.

- Manukyan K., Fasano C., Majumdar A., Peaslee G. F., Raddell M., Stech E., Wiescher M., Surface Manipulation techniques of Roman denarii, *Appl. Surf. Sci.* 2019, 493, 818–828.
- Ménager M., Fernandez Esquivel P., Sibaja Conejo P., The use of FT-IR spectroscopy and SEM/EDS characterization of slips and pigments to determine the provenances of archaeological ceramics: The case of Guanacaste ceramics (Costa Rica), *Microchem J.* 2021, 162, 105838.
- Mestek O., Stanovení prvků pomocí přenosného rentgenově fluorescenčního analyzátoru, Pracovní text pro Podzemní výukové středisko Josef, Ústav analytické chemie VŠCHT, Praha 2010.
- Moulder J. F., Stickle W. F., Sobol P. E., Bomben K. D., Handbook of X-Ray photoelectron spectroscopy, Perkin-Elmer Corporation, Eden Prairie, 1992.
- Papp Z. J., Kovács I., Surface analysis of modern Silver coin: SEM/EDS measurements, *Rev. Roum. Chim.* 2013, 58, 65–67.
- van der Werf I. D., Calvano C. D., Laviano R., Simonetti A., Sabbatini L., Multi-technique chemical characterisation of a 12–13th-century painted Crucifix, *Microchem J.* 2013, 106, 87–94.

3.2.1.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika umožňující separaci složek vzorku a jejich identifikaci. Je založena na ionizaci složek vzorku v iontovém zdroji (složky jsou převedeny na kladně nebo záporně nabitě ionty s lichým nebo sudým počtem elektronů), jejich separaci v analyzátoru a detekci separovaných složek v detektoru. Tímto procesem vzniká záznam charakteristický pro daný vzorek – hmotnostní spektrum. Systematický popis všech typů používaných iontových zdrojů a analyzátorů přesahuje rámec této knihy a podrobnější informace lze získat v řadě moderních učebnic (např. Gross, 2017). Principy nejdůležitějších typů těchto součástí budou však diskutovány v příslušných kapitolách v kontextu jejich využití v archeologii, s ohledem na způsob úpravy vzorku a informace, které můžeme analýzou získat. MS lze používat buď samostatně, a v tom případě je označována jako přímá MS, nebo v on-line spojení s vhodnou separační technikou (chromatografickou nebo elektroforetickou). Přímá MS je obecně považována za jednodušší z pohledu úpravy vzorku i interpretace dat. Na druhou stranu, v řadě případů analýzy složitějších vzorků (s velkým obsahem balastních látek a/nebo nízkým obsahem analytů) nemusí být přímá MS dostatečně selektivní a získaná data nemusí být dostatečně spolehlivá. Potom je nutné zvýšit selektivitu předřazením separační techniky. Tyto spojené techniky jsou podrobněji diskutovány v kapitolách 3.2.2.1 a 3.2.2.2 zaměřených na plynovou a kapalinovou chromatografii. V této kapitole jsou diskutovány zejména techniky přímé MS pro analýzu kovů (hmotnostní spektrometrie s ionizací indukčně vázaným plazmatem, ICP-MS) a pro analýzu organických látek (hmotnostní spektrometrie s lase-

rovou desorpční-ionizací, LDI-MS, případně s účastí matrice, MALDI-MS; ionizací elektrosprejem, ESI-MS a desorpčním elektrosprejem, DESI-MS; s přímou sondou, ASAP-MS a hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s analyzátozem doby letu, SIMS-TOF). Selektivitu MS analýzy a identifikační možnosti lze dále zvýšit integrací iontově mobilní separace (IMS) do hmotnostního analyzátoru. IMS umožňuje separaci látek podle velikosti a tvaru jejich molekul (podle jejich tzv. kolizního průřezu, ccs hodnoty). Více informací o této možnosti podává review Paglia a kol., 2021.

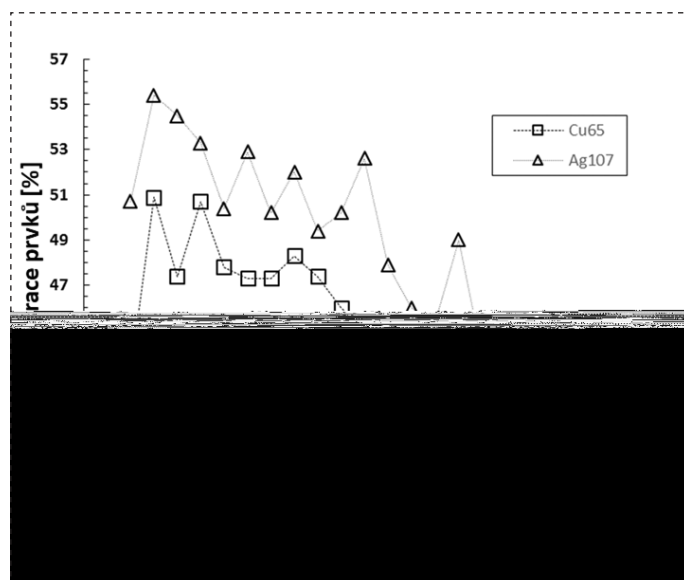
Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu kovových materiálů a jejich reziduí zažilo v posledních letech rozmach právě díky spojení s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). V prvním kroku jsou z kapalného vzorku vytvořeny ionty nacházející se v plynném skupenství. V případě, že je potřeba analyzovat pevný materiál, je ICP spojeno s laserovou ablací (LA). Laserová ablace způsobí při vhodně zvolené energii a šířce laserového svazku jen malou destrukci zkoumaného předmětu a bývá proto řazena mezi mikroinvasivní metody. Zmlžený kapalný nebo ablatovaný vzorek je proudem argonu veden do hořáku, ve kterém je pomocí radiofrekvenčního magnetického pole udržováno plazma o teplotě 5000 až 10000 K, ve kterém je s efektivitou blížící se 100 % atomizován a ionizován (vznikají jednou nabitě kladné ionty). Další možnou ionizační technikou pro analýzu kovů je termální ionizace. Pokud je přistoupeno k termální ionizaci, je vzorek umístěn do elektricky zahřívané kyvety, kde dojde k odpaření a ionizaci. Ionty jsou následně transportovány do evakuované části MS a separovány podle hmotnosti vzniklých iontů v hmotnostním analyzátoru. Separované ionty jsou detekovány ve vícekanálovém elektronásobiči (nejčastěji používaný detektor). Při spojení s nedestruktivními metodami, jako je energiově disperzní rentgenová fluorescenční analýza (EDRFA) a skenovací elektronová mikroskopie, je hmotnostní spektrometrie vhodná pro studium povrchových vrstev kovových artefaktů (např. oxidovaných vrstev mincí), jak popisuje například Torrisi a kol., 2016; Cutroneo a kol., 2013; de Hoffman a Stroobant, 2007. ICP-MS nalézá využití při fingerprintingu předmětů s obsahem olova, mezi které patří i antické mince. Podle olova, které je v mincích často přítomno jako příměs a jehož izotopické složení se liší podle místa, kde bylo vytěženo, lze zjistit původ kovu, ze kterého byla mince ražena. Klasická metoda určení poměrů izotopů olova ve vzorku využívá termální ionizaci s magnetickým sektorovým analyzátozem. Její přesnost je přibližně $\pm 1\%$ a vyžaduje pouze mikrogramová množství vzorku. Pro přesnější analýzu je možné využít tzv. multikolektorovou metodu s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s magnetickým sektorovým analyzátozem (LA-MC-ICP-MS), u které přesnost činí řádově $\pm 0,01\%$ a vyžaduje nanogramová množství vzorku. **Metodou LA-MC-ICP-MS bylo podle zastoupení izotopů olova u 12 ze 14 zkoumaných římských**

denárů možné jednoznačně určit, zdali pocházely z mincovny v Římě nebo z Laodiceje. Zbylé dvě mince z Laodiceje byly chemicky odlišné od zmiňovaných dvou skupin mincí a z pohledu zastoupení izotopů olova tvořily další kategorii. Studie, které se zaměřují na určení původu mincovní slitiny na základě složení, poměrného zastoupení minoritních prvků nebo podle izotopického složení, je třeba vnímat s dostatečnou mírou kritiky. Aby byl výše uvedený předpoklad splněn, musí být v daném místě a době technologie využívané při těžbě a rafinaci kovů dobře zavedené a neměnné. Dále musí být jistota, že daná mincovna nezpracovává, byť jen dílem, drahý kov nebo importovaný mincovní kov, např. z válečné kořisti. Jakékoliv jiné neuvažované zdroje kovu, byť jen ve formě příměsí, mají logicky za následek výsledky nekonzistentní s teorií a mohou vést ke zcela zcestným závěrům. Metoda využití laserové ablace ve spojení s kvadrupólovým analyzátozem poskytuje při použití levnějšího kvadrupólového analyzátoru přesnost blízká se hodnotě $\pm 0,1\%$. I pomocí této instrumentace, která je levnější než magnetický sektorový analyzátor, bylo možné u římských bronzových mincí zjistit možný původ kovu. U mincí ražených v Římě bylo podle analyzovaných poměrů izotopů $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ a $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ v příměsi olova zjištěno, že minerály pro získání mědi jako chalkopyrit mohly pocházet z Toskánska. Minerály, ze kterých byl získán kov pro mince z Laodiceje, mohly pocházet z dolů z oblasti dnešní severozápadní Sýrie. Využití laserové ablace je oproti termální ionizaci rychlejší a méně náročné na úpravu mince obsahující olovo. Značnou výhodou je menší poškození vzorku, v porovnání s použitím termální ionizace (Torrissi a kol., 2016; Ponting a kol., 2003). Pomocí poměrů izotopů olova zjištěných metodou LA-ICP-MS byla u skupiny bronzových egyptských mincí pocházejících z Alexandrie a Antinopolis posílena teorie o existenci mincovny v Antinopolis. Poměr izotopů $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ činil u mincí v Alexandrii 2,05–2,15, zatímco u mincí z Antinopolis 1,95–2,00. Tyto hodnoty jsou v dobrém souladu s hodnotami zjištěnými u nálezů z dolů poblíž Alexandrie, kde tento poměr činí 2,11, a z dolů poblíž Antinopolis s poměrem izotopů 1,97. Při analýze patiny pomocí LA-ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem zkresluje výsledky kromě nízkého rozlišení kvadrupólového analyzátoru i velké množství interferujících iontů tvořených ze složek patiny. To je dáno faktem, že při izotopické analýze olova se vyskytují hydridy se vzorcem PbH_x , kde $x=1$ až 4, a ve velkých koncentracích se mohou vyskytovat také sloučeniny mědi se vzorci Cu_3NH_x , Cu_3SH_x a Cu_3ClH_x , které mohou s izotopickými ionty olova interferovat (Torrissi a kol., 2010). ICP-MS umožňuje vertikální profilování vzorku a poskytuje pohled do vnitřních vrstev materiálu. Zajímavou aplikací tohoto profilování je studium tloušťky vrstvy kovu nasycené kyslíkem. Tato cesta může poskytnout cenné informace při rozlišování falz od originálních mincí starých stovky a tisíce let. Hloubka saturace kyslíkem změřená pomocí LA-ICP-MS se u moderních stří-

brných mincí ražených před přibližně 50 lety pohybuje v řádu desítek mikrometrů. V případě velmi starých mincí ze stříbra má tato vrstva tloušťku 100 a více mikrometrů. Například u starověkých mincí ze 4. století př.n.l. byla naměřena dokonce tloušťka 200–250 mikrometrů (Cutroneo a kol., 2013). Jinou možností vertikálního profilování je laserová ablace s kontinuálním sledováním vybraných prvků. Příkladem tohoto propalování je analýza stříbrného středověkého feniku pomocí LA-ICP-MS (**obrázek 3-5**).

Technika nabízí zajímavé možnosti pro určení původu nálezů archeologických nádob z analýzy keramiky. Je založena na profilování většího množství prvků v těchto materiálech a srovnání jejich zastoupení s vhodnými referenčními materiály (Vannoorenberghe a kol., 2020). Slabým místem širšího využití tohoto postupu je absence dostatečného počtu referenčních materiálů. Pro jeho implementaci je tedy nezbytné budování vhodné sbírky materiálů se spolehlivě známou proveniencí a prvkovým složením (ve vhodné databázi), což je dlouhodobý úkol. Analýzou pigmentů na bázi jílu (red clay) se zabývala i česká výzkumná skupina (Pospíšilová a kol., 2019).

Analogicky byla ICP-MS použita pro porovnání složení skleněných nálezů při archeologickém průzkumu v Africe. Výsledky studie ukázaly, že všechny vzorky studované v rámci tohoto výzkumu byly vyrobeny ze sodno-vápenato-křemičitého skla. Při podrobnějším srovnání obsahů Zr, Ti, Ba, Cr, La, Li, Cs, Na₂O, MgO



Obrázek 3-5 Graf propalování středověkého feniku pomocí LA-ICP-MS se sledováním koncentrace mědi a stříbra v závislosti na času propalování (hloubku je poté možné dopočítat, popřípadě změřit profilometrem či 3D digitálním mikroskopem)

a CaO byly identifikovány (nejméně) čtyři skupiny skla. Chemické podobnosti mezi vzorky z Asie a Afriky naznačují směry obchodních cest a pohybu zboží na africký kontinent (Siu a kol., 2020). Práce Kempa a kolektivu zase ukazuje možnosti ICP-MS pro datování a určení původu skleněných artefaktů v Jordánsku (Kemp a kol., 2020). ICP-MS byla použita pro analýzu složení použitých pigmentů. Výsledky přispěly například k určení složení modrého pigmentu na dekorativních předmětech v muzejním komplexu starověkého města Persepolis. Tento pigment byl identifikován jako egyptská modř, tedy křemičitan se složením $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$. V kombinaci s dalšími technikami, jako je Ramanova spektrometrie, rentgenová difrakce a elektronová mikroskopie byla rovněž blíže specifikována technologie přípravy pigmentů na studovaných vzorcích (Oudbashi a Hessari, 2020). Schopnost ICP-MS analyzovat stopová množství řady prvků předurčuje tuto techniku i ke studiu prvkového složení organických materiálů. Zajímavá je práce Peacocka a kol., která se zabývá složením otolitů⁷ v archeologických nálezech ryb. Poměr izotopů kyslíku v otolitech umožňuje určit místo, kde byly ryby uloveny, což přispívá k pochopení sociálních a ekonomických poměrů ve studovaných osídleních (Peacock a kol., 2016).

Kromě běžnějších prvků se ukazuje jako zajímavé sledovat kovy vzácných zemin. Gallelo a kol. (2019) studuje kromě rozdílů v obsazích běžných prvků i rozdíly mezi prvky La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Sc a Y. Rozdíly pozorované při profilaci prvků vzácných zemin umožnily detekovat antropogenicky indukované modifikace sedimentů při archeologické stratigrafii (vertikálním studiu půdních vrstev a podloží). Významný se ukázal způsob zpracování dat. Jednak bylo vedle sledování obsahů jednotlivých prvků zajímavé porovnávat i jejich poměry (například tzv. anomálie Eu a Ce) a jednak bylo užitečné použít vícerozměrnou statistiku.

ICP-MS v kombinaci s laserovou ablací umožňuje studovat distribuci prvků na povrchu nebo v řezu vzorku (elemental mapping). Toto měření – zjednodušeně nazývané imaging – je realizováno postupným proměřováním obsahů prvků v jednotlivých bodech na studovaném vzorku (definovaných s vhodným krokem). Provedená měření se následně složí a vytvoří obraz, který vhodně definovanou škálou a intenzitou barev popisuje obsahy jednotlivých prvků. Tento postup umožňuje studovat materiálovou homogenitu povrchu, případně naopak anomálie v obsazích některých prvků. Mapovací postup byl použit například při prvkovém mapování v řezech femorálních kortikálních kostí, což umožňuje detailně studovat jejich diagenезi, tedy změny, které se dějí na kostech po úmrtí jedince (Rasmussen a kol., 2019). Podobně je ICP-MS zajímavým nástrojem pro analýzu zubů recentních a nalezených v rámci archeologických výzkumů. Na-

⁷ Tělíška tvořená uhličitanem vápenatým, která se nacházejí ve vnitřním uchu.

příklad poměry obsahů prvků Sr/Ca, Zn/Ca, Ba/Ca a Pb/Ca v zubech poskytují užitečné informace pro zkoumání (paleo)diety, mineralizace a znečištění okolního prostředí (Muller a kol., 2019).

Při analýze organických látek lze použít hmotnostní spektrometrii s ionizací elektrosprejem (ESI), s desorpční-ionizací laserem (LDI), desorpčním elektrosprejem (DESI) a přímou sondou (ASAP). Při ESI je roztok vzorku (nejčastěji extrakt) zaváděn do kapiláry procházející dutou kovovou jehlou, na kterou je vloženo vysoké napětí (obvykle v řádu jednotek kilovoltů). Okolo kovové jehly proudí zmlžovací plyn. Toto uspořádání tvoří vlastní iontový zdroj, který je obvykle vyhříván. Roztok vzorku je v iontovém zdroji zmlžován a mikrokapičky tvořící tuto mlhu jsou nabíjeny vloženým napětím. Z nabitých mikrokapiček je ve vyhříváném prostoru odpařováno rozpouštědlo, mikrokapičky se dále zmenšují, ale jejich náboj zůstává stejný. Zmenšováním velikostí mikrokapiček se k sobě postupně přibližují přítomné nabité částice (ionty) se stejnou polaritou náboje a při určitém přiblížení převládnu odpuzivé síly nábojů nad soudržnými silami v mikrokapičce, která se rozpadne v řadu mikrokapiček s menší velikostí. Tento proces nazývaný coulombická exploze se mnohokrát opakuje, až takto dojde ke vzniku jednotlivých iontů, které postupují dále do evakuované části hmotnostního spektrometru. Tato ionizační technika je „měkká“, což umožňuje zachovat s vysokým výtěžkem tzv. (pseudo)molekulární ionty, které se příliš dále nerozpadají (nefragmentují). Podrobněji jsou proces elektrospreje a základy jeho používání popsány například v knize Coleho a kol. (1997). Přímá ESI analýza je nejčastěji prováděna s využitím toku vhodného eluentu (nosné kapaliny), do které se, s využitím dvoupozicového šesticestného dávkovacího ventilu (používaného v kapalinové chromatografii) nadávkuje určitý objem roztoku vzorku (flow injection analysis, FIA). Nosná kapalina transportuje vzorek do iontového zdroje. Postup je tedy podobný analýze spojením kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS), ovšem bez použití separace na chromatografické koloně. Vzhledem ke své nižší selektivitě je přímá technika méně běžná než LC/MS. Zajímavým příkladem přímého použití FIA-ESI-MS v archeologii je analýza vysokomolekulárních esterů v extraktech z archeologických lepidel z nálezů v KwaZulu-Natal v Africe. Pro přípravu vzorku byla použita mikrovlnná extrakce. Jako recentní referenční materiály byly použity včelí vosk, borovicová a prýšcová pryskyřice. Metoda umožňuje analýzu vyšších mastných kyselin (např. kyselina oktakosanová, m/z 447.417), jejich vyšemolekulárních esterů a série diterpenů odvozených od kyseliny abietové (zejm. hydroxylované deriváty, které zřejmě vznikají vlivem oxidace). Metoda poskytuje nový pohled na voskové a pryskyřičné materiály, který není, jak autoři uvádějí, dosažitelný technikou GC/MS. V případě použití LC/MS je určité riziko, že některé látky budou zadrženy na chromatografické koloně a nebudou identifikovány,

což by analýzu významně zkreslilo. Nespornou výhodou tohoto postupu je i jeho rychlost (La Nasa a kol., 2020).

LDI-MS je metoda založená na působení laseru na vzorek. Použitý laser je obvykle UV dusíkový nebo Nd:YAG pro UV-MALDI a Er:YAG a CO₂ pro použití v IR-MALDI. Působením laseru probíhá desorpce molekul z povrchu vzorku a ionizace. Tam, kde nestačí k ionizaci jen laser, se používá matrice. Matrice je nízkomolekulární organická látka, která pomáhá ionizaci analytu a ochraňuje ho před destrukcí. Dochází tedy k ionizaci molekuly matrice, která poté předá náboj molekule analytu. Při použití matrice se používá zkratka metody MALDI-MS (Peter-Katalinic a Hillenkamp, 2013). Samotné **LDI-MS bez matrice je velmi užitečné pro analýzu barviv.** Van Elslandová a kol. použili techniku LDI-MS pro zjištění složení tří růžových pigmentů, které pocházely z antického Řecka a Říma. Výsledky LDI-MS byly porovnány s LC-ESI-HRMS (kapalinová chromatografie s ionizací elektrosprejem a hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením). Velký problém při interpretaci hmotnostních spekter získaných pomocí LDI-MS představoval „fenomén spektrálního potlačení“. Protože v antickém Římě a Řecku byl jako pigment používán uhličitán olovnatý, byla ve hmotnostním spektru přítomna série píků, která odpovídala iontům klastrů olova. Tyto píky významně maskovaly píky náležící alizarinu. Přesto se ve dvou archeologických vzorcích podařilo identifikovat v pozitivním ionizačním módu sodné a draselné adukty purpurinu a pseudopurpurinu. Tyto látky byly také identifikovány jako deprotonované molekuly v negativním ionizačním módu. Výhodou LDI-MS oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii byla nízká spotřeba vzorku a malé nároky na úpravu vzorku před měřením. Nevýhodou se staly problémy s výše zmíněnými adukty olova (Van Elslande a kol., 2008). LDI-MS byla použita také pro analýzu indigoidního barviva – antického purpuru z částí keramiky. Výsledky byly porovnány s HPLC-DAD. Ve spektru z měření v pozitivním ionizačním módu byly identifikovány píky protonovaných barviv a iontů aduktů těchto barviv s alkalickými kovy. V negativním módu byly identifikovány píky deprotonovaných iontů těchto barviv. Mezi barvivy je i řada bromovaných a dibromovaných derivátů, u nichž je díky jejich vyšší elektronegativitě dosahováno lepší citlivosti měření a díky charakteristickému izotopickému profilu i lepší identifikace. Díky charakteru těchto barviv se LDI-MS osvědčila jako velmi výhodná technika pro studium purpuru (Ribechini a kol., 2013).

Technika MALDI získala velký význam pro peptidové mapování (peptide mass fingerprint, PMF). Tato metoda spočívá v enzymatickém rozkladu bílkoviny a následné analýze peptidových řetězců pomocí MALDI-MS. Výsledky jsou srovnány s databázemi proteinů, které umožní neznámou bílkovinu identifikovat (Nevin a kol., 2012).

Porézní keramika může organické látky z potravin uchovat a chránit před rozkladem (Craig a Collins, 2000; Eerkens, 2005). Přímá MS umožňuje při analýze zbytků potravin v keramických materiálech získat řadu zajímavých a reprodukovatelných výsledků v širokém spektru zkoumaných látek. Analýza degradovaných proteinů může být v určitých případech problematická pro jednoznačné určení konkrétního druhu organismu, ze kterých zbytky pocházejí, a někdy je možné zařadit zbytky pouze do širších kategorií. Poznamenejme však, že další rozvoj na poli hmotnostní spektrometrie přinese širší možnosti i do této problematiky (silnou roli zde sehrávají techniky on-line spojení MS s chromatografií, kde se řada aplikací s druhovým rozlišením objevuje, a o těchto technikách bude pojednáno v kapitolách 3.2.2.1 a 3.2.2.2). Zajímavým, i když technicky obtížnějším řešením, které je vhodné připomenout, je kombinace kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Ta ukazuje možnosti rozlišení mléka dle živočišného zdroje v recentních vzorcích (potravinářsky orientovaná aplikace z dílny Mullera a kol., 2008). Pomocí metody LC-MALDI-TOF/TOF-MS (netypické kombinace chromatografie s depozicí eluátu na povrch a následné MALDI analýze z tohoto povrchu) byla umožněna analýza reziduí jídla z keramické misky. Tato miska pocházela z čínské hrobky a byla datována do doby 500–300 př.n.l. Pomocí databází byly nalezeny čtyři peptidové řetězce, které odpovídaly kravskému, bůvolímu, ovčímu a kozímu kaseinu. Koncentrace kravského kaseinu ve vzorku byla zjištěna pomocí referenční metody ELISA (imunologická technika, která bude popsána dále). Výsledkem práce bylo zjištění, že v dané oblasti v Číně probíhalo zpracování kozího, ovčího a kravského mléka již nejméně před 2300 lety (Hong a kol., 2012). Kombinací MALDI-MS a ELISA analýzy vzorků hlíny z archeologických nádob z hrobu náležejícího ke kultuře se šňůrovou keramikou, který byl radiokarbonově datován do období 2707–2571 př.n.l. (střední Morava), bylo možno prokázat použití kravského mléka nebo mléčných produktů a pomoci tak pochopit stravovací zvyky eneolitických populací. MALDI-MS umožnila detekci triacylglycerolů a ELISA technika průkaz proteinu β -laktoglobulinu (Kučera a kol., 2018).

Pomocí techniky MALDI-MS bylo také možné přiřadit kosti nalezené na archeologických nalezištích jednotlivým živočišným druhům. Toto bylo provedeno pomocí extrakce a následné analýzy peptidových markerů z kostního kolagenu (Buckley a kol., 2011). Metoda umožnila i rozřazení eneolitické kozí kosti od ovčích, které se někdy pro velkou morfologickou podobnost řadily do jediné skupiny (Buckley a kol., 2010). Další studie sledovala biomarkery nádorů v 2 000 let starých kostech. Pomocí MALDI-TOF/TOF-MS se podařilo identifikovat některé proteiny spojené s nádorovými mutacemi (Bona a kol., 2014). Zajímavé bylo použití MALDI-TOF-MS pro peptidové mapování (PMF) reziduí pokrmů z rakve Gristhorpského muže (Gristhorpe Man). Dříve bylo zjištěno, že tento muž byl

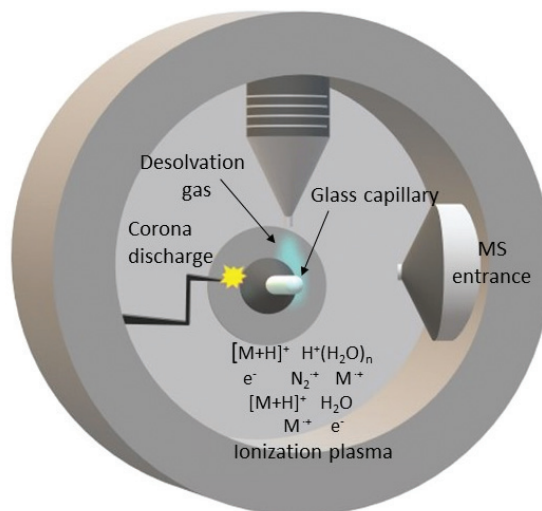
náčelník z doby bronzové. Datace se udává 2200 až 2020 let př.n.l. V jeho rakvi byly nalezeny dvě nádoby obsahující zbytky potravin. Z reziduí byly extrahovány rozpustné peptidy, které byly dále přečištěny, zakonzentrovány a podrobeny analýze. Po analýze pomocí MALDI-TOF-MS, LC-ESI-LTQ-MS/MS (kapalinová chromatografie s ionizací ESI a analyzátozem na principu lineární kvadrupólové pasti umožňující tandemovou hmotnostní spektrometrii) a srovnání s databází byla zjištěna přítomnost lidského keratinu, hovězího (*Bos taurus*) keratinu, hovězího kolagenu a hovězího α -S1-kaseinu. Lidský keratin byl nejspíše zanesen po manipulaci s předměty po objevu a odběru vzorku, neboť Gristhorpský muž byl objeven již v roce 1843 (Buckley a kol., 2013).

Mezi nejzajímavější příklady použití metody založené na MALDI-TOF-MS je možno zařadit analýzu vlasů a oblečení z mumie ledového muže, Ötziho, objeveného v roce 1991. Tato 5 300 let stará mumie byla objevena v tyrolském ledovci ve velmi dobrém stavu. Vlasy a odebrané vzorky kožešin byly zpracovány, extrahovány a byla provedena měření pomocí metody MALDI-TOF-MS a MALDI-TOF/TOF-MS/MS. Bylo zjištěno, že Ötzi měl velmi vysoký stupeň poškození vlasových peptidů oproti jiným mumiím. Tento jev byl nejspíše způsoben dlouhým vystavením těla slunci. Dalším výsledkem bylo zjištění, že horní kožená část jeho mokasín byla vyrobena ze skotu a jeho kabát a kalhoty byly vyrobeny s největší pravděpodobností z ovčí kůže (Hollemeyer a kol., 2008). Novější výzkum uvádí, že jeho kalhoty byly vyrobeny z jeleních a kozích kůží sešitých dohromady. Také byly nalezeny stopy po využití kůže zvířete z čeledi psovitých. Mohlo se jednat o lišku obecnou, vlka obecného nebo psa domácího. Horní část bot byla vyrobena z kůže jelena, jazyk boty ze skotu a podrážka pravděpodobně z kůže medvěda hnědého. Jeho čepice byla nejspíš také vyrobena z medvědí kůže (Hollemeyer a kol., 2012). Tyto a další informace významně pomohly dotvořit obraz života tohoto eneolitického člověka.

Technika MALDI-FT-ICR-MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí/ionizací za účasti matrice a analyzátozem na principu iontové cyklotronové rezonance) byla použita pro analýzu zbytků triacylglycerolů v estonské keramice z 12. až 13. století nalezené na pohřebišti (Oras a kol., 2017). **MALDI-MS je možno použít i pro studium uměleckých děl.** Umožňuje analýzy barviv (Maier a kol., 2004), olejů (van den Berg a kol., 2004), bílkovinných poživ (Kucková a kol., 2009) či laků (Spoto a kol., 2011). Dalším typem vzorků, se kterými se archeologové setkávají, jsou fosilní vzorky. Dlouhou dobu se předpokládalo, že proces fosilizace má za následek destrukci prakticky všech původních organických složek v organismu. Dalším předpokladem bylo, že původní molekuly budou ztraceny nebo degradovány v relativně krátkém časovém rozpětí (vzorky mladší než milion let). Dnes je ale známo, že za určitých podmínek mohou zbytky organických složek

v geologickém čase přetrvat. Schweitzer a kol. (2005; 2007) publikovali práce o zachovaných kostech *Tyrannosaura Rexe* pohřbeného ve středně zrnitém pískovci. Demineralizace fragmentů stehenní a holenní kosti odhalila uchování vláknitých, pružných a zjevně původních tkání. K analýze takového vzorku byly využity zobrazovací techniky jako AFM, transmisní elektronová mikroskopie a analytická technika **hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s analyzátozem doby letu (SIMS-TOF)**. Přítomnost 4-hydroxyprolinu a 5-hydroxylysinu v extraktech organického materiálu je považována za přímý důkaz přítomnosti kolagenu. Při SIMS-TOF analýze kolagenu bylo zjištěno, že nejhojněji zastoupenou aminokyselinou je glycin, druhou detekovanou aminokyselinou je alanin a tyto dvě aminokyseliny vystupují v poměru 2,6:1. Při porovnání s pštrosí kostí vykazuje kost *Tyrannosaura* stejný proces demineralizace v kosti a vedoucí k podobné deformaci cév. Vedle toho byl sledován poměr Gly:Ala kuřecího kolagenu. V tomto vzorku byl určen poměr 2,5:1, který je téměř totožný s poměrem aminokyselin v kolagenu *Tyrannosaura* (Schweitzer, 2005; 2007). U vzorků fosilií starších než jeden milion let je již velmi obtížné detekovat původní organické látky z důvodu jejich celkového rozkladu. Nicméně, pokud je okolní sediment bohatý na sloučeniny železa, může dojít ke „konzervaci“ sledovaných organických látek. Kovové ionty se podílejí na vzniku volných radikálů reagujících s organickými molekulami za vzniku stabilních polymerů. Předpokládá se, že nestabilní a v tomto smyslu reaktivní kovové ionty pocházejí z postmortální degradace biomolekul dinosaurů obsahujících železo, jako je např. hemoglobin, myoglobin a případně cytochrom. Takto došlo v určitých kostních částech zřejmě k nenávratnému zesílení původních proteinových molekul, které se propojily s podobnými molekulami, minerálními nebo exogenními organickými složkami, a v těchto vázaných a denaturovaných formách přežily proteiny do současnosti (Schweitzer, 2007). Technika SIMS-TOF byla využita také při analýze bílého pigmentu na dřevěné sošce a kameni pocházejících z rituálního místa (Songo, Mali) afrického kmene Dogonů. V obou případech byl bílý pigment identifikován jako sodné a draselné soli kyseliny močové. Tato látka se ve vysokých koncentracích vyskytuje v exkrementech ptáků a plazů. Existuje zde tedy teorie, že tyto výměšky byly cíleně sbírány pro přípravu tohoto pigmentu (Mazel a Richardin, 2009; Mazel a kol., 2010).

Méně běžnou, ale experimentálně poměrně jednoduchou technikou je **analýza přímou sondou (ASAP-MS)**. Ta je založena na odpaření těkavých a polotěkavých složek vzorku deponovaného na povrchu skleněné kapiláry proudem horkého plynu (obvykle v upraveném ESI zdroji s využitím vstupu pro desolvatační plyn) a jejich následné ionizaci v elektrickém výboji. Schéma přístroje je uvedeno na **obrázku 3-6**.

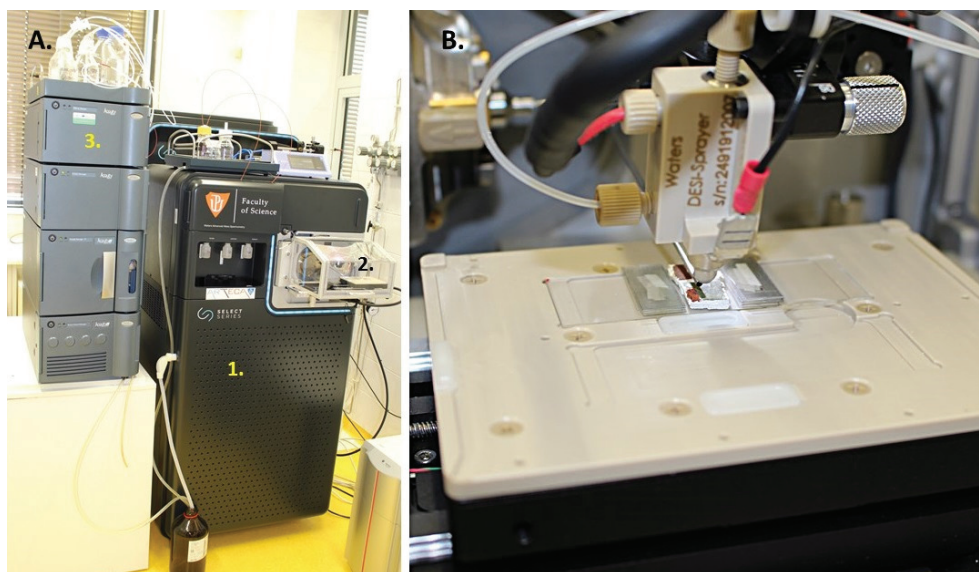


Obrázek 3-6 Schéma přímé sondy (ASAP)

Metoda se osvědčila zejména při analýze petrochemických produktů, polymerů a složek rostlinných extraktů (podrobněji k principu i aplikacím viz např. Jagošová a kol., 2021). **Poprvé byla použita v archeologii naším týmem při důkazu miliacinu** (*Panicum miliaceum*) v extraktech hlíny odebrané z nálezů keramických nádob ze staršího období lokálního vývoje moravské šňůrové keramiky. Miliacin je marker indikující přítomnost prosa ve vzorku. Tato aplikace byla nedávno publikována naším týmem (Kučera a kol., 2019) a je předmětem samostatné aplikační kapitoly (kap. 6.5).

DESI je technika umožňující analýzu povrchů. Na studovaný materiál se nasměruje proud zmlžených a nabitých kapiček vhodného rozpouštědla (resp. směsi) vyrobený v elektrospreji. Tento proud desorbuje a ionizuje složky vzorku přítomné na jeho povrchu. **Obrázek 3-7** ukazuje hmotnostní spektrometr osazený DESI zdrojem. Přístroj umožňuje rychlou výměnu DESI zdroje za ESI a následně i spojení s kapalinovým chromatografem, který je umístěn nalevo. Jak bylo zmíněno výše, lze významně zvýšit selektivitu měření také použitím separace iontů podle jejich tvaru a velikosti v mobiltní cele umístěné v analyzátoru přístroje. Uvedený přístroj má v analyzátoru integrovanou cyklickou mobiltní celu (odtud název přístroje – Cyclic IMS). Další detaily o této technologii (pro archeologii do budoucna velmi slibné) lze nalézt např. v práci Gilese a kol. (2019).

DESI má velký potenciál pro archeologii. Práce Heaton a kol. ukazuje, že tato technika umožňuje přímou analýzu peptidů, enzymaticky štěpených proteinů i intaktních proteinů v archeologicky relevantních modelových vzorcích. Výzvou však zůstává analýza porézních materiálů, jako je například neglazovaná keramika (Heaton a kol., 2009).



Obrázek 3-7 Vysokorozlišující hmotnostní spektrometr Cyclic IMS vybavený DESI iontovým zdrojem (A. celkový pohled na přístroj: 1. hmotnostní spektrometr, 2. iontový zdroj DESI, 3. kapalinový chromatograf, který lze připojit pro LC/MS měření; B. detail na DESI sprayer při měření modelových vzorků omítek při optimalizaci metody pro měření vzorků kulturního dědictví; laboratoř KACH)

Literatura

- Bona A., Papai Z., Maasz G., Toth G. A., Jambor E., Schmidt J., Toth C., Farkas C., Mark L., Mass Spectrometric Identification of Ancient Proteins as Potential Molecular Biomarkers for a 2000-Year-Old Osteogenic Sarcoma, *PLoS One* 2014, 9, e87215.
- Buckley M., Melton N. D., Montgomery J., Proteomics analysis of ancient food vessel stitching reveals >4000-year-old milk protein. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2013, 27, 531–8.
- Buckley M., Whitcher Kansa S., Collagen fingerprinting of archaeological bone and teeth remains from Domuztepe, South Eastern Turkey, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2011, 3, 271–280.
- Buckley M., Whitcher Kansa S., Howard S., Campbell S., Thomas-Oates J., Collins M., Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide, *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 13–20.
- Cole R. B. (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry, Fundamentals, Instrumentation & Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1997.
- Craig O. E., Collins M. J., An improved method for the immunological detection of mineral bound protein using hydrofluoric acid and direct capture, *J. Immunol. Meth.* 2000, 236, 89–97.
- Cutroneo M., Torrisi L., Caridi F., Sayed R., Gentile C., Mondio G., Serafino T., Castrizio E. D., Silver/oxygen depth profile in coins by using laser ablation, mass

- quadrupole spectrometer and X-ray fluorescence, *Appl. Surf. Sci.* 2013, 272, 25–29.
- De Hoffmann E., Stroobant V., *Mass Spectrometry – Principles and Applications*, 3. ed., John Wiley & Sons, Chichester 2007.
- Eerkens J. W., GC-MS analysis and fatty acid ratios of archaeological potsherds from the western Great Basin of North America, *Archaeometry* 2005, 47, 83–102.
- Gallelo G., Ferro-Vazquez C., Chenery S., Lang C., Thornton-Barnett S., Kabora T., Hodson M. E., Stump D., The capability of rare earth elements geochemistry to interpret complex archaeological stratigraphy, *Microchem. J.* 2019, 148, 691–701.
- Giles K., Ujma J., Wildgoose J., Pringle S., Richardson K., Langridge D., Green M., A Cyclic Ion Mobility-Mass Spectrometry System, *Anal. Chem.* 2019, 91, 8564–8573.
- Gross J. H., *Mass Spectrometry, A Textbook*, 3. ed., Springer International Publishing AG, Cham 2017 (ISBN: 978-3-319-54397-0).
- Heaton K., Solazzo C., Collins M. J., Thomas-Oates J., Bergstrom E. T., Towards the application of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS) to the analysis of ancient proteins from artefacts, *J. Archaeol. Sci.* 2009, 36, 2145–2154.
- Hollemeyer K., Altmeyer W., Heinzle E., Pitra C., Species identification of Oetzi's clothing with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based on peptide pattern similarities of hair digests, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, 2751–2767.
- Hollemeyer K., Altmeyer W., Heinzle E., Pitra C., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry combined with multidimensional scaling, binary hierarchical cluster tree and selected diagnostic masses improves species identification of Neolithic keratin sequences from furs of the Tyrolean Iceman Oetzi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, 1735–1745.
- Hong C., Jiang H., Lü E., Wu Y., Guo L., Xie Y., Wang C., Yang Y., Identification of Milk Component in Ancient Food Residue by Proteomics, *PloS One* 2012, 7, e37053.
- Jagošová K., Bednář P., Barták P., Atmospheric Solids Analysis Probe – The technique for rapid and reliable analysis: An overview of theory and applications, v přípravě.
- Kemp V., Schmidt K., Brownscombe W., Soennecken K., Vieweger D., Haser J., Shortland A., Dating and Provenance of Glass Artefacts Excavated from the Ancient City of Tall Zira A, Jordan, *Archaeometry* 2020, 62, 1164–1181.
- Kuckova S., Chrova M., Vankova L., Hnizda A., Hynek R., Kodicek M., Towards proteomic analysis of milk proteins in historical building materials, *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 284, 42–46.
- Kučera L., Peška J., Fojtík P., Barták P., Kučerová P., Pavelka J., Komárková V., Beneš J., Polcerová L., Králík M., Bednář P., First direct evidence of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) in Central Europe, *Archeol. Anthropol. Sci.* 2019, 11, 4221–4227.
- Kučera L., Peška J., Fojtík P., Barták P., Sokolovská D., Pavelka J., Komárková V., Beneš J., Polcerová L., Králík M., Bednář P., Determination of Milk Products in Ceramic Vessels of Corded Ware Culture from a Late Eneolithic Burial, *Molecules* 2018, 23, 3247.
- La Nasa J., Nardella F., Andrei L., Giani M., Degano I., Colombini M.P., Ribechini E., Profiling of high molecular weight esters by flow injection analysis-high resolution mass spectrometry for the characterization of raw and archaeological beeswax and resinous substances, *Talanta* 2020, 212, 120800.
- Maier M. S., Parera M. S., Seldes A. M., Matrix-assisted laser desorption and electrospray ionization mass

- spectrometry of carminic acid isolated from cochineal, *Int. J. Mass Spectrom.* 2004, 232, 225–229.
- Mazel V., Richardin P., ToF-SIMS Study of Organic Materials in Cultural Heritage: Identification and Chemical Imaging. In: *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology* (eds. M. P. Colombini and F. Modugno), John Wiley & Sons, Chichester 2009.
- Mazel V., Richardin P., Touboul D., Brunelle A., Richard C., Laval E., Walter P., Laprévotte O., Animal urine as painting materials in African rock art revealed by cluster ToF-SIMS mass spectrometry imaging, *J. Mass Spectrom.* 2010, 45, 944–950.
- Muller L., Bartak P., Bednar P., Frysova I., Sevcik J., Lemr K., Capillary electrophoresis-mass spectrometry – a fast and reliable tool for the monitoring of milk adulteration, *Electrophoresis* 2008, 29, 2088–2093.
- Muller W., Nava A., Evans D., Rossi P. F., Alt K. W., Bondioli L., Enamel mineralization and compositional time-resolution in human teeth evaluated via histologically-defined LA-ICPMS profiles, *Geochim. Cosmochim. Acta* 2019, 255, 105–126.
- Nevin A., Spoto G., Anglos D., Laser spectroscopies for elemental and molecular analysis in art and archaeology, *Applied Physics A*. 2012, 106, 339–361.
- Oras E, Vahu S., Isaksson S., Kaljurand I., Leito I., MALDI-FT-ICR-MS for archaeological lipid residue analysis, *J. Mass Spectrom.* 2017, 52, 689–700.
- Oudbashi O., Hessari M., A „Western“ imported technology: An analytical study of the Achaemenid Egyptian blue objects, *J. Cult. Herit.* 2020, 47, 246–256.
- Paglia G., Smith A. J., Astarita G., Ion mobility mass spectrometry in the omics era: Challenges and opportunities for metabolomics and lipidomics, *Mass Spec. Rev.* 2021, 1–44.
- Peter-Katalinic J., Hillenkamp F., *MALDI MS*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. (ISBN 9783527335961)
- Peacock E., Gabitov R., Frisch J. R., Hadden C. S., Carroll B., Henderson K. L., LA-ICP-MS chemical analysis of archaeological otoliths as a tool for seasonality and site catchment studies, *J. Archaeol. Sci.* 2016, 65, 11–19.
- Ponting M., Evans J.A., Pashley V., Fingerprinting of Roman Mints using Laser Ablation MC-ICP-MS Lead Isotope Analysis, *Archaeometry* 2003, 45, 591–597.
- Pospisilova E., Hradil D., Hola M., Hradilova J., Novotny K., Kanicky V., Differentiation of clay-based pigments in paintings by means of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 2019, 158, 105639.
- Rasmussen K. L., Milner G., Skytte L., Lynnerup N., Thomsen J. L., Boldsen J. L., Mapping diagenesis in archaeological human bones, *Herit. Sci.* 2019, 7, 41.
- Ribechini E., Pérez-Arantegui J., Colombini M. P., Positive and negative-mode laser desorption/ionization-mass spectrometry (LDI-MS) for the detection of indigoids in archaeological purple, *J. Mass Spectrom.* 2013, 48, 384–391.
- Schweitzer M. H., Wittmeyer J. L., Horner J. R., Toporski J. K., Soft-Tissue Vessels and Cellular Preservation in Tyrannosaurus rex, *Science* 2005, 307, 1952–1955.
- Schweitzer M. H., Suo Z., Avci R., Asara J. M., Al-len M. A., Arce F. T., Horner J. R., Analyses of Soft Tissue from Tyrannosaurus rex Suggest the Presence of Protein, *Science* 2007, 316, 277–280.
- Siu I., Henderson J., Qin D. S., Ding Y., Cui J. F., Ma H. J., New light on plant ash glass found in Africa: Evidence for Indian Ocean Silk Road trade using major, minor, trace element and lead isotope analysis of glass from the 15(th)–16(th)century AD from Malindi and Mambui, Kenya, *PLoS One* 2020, 15, e0237612.
- Spoto G., Grasso G., Spatially resolved mass spectrometry in the study of art and archaeological objects, *Trac – Trends Anal. Chem.* 2011, 30, 856–863.

- Torrise L., Caridi F., Giuffrida L., Torrise A., Mondio G., Serafino T., Caltabiano M., Castrizio E. D., Paniz E., Salici A., LAMQS analysis applied to ancient Egyptian bronze coins, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2010, 268, 1657–1664.
- Torrise L., Italiano A., Torrise A., Ancient bronze coins from Mediterranean basin: LAMQS potentiality for lead isotopes comparative analysis with former mineral, *Appl. Surf. Sci.* 2016, 387, 529–538.
- van den Berg J. D. J., Vermist N. D., Carlyle L., Holčápek M., Boon J. J., Effects of traditional processing methods of linseed oil on the composition of its triacylglycerols, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 181–199.
- van Elslande, E., Guérineau, V., Thirioux, V., Ghislaine, R., Richardin, P., Laprévote, O., Hussler, G., Walter, P., Analysis of ancient Greco–Roman cosmetic materials using laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 1873–1879.
- Vannoorenberghe M., Van Acker T., Belza J., Teetaert D., Crombe P., Vanhaecke F., Multi-element LA-ICP-MS analysis of the clay fraction of archaeological pottery in provenance studies: a methodological investigation, *J. Anal. At. Spectrom.* 2020, 35, 2686–2696.

3.2.1.4 Vibrační spektroskopie

Infračervená a Ramanova spektroskopie si našly své pevné místo v analýze archeologických materiálů. Principem infračervené spektroskopie je pohlcení infračerveného záření při průchodu vzorkem, při němž musí dojít ke změně dipólového momentu během vibrace (v případě zeslabené úplné reflektance, ATR, jde o odraz záření od povrchu vzorku). Přístroj pro měření infračervených spekter je uveden na **obrázku 3-8**. Ramanova spektroskopie doplňuje informace, které přináší infračervená spektroskopie. Základem Ramanovy spektroskopie je neelastický optický rozptyl záření, které interaguje s hmotou a s určitou pravděpodobností vzniká foton s větší vlnovou délkou (Stokesovy linie), nebo s nižší vlnovou délkou (anti-Stokesovy linie), než je vlnová délka primárního záření. Podmínkou vzniku Ramanových linií je změna polarizovatelnosti molekuly během vibračního pohybu (Strauch, 1988). Laser, který se používá jako zdroj záření v Ramanově spektroskopii, obvykle emituje záření ve viditelné oblasti (Long, 2004). Použití nižších vlnových délek má výhodu ve zvýšení intenzity Ramanových linií. Na druhé straně ale může dojít k překrytí signálu fluorescenční emisí (Rayleighův rozptyl), které má o několik řádů vyšší intenzitu než odpovídající rozptýlené Ramanovo záření a stejnou vlnovou délku jako primární záření produkované laserem (Edwards a Chalmers, 2005). V běžné praxi nachází infračervená a Ramanova spektroskopie využití při vyvozování (de novo) molekulární struktury a tvaru molekuly, toto použití je však v archeologii méně významné. **Hlavním úkolem infračervené a Ramanovy spektroskopie v archeologickém výzkumu**

je identifikace funkčních skupin přítomných v organických a anorganických materiálech, které poukazují na zastoupení různých typů sloučenin ve vzorku. Ve vibračním spektru se dále sleduje poloha pásů, které jsou charakteristické pro danou molekulu (tzv. oblast otisku prstu) a získané spektrum se porovnává se standardy v databázi.

Použití těchto metod přineslo mnoho nových informací o archeologických artefaktech, které před nástupem vibračních metod nemohly být dobře charakterizovány. **Kombinace vibrační spektroskopie s jinými technikami, jako je rentgenová difrakce, rentgenová fluorescence, SEM, nebo spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), je dnes klíčovým analytickým přístupem,** který obvykle dokáže poskytnout dostatek informací o složení s použitím malého množství vzorku. Vibrační spektrometrie umožňuje nedestruktivní analýzu. Pokud se však použije příliš velká energie laseru, může k poškození vzorku dojít. Použití moderních miniaturizovaných přístrojů povede k rychlému využití těchto technik přímo na místě (bez nutnosti transportu artefaktu/vzorku do analytické laboratoře) a poskytne archeologům informace o možnostech restaurování jen s velmi malým rizikem poškození vzácných předmětů (Edwards a Vandenabeele, 2012). Carterová a kol. studovali pomocí Ramanovy spektrome-



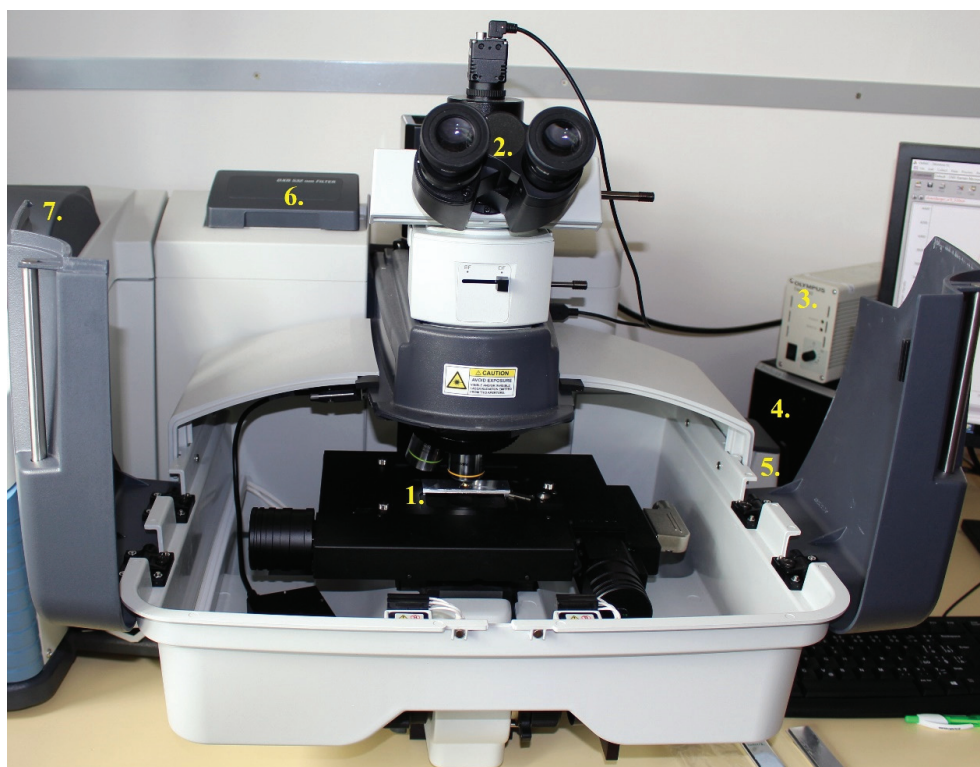
Obrázek 3-8 Infračervený spektrometr (1. ATR modul, 2. prostor pro měření v transmisním módu, 3. počítač; laboratoř KACH)

trie porcelánové střepy, které byly nalezeny ve dvou vracích portugalských lodí datovaných do let 1608 a 1643. Keramika byla identifikována jako čínská z dynastie Ming. Ve vzorku byly nalezeny Ramanovy pásy, které odpovídaly kobaltové modři, živci, modifikacím oxidu titaničitého, křemičitanu vápenatého a dalším. Výskyt β -wollastonitu, který byl poprvé nalezen v porcelánu z dynastie Ming, byl přisouzen nižší teplotě výpalu porcelánu (Carterová a kol., 2017). Autoři Ondrkál a kol. (2021) využili Ramanovu spektrometrii k analýze vzorků odebraných z vnitřní stěny bronzové sošky zobrazující labuť. Ve vzorcích byl nalezen amorfni uhlík (saze), což společně s výsledky z plynové chromatografie poukazuje na využití tohoto předmětu jako lampy (Ondrkál a kol., 2021; a podrobněji v kap. 6.7).

Ramanova spektrometrie má široké uplatnění při identifikaci anorganických pigmentů na nástěnných malbách či uměleckých dílech (Candeias a Madariaga, 2019). Při studii povrchových vrstev několika římských mincí s odhadovaným obsahem stříbra 45 % (císař Gordianus III.), 55–60 % (císař Caracalla), 85 % (císař Traján) a 97–99 % (Jupiter na dvoukolovém voze a Fénická mince) byly pomocí Ramanovy spektrometrie zkoumány vrstvy mince v hloubce 0,3 až 1000 nm pod jejím povrchem. U vzorků mincí s vyšším obsahem stříbra byly nalezeny významné pásy v oblasti 229 cm^{-1} . Tyto pásy odpovídaly chloridu stříbrnému, nicméně ve dvou případech k nim byly přidruženy široké pásy hydratovaného oxidu měďného. Šířka tohoto pásu při 229 cm^{-1} poukazuje na nedokonalou krystalizaci oxidu měďného mající za následek vznik více fází. Po zahřátí mince došlo k rozlišení širokého pásu na tři samostatné pásy při 186, 218, a 283 cm^{-1} s novým pásem při 340 cm^{-1} . Tyto pásy jsou charakteristické pro Cu_2O (186 a 218 cm^{-1}) a CuO (283 a 340 cm^{-1}). Na minci s nejnižším obsahem stříbra byl pozorován pás o vlnočtu okolo 580 cm^{-1} . Podle různých zdrojů mohl být tento pás způsoben buďto hydroxidem měďnatým, anebo oxidem stříbrným. Kromě složek obsahujících kovy byly pozorovány intenzivní pásy s vlnočty 1347, 1447 a 1580 cm^{-1} , které odpovídají jednoduchým a dvojným vazbám u aromatických uhlovodíků naadsorbovaných na povrch mince v důsledku kontaktu s těmito sloučeninami během manipulace (Keturakis a kol., 2016). V oblasti Ramanovy spektroskopie neustále dochází k vylepšování přístrojů či metodiky měření (např. při použití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, SERS). Conti a kol. (2015) využili micro-SORS (Micro-spatially offset Raman spectroscopy) pro analýzu podpovrchových vrstev pigmentů na pěti sochách z 15.–17. století. Principem této metody je definované zaostřování a rozostřování paprsku laseru, čímž dojde k většímu průniku paprsku pod povrch vzorku. Následně je na základě jednotlivých spekter a známého rozostření v mm (hloubka průniku) možno rekonstruovat složení jednotlivých pigmentových vrstev (Conti a kol., 2015).

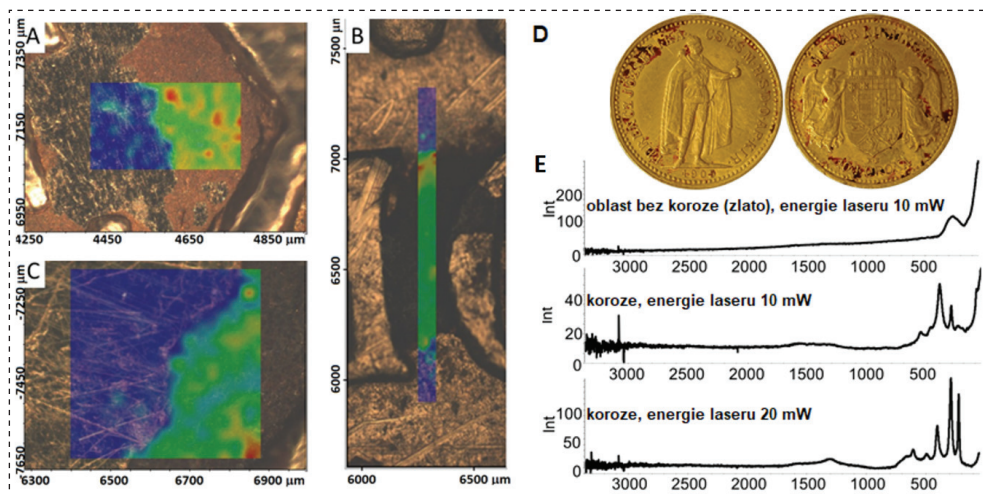
I když je samotná infračervená spektrometrie pro materiálovou analýzu mincovního materiálu nevhodná, tak své uplatnění nachází převážně k identifikaci organických látek nebo látek biologické povahy a (chemicky definovaných) korozních produktů (např. pro identifikaci síranových, uhličitánových a dusičnanových aniontů) či typu rostlinných vláken. Ve studii *Surface characterization of medieval silver coins minted by the early Piasts: FT-IR mapping and SEM/EDX studies* využívají autoři infračervenou spektroskopii k mapování distribuce různých sloučenin na povrchu. Vedle korozních produktů na bázi mědi byla sledována např. distribuce látek organického původu, např. tuků nebo proteinů (Pięta a kol., 2018). Obě zmíněné techniky je možné kombinovat s mikroskopií, což umožní cílené zaměření konkrétní oblasti či provádění zobrazovacích měření (imaging). **Obrázek 3-9** ukazuje Ramanův mikroskop a nabízí pohled do otevřené komory, kam se vkládá měřený objekt (obvykle velikosti podložního sklíčka pro běžnou mikroskopii).

Ramanova mikroskopie byla aplikována na analýzu červených skvrn na povrchu zlatých mincí. Tento jev je označován jako „koroze zlata“. Analýzy prokázaly, že kromě sloučenin stříbra a mědi může být toto poškození cenných mincí způsobeno



Obrázek 3-9 Ramanův mikroskop (1. prostor pro vzorek, 2. optický a digitální mikroskop, 3. osvětlení vzorku, 4. ovládání motorizovaného stolku, 5. laser, 6. filtr, 7. mřížka; laboratoř KACH)

beno také sloučeninami železa (**obrázek 3-10**, Kučera a kol., 2021). Autoři Woess a kol. (2017) zase využili Ramanovu a infračervenou mikroskopii pro analýzu lidských kostí z archeologických nálezů za účelem stanovení doby smrti. Cílem metody bylo sledování distribuce fosfolipidů, nukleových kyselin a komplexních sacharidů (Woess a kol., 2017).



Obrázek 3-10 Imaging oblastí s korozí na povrchu zlatých mincí 10 Korona 1897 (A), 1905 (B) a 1907 © (zobrazeno pro signál 394 cm^{-1} , nejnižší intenzita signálu – modrá barva, nejvyšší intenzita – červená barva), D – zlatá 10 Korona 1905 s oblastmi koroze, a E – Ramanova spektra oblastí na povrchu zlaté 10 Korony 1905 (horní spektrum: oblast čistého zlata; prostřední spektrum: oblast koroze s energií laseru 10 mW – identifikace goethitu a spodní spektrum: oblast koroze s energií laseru 20 mW – identifikace hematitu vzniklého z goethitu)

Literatura

- Candeias A., Madariaga J.M., Applications of Raman spectroscopy in art and archaeology, *J. Raman Spectrosc.* 2019, 50, 137–142.
- Carter E. A., Wood M. L., De Waal D., Edwards H. G. M., Porcelain sherds from Portuguese wrecks: Raman spectroscopic analysis of marine archaeological ceramics, *Herit. Sci.* 2017, 5, 17.
- Conti C., Colombo C., Realini M., Matousek P., Subsurface analysis of painted sculptures and plasters using micrometer-scale spatially offset Raman spectroscopy (micro-SORS), *J. Raman Spectrosc.* 2015, 46, 476–482.
- Edwards H. G. M., Chalmers J. M., *Raman Spectroscopy in Archaeology and Art History*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2005 (ISBN 978-0-85404-522-8).
- Edwards H. G. M., Vandenabeele P., Analytical Archaeometry. In: Edwards Howell a Peter Vandenabeele (eds.). *Analytical Archaeometry: Selected Topics*, The

- Royal Society of Chemistry, Cambridge 2012 (ISBN 978-1-84973-162-1).
- Keturakis C. J., Notis B., Blenheim A., Miller A. C., Pafchek R., Notis M. R., Wachs I. E., Analysis of corrosion layers in ancient Roman silver coins with high resolution surface techniques, *Appl. Surf. Sci.* 2016, 376, 241–251.
- Kučera L., Rozsypal J., Bednář P., Březina M., Kalina L., Bezdička P., Mašláš M., Richtera L., „Gold Corrosion“: An alternative source of red stains on gold coins, *Materialia*, 2021, 101025.
- Long D. A., Handbook of Raman spectroscopy. From the research laboratory to the process line., Editoři: Ian R. Lewis and Howell G. M. Edwards. Marcel Dekker, New York Basel 2001., *J. Raman Spectrosc.* 2004, 35, 91–91 (ISSN 0377-0486).
- Ondrkál F., Peška J., Jagošová K., Sokolovská D., Kučera L., The Cult-Wagon of Liptovský Hrádok: First evidence of using the Urnfield cult-wagons as fat-powered lamps, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2020, 34, 102579.
- Pięta E., Lekki J., del Hoyo-Meléndez J. M., Paluszkiwicz C., Nowakowski M., Matosz M., Kwiatek W. M., Surface characterization of medieval silver coins minted by the early Piasts: FT-IR mapping and SEM/EDX studies, *Surf. Interface Anal.* 2018, 50, 78–86.
- Strauch B. Možnosti laserové Ramanovy spektrometrie. In: J. Zýka (ed.). *Nové směry v analytické chemii*. SNTL, Praha 1988, s. 171–203.
- Woess C., Unterberger S. H., Roider C., Ritsch-Marste M., Pemberger N., Cemper-Kiesslich J., Hatzner-Grubwieser P., Parson W., Pallua J. D., Assessing various Infrared (IR) microscopic imaging techniques for post-mortem interval evaluation of human skeletal remains, *Plos One* 2017, 12, e0174552.

3.2.2 Metody separační a spojené techniky

Petr Bednář, Ondřej Kurka

3.2.2.1 Plynová chromatografie (GC) a její spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)

Plynová chromatografie je metoda umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu složení archeologických vzorků. Umožňuje současnou analýzu mnoha látek přítomných ve vzorku. Metoda je schopna přímé analýzy látek těkavých. V případě látek netěkavých je potřeba je vhodnou reakcí (derivatizací nebo termálním rozkladem) na těkavé látky převést. Nejčastějším detektorem používaným v kombinaci s plynovou chromatografií pro účely analýzy archeologických vzorků je hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací, který má strukturně identifikační potenciál a nabízí dobrou citlivost pro většinu analytů. Jde o metodu destruktivní, avšak vzhledem k tomu, že dosahuje poměrně nízkých detekčních limitů (např. Kandiah a Urban, 2013), stačí k analýze obvykle velmi malé množství materiálu. Proto ji lze řadit mezi metody mikroinvazivní. Používané postupy

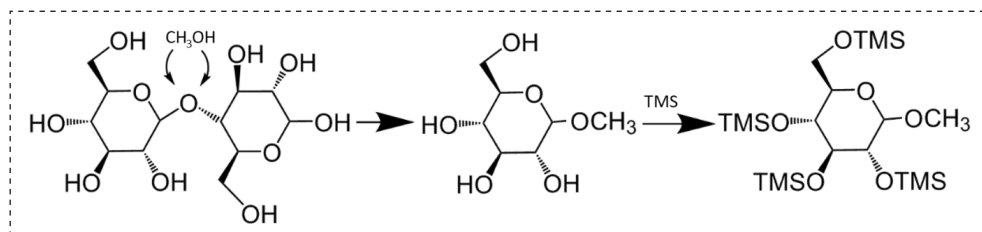
analýzy a zpracování dat obvykle sledují **Koncept archeologických biomarkerů** (Archaeological Biomarker Concept), podrobně představený Evershedem v jeho přehledovém a kriticky hodnotícím článku z roku 2008 (Evershed, 2008). Koncept je však významně rozšiřován moderními necílenými postupy získávání chemických informací, o kterých je detailněji pojednáno na konci této kapitoly (recentní článek Korfa a kol., 2020).

GC a zejména GC/MS v oblasti archeologie již zdomácněly a existuje velké množství prací, které je využívají. Úkolem této kapitoly je podat představu o rozsahu jejich možného použití z pohledu metodického i aplikačního. Analytické postupy nejsou popisovány do detailů. Ty je možné v případě zájmu najít v odkazovaných referencích. Při řazení jednotlivých aplikací byl brán ohled spíše na cílové materiály náležející do oblasti archeologických nálezů a objektů hmotného dědictví a na způsob, jakým lze GC a GC/MS použít, než na striktní sledování rozdílů ve fyzikálně-chemických vlastnostech nebo molekulové hmotnosti analytů – tento „intuitivní“ postup bude snad dobře vyhovovat čtenářům pohybujícím se na rozhraní archeologie, studia hmotného kulturního dědictví a analytické chemie.

GC a GC/MS byla využita pro analýzu vůně a zápachu v archeologických materiálech. Pro tento účel je používáno dávkování z plynného prostoru nad vzorkem (tzv. head space analýza). Významná je analýza těkavých organických látek (VOC, z angl. volatile organic compounds). GC/MS byla použita pro výzkum prehistorických pohřebních obalů už z pátého tisíciletí před naším letopočtem. Byly identifikovány složky borovicové pryskyřice, (přírodních) ropných zbytků a těkavých složek rostlinných olejů a živočišných tuků. Přítomnost borovicové pryskyřice prokazují funkcionalizované a nefunkcionalizované diterpenoidy, mezi nimi pimarová, sandaropimarová, isopimarová a abietová kyselina a řada izomerů dehydro a hydroxydehydro a oxodehydroabietových kyselin. Zejména 7-oxodehydroabietová kyselina je typickou složkou „archeologických“ borovicových pryskyřic. Vedle těchto látek byly ve vzorcích dále identifikovány mastné kyseliny (včetně hydroxylovaných), benzoová kyselina, fenolové kyseliny (4-hydroxybenzoová, vanilová a syringová) a steroidy (cholesterol, beta-sitosterol, stigmasta-3,5,22-trien a cholesta-3,5-dien-7-on). Mezi složkami přírodních ropných zbytků byly nalezeny n-alkany s počtem uhlíků 15 a vyšším. Složení uhlovodíků dovoluje blíže rozlišit jejich zdroj na suchozemský, rašelinový, směsný a mořský (Jones a kol., 2014). Je totiž známo, že složení n-alkanů v mořské biotě se liší od suchozemské. V mořském planktonu převažují n-alkany s lichým počtem uhlíků a kratšími řetězci (C15, C17 a C19), v suchozemských rostlinách n-alkany s lichým počtem uhlíků a dlouhými řetězci (C23, C25, C27, C29, C31 a C33), v mikroorganismech jsou n-alkany se sudým počtem uhlíků a v rozsahu C12–C22 (Punyu a kol., 2013). Význam

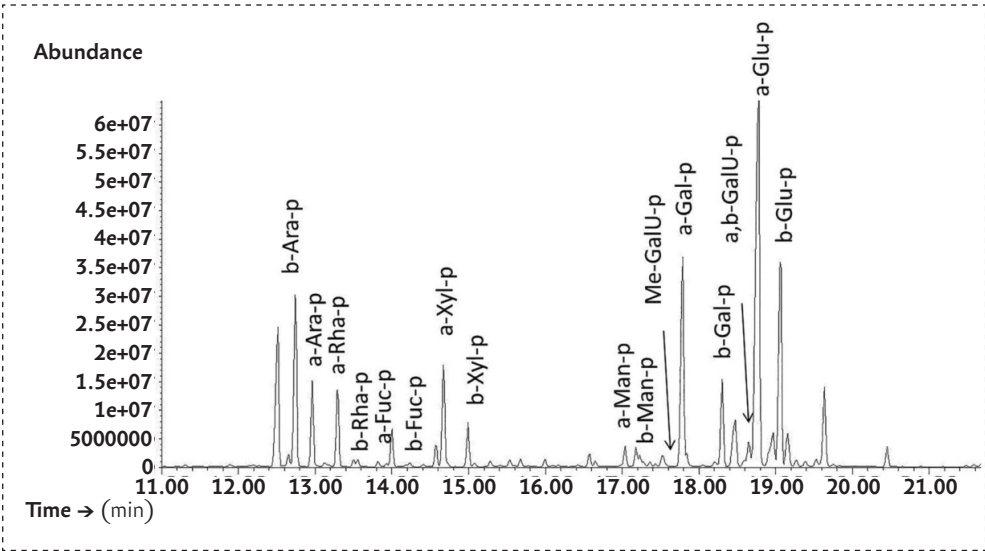
vůní a zápachů v archeologii podrobně diskutuje práce Malika (2020). Populární je při studiu těkavých látek ve vzorcích použití miniaturizované techniky extrakce – **mikroextrakce složek plynné fáze nad vzorkem pomocí vlákna, na kterém je nanesena stacionární fáze** (z angl. headspace solid phase microextraction, HS-SPME). Tato technika byla použita pro zkoumání mumifikačních balzámů (vykopávky v de Morgan, Dachour, Egypt). Jako stacionární fáze deponovaná na vlákne byl použit polydimethylsiloxan (PDMS). Technika HS-SPME je výrazně selektivnější v porovnání s extrakcí vzorku kapalinou (např. methylenchloridem), a přesto bylo v balzamovacích materiálech zachyceno a identifikováno více než 100 terpenických a steroidních látek (Hamm a kol., 2004). V řadě případů je však možno charakterizovat vonné materiály pomocí GC/MS přímo z methanolických extraktů materiálu po trimethylsilylaci, jak ukazuje například studie zaměřená na odlišení kadidlové pryskyřice od jiných materiálů (Mathe a kol., 2004). Kombinace mikroextrakce tuhou fází s GC/MS může být v řadě případů použita pro nedestruktivní analýzu, a proto je oblíbeným pomocníkem při studiu materiálů se vztahem ke hmotnému kulturnímu dědictví. V práci Lattuati-Derieux a kol. byly studovány těkavé organické látky (volatile organic compounds, VOC) přirozeně emitované (off-gassing) ze starých knih, autentických vzorků dehtů z březové kůry (o kterých je pojednáno i dále v této kapitole), ale také z konzervačních boxů (Lattuati-Derieux a kol., 2008a). HS-SPME byla nasazena i přímo v muzeu jako neinvazivní *in situ* vzorkovací technika umožňující například charakterizaci VOC ve voscích přítomných v uměleckých dílech (Orsay museum, Paříž; Lattuati-Derieux a kol., 2008b).

GC/MS je vhodnou technikou pro **analýzu sacharidů z rostlinných gum**. Tyto materiály jsou využívány od dávných dob jako pojiva zejména ve výtvarném umění. V různých historických údobích, lokalitách a uměleckých dílnách byly využívány gummy z různých rostlinných zdrojů, které mají různé složení sacharidů. Příprava vzorků k analýze zahrnuje rozklad řetězců polysacharidů na monosacharidy methanolýzou a jejich převedení na těkavé deriváty vhodnou reakcí (např. trimethylsilylaci), jak ukazuje **obrázek 3-11**.



Obrázek 3-11 Chemická úprava vzorků rostlinných gum

Pro GC/MS charakterizaci rostlinných gum je nezbytná kvantitativní konverze oligo- a polysacharidů na monosacharidy a stanovení obsahu jednotlivých monosacharidů. Příklad GC/MS analýzy ukazuje chromatogram na **obrázku 3-12**. Představu o rozdílech v obsahu monosacharidů můžeme získat z **tabulky 3-1**.



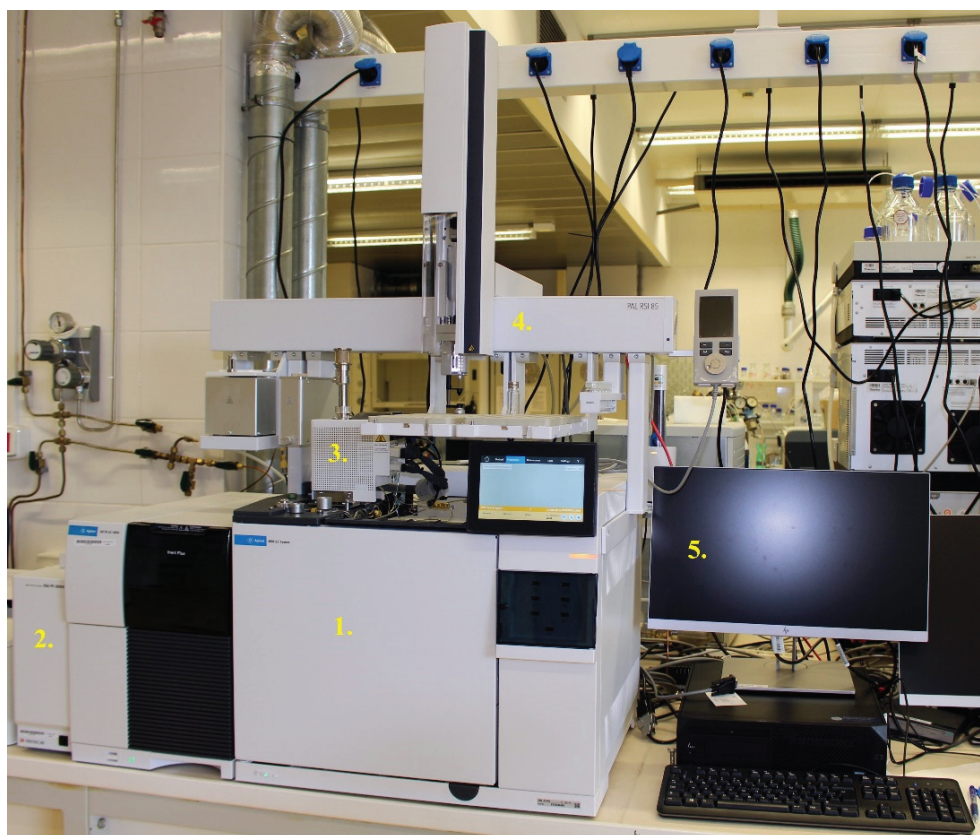
Obrázek 3-12 Chromatogramy z GC/MS analýz guma z opuncie (typ cukerného cyklu: p (pyranosa), f (furanosa); typ anomeru: a (alfa), b (beta); Ara: Arabinosa, Rha: Rhamnosa, Fuc: Fukosa, Xyl: Xylosa, Man: Manosa, Gal: Galaktosa, Glu: Glukosa, GalU: Galaktouronová kyselina; převzato z Guasch-Ferré a kol., 2020)

Tabulka 3-1 Obsah monosacharidů ve vybraných rostlinných gumách (procentuální zastoupení vztažené k součtu obsahů těchto cukrů, převzato a adaptováno z Guasch-Ferré a kol., 2020)

Rostlinné guma	Ara	Rha	Xyl	Fuc	Man	Gal	GalU	Glu	GluU
arabská guma	37,2	11,2	–	–	–	44,7	–	–	7
tragantová guma	34,7	3,4	14,9	7,4	–	10,8	13,8	11,5	3,5
hrušňová guma	34	2,8	6,1	–	5,1	38	–	–	14
třešňová guma	35,5	2,8	6,6	–	5,5	37	–	13	–
trnková guma	36	2,8	6,9	–	5,3	36	–	–	13
guma ghatti	47	3,5	–	–	2,5	36,5	–	–	11
guma karaya	–	25,5	–	–	–	64	7	–	4
švestková guma	36	2,8	6,96	–	5,3	36	5,6	43,6	–
guma z opuncie	14,5	6,3	8,4	0,5	1,7	19,5	5,6	43,6	–

Tyto rozdíly lze, zejména v kombinaci s nástroji vícerozměrné statistiky, využít pro bližší klasifikaci poživ v malbách s ohledem na biologické zdroje a potažmo „terroir“ (Riedo a kol., 2013). Alternativní možností, která je rychlejší s ohledem na předběžnou úpravu vzorku, je předřazení pyrolýzy před GC/MS (Py-GC/MS). Přístroj pro GC/MS umožňující on-line pyrolýzu vzorku je na **obrázku 3-13**.

Toto řešení dovoluje obvykle velmi citlivou analýzu. Na druhé straně, po pyrolýze vzniká velmi komplexní směs, která obsahuje od každého monosacharidu řadu izomerů a produktů dehydratace. Analytická pyrolýza je často s výhodou prováděna přímo s přidavkem derivatizačního činidla, což dovoluje rychlé převedení vzniklých pyrolytických produktů na těkavé deriváty v jednom kroku. Produkty vznikající při pyrolýze cukrů byly podrobně popsány například v práci Fabbriho a Chiavariho (2001). GC/MS a Py-GC/MS byly pro charakterizaci polysacharidů v rostlinných gumách použity v celé řadě studií. Zajímavé jsou práce



Obrázek 3-13 Přístroj pro GC/MS s možností on-line pyrolýzy vzorku (1. plynový chromatograf, 2. hmotnostní spektrometr, 3. pyrolýzní modul, 4. automatický dávkovač vzorku, 5. počítač; laboratoř KACH)

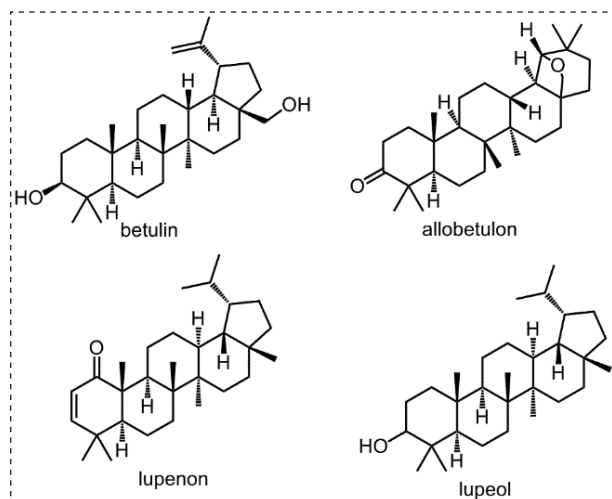
zabývající se zbytky majských nástěnných maleb (Guash-Ferre a kol., 2020), středověkých inkoustů vyrobených s využitím arabské gumy (Bleton a kol., 1996), akvarelových maleb (Chiantore a kol., 2009), a řada dalších (např. Bonaduce et al., 2007; Colombini a Bonaduce, 2012; Pitthard and Finch, 2001).

GC/MS se dobře osvědčila i při analýze proteinových pojiv. Bonaduce a kol. studovali původ pojiv v polychromiích na terakotových sochách ztvárnujících armádu císaře Qin Shi Huanga (210–209 př.n.l.) v Číně (objekty pohřebního umění, které byly pochovány s císařem pro jeho ochranu v posmrtném životě). Postup zpracování vzorku je uveden dále a dává obecnější představu o úpravě komplexních vzorků pro GC a GC/MS. Proteiny byly ze vzorků extrahovány roztokem amoniaku. Tím došlo k oddělení nerozpustných anorganických solí. Extrakt byl následně odpařen k suchu a odparek rozpuštěn v roztoku trifluoroctové kyseliny (TFA). Tento kyselý roztok byl nanesen na předkondicionovanou kolonku naplněnou silikagelem modifikovaným oktadecylovými řetězci (reverzní fáze; postup tzv. extrakce tuhou fází, SPE). Promýváním TFA došlo k oddělení dalšího podílu solí a jiných polárnějších balastních látek a přečištěné proteiny a peptidy byly následně vymyty směsí acetonitrilu s vodou, odpařeny, kyselce hydrolyzovány (rozloženy na jednotlivé aminokyseliny), silylovány a vytvořené deriváty byly analyzovány GC/MS. Vzorky z polychromií obsahovaly více aminokyselin než okolní půda (použitá jako referenční materiál). **Obsahy aminokyselin v referenčních materiálech tvoří tedy koncentrační hladiny dovolující vybrat vzorky, u kterých má smysl se analýzou aminokyselin vůbec zabývat (význam referenčních vzorků je tedy evidentní).** Pro identifikaci pojiva byly relativní procentické obsahy vzorků srovnány s dříve publikovaným datasetem 79 vzorků vajec, kaseinu a živočišného klihatu (Colombini a kol., 2000). Data byla dále studována analýzou hlavních komponent (PCA) a v odpovídajícím Score Plotu byla patrná dobrá separace všech tří typů proteinových pojiv a překryv studovaných vzorků s tímto datasetem (Bonaduce a kol., 2008). Podobně se GC/MS osvědčila při analýze organických reziduí (mastných kyselin a proteinových zbytků) v omítkách a omítaných podlahách (Pecci, 2013). Analýza aminokyselin může být použita i v jiných souvislostech. Analýza stabilních izotopů dusíku aminokyselin (ve formě N-acetylmethyl esterů, NACME, vznikajících hydrolýzou kolagenových zbytků z kostí) metodou GC-C-IRMS, která je popsána dále, dovoluje bližší charakterizaci archeologických živočišných i lidských kostí (Styring a kol., 2010). Je třeba dodat, že vedle polysacharidů a proteinů je v pojivech často důležité sledovat i olejové a tukové složky. Podrobněji je profil mastných kyselin a tuků popisován dále. Pro další informace o analytických metodách používaných při analýze pojiv v objektech hmotného kulturního dědictví je vhodné odkázat na přehledový článek Domenech-Carbo, 2008.

GC/MS se dobře uplatňuje při bližším průzkumu **organických barviv na historických textilních materiálech**. Ahn a Obendorf studovali barvivo alizarin a produkty jeho rozkladu (Ahn a Obendorf, 2004). Mezi degradačními produkty identifikovali benzoovou kyselinu, 2,4-di-terc-butylfenol, ftalanhydrid a dimethylftalát. O tři roky později analyzovala tato dvojice autorů pomocí GC/MS degradaci barviva kurkuminu. Byla nalezena celá řada nízkomolekulárních rozkladných produktů a mezi nimi i kurkumen, vanilin a feruloylmethan (Ahn a Obendorf, 2007). Kombinací pyrolýzy, silylace a GC/MS analýzy (používané se zkratkou Py-silylation-GC/MS) byly prostudovány látky strukturně vycházející z barviva indiga („indigoid compounds“). Technika byla použita pro bližší charakterizaci vícesložkového materiálu zvaného mayská modř („Maya blue“) ve vzorcích z archeologických nálezů z Mexika a Guatemaly. Vedle indiga byly nalezeny i oxidované složky, jako je např. dehydroindigo. Výsledky chemometrické analýzy získaných dat ukazují, že postupy výroby tohoto barviva se lišily regionálně a vyvíjely se v čase (Domenech-Carbo a kol., 2014).

Zajímavou oblastí, kde se uplatnila GC/MS, je i studium pozůstatků starověké kosmetiky. Ve studii Pérez-Arantegui a kol. studovali povrchy římského bronzového kosmetického nástroje a skleněné nádoby zvané *unguentarium* (1. stol. n.l.). Byly nalezeny pozůstatky složek mořeny barvířské ve dvou maticích: i) vonných olejích a ii) sádrovém prášku. Technikou Py-silylation-GC/MS byly identifikovány běžné mastné kyseliny (dominantní byla kyselina olejová), série α,ω -dikarboxylových kyselin s počtem uhlíků C7-10 (dominantní byla kyselina azelaová), dihydroxykarboxylové kyseliny s C18 (především 9,10-dihydroxy-oktadekanová kyselina, přítomná jako pár threo-erythro isomerů) a monoterpenický kafr (významná složka řady esenciálních olejů). Složení poukazuje na rostlinný olej. Vedle toho byl však zachycen i cholesterol. Ten ukazuje na příměs určitého množství živočišného tuku, což není u starých předpisů na výrobu parfémů nebo mastí běžné, ale v některých produktech bylo pozorované (např. etruské a krétské vonné nádoby, 8.–6. stol. př. n.l.). Barevná složka poskytla při pyrolýze diethyl-o-ftalát, di-2-methylpropyl-o-ftalát a dibutyl-o-ftalát, které mohou být považovány za markery anthrachinonů (Pérez-Arantegui a kol., 2009). Přítomnost anthrachinonového skeletu dále potvrdila hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí-ionizací a některá elektrochemická měření (kap. 3.2.3). GC/MS technikou byl při průzkumu obsahu malých keramických lahviček z jižního Levantu a Kypru (raná doba železná, 11.–9. stol. př. n.l.) detekován „skořicový aldehyd“ (aldehyd kyseliny skořicové, cinnamaldehyd), který je hlavní složkou skořice. Získané výsledky zajímavě dokreslují důkazy o existenci dálkového obchodu z jižní a/nebo jihovýchodní Asie na západ již v rané době železné (Namdar a kol., 2013). Analytické techniky používané při výzkumu starověké kosmetiky jsou popsány v přehledovém článku Ribechiniho a kol. (2011).

Analýza smoly poskytuje velmi zajímavé informace pro chemotaxonomii dřevěných materiálů v nálezích. Studie Hayeka a kol. porovnávala s využitím GC/MS a vícerozměrné statistické analýzy archeologické vzorky smoly neznámého původu se vzorky recentními z běžnějších známých dřevin (Hayek a kol., 1990). Následná studie tohoto autorského kolektivu zkoumala „lepidlo“ na nálezu hrotů šípů z doby měděné (Mondsee, Rakousko). Distribuce triterpenoidů a steroidů získané z GC/MS analýzy naznačuje, že použitý materiál pocházel z různých druhů břízy. Pro chemotaxonomii těchto materiálů byla významná zejména přítomnost betulinu, allobetulonů, lupenonu a lupeolu (Hayek a kol., 1991), jejichž struktury jsou uvedeny na **obrázku 3-14**.



Obrázek 3-14 Chemické struktury terpenoidů v nálezích obsahujících zbytky z březové kůry

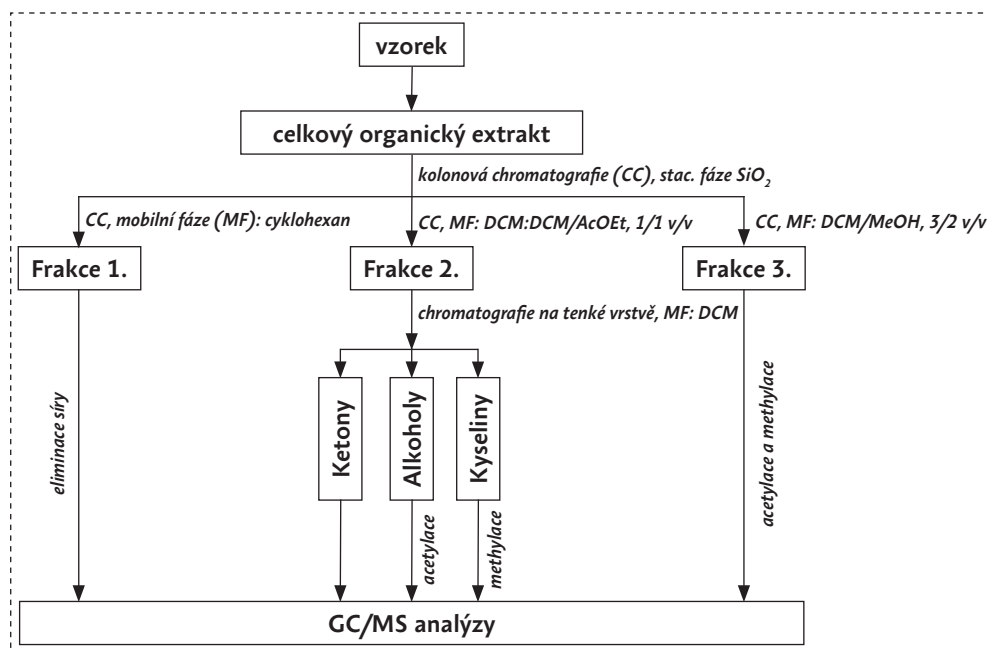
V této souvislosti je vhodné zmínit i použití pryskyřic z jehličnanů po jejich cílené teplotní úpravě (Connan a kol., 2003). Tyto materiály byly pomocí GC, GC/MS a MPLC (středotlaké kapalinové chromatografie) prokázány na vraku lodi ze středomořského břehu Izraele (Ma'agan Mikhael shipwreck, datováno 500 př. n. l.). Výsledky byly porovnány s recentními vzorky jehličnatých pryskyřic i se vzorky z jiných starověkých člunů z Marseille (Francie). Výsledky přesvědčivě ukazují na použití těchto materiálů pro ochranu povrchu lodí a jejich utěsnění. Regert a kol. využili GC/MS k výzkumu zbytků prehistorických lepidel. Výsledky mimo jiné ukázaly, že dehet z březové kůry vyrobený suchou destilací bílé březové kůry byl často používán už v neolitickém období (Regert a kol., 2004; Regert a kol., 2006). Archeologické nálezy živičných materiálů jsou poměrně časté v řadě lokalit. Za příklad může sloužit i studie Wendta a kol., který se zabýval jejich sbí-

ráním, zpracováním a používáním pre-hispánskými obyvateli Střední Ameriky 1200–500 př.n.l. (Wendt a Lu, 2006). Zbytky pryskyřičných lepidel byly studovány také v nálezech starověkých střelných zbraní (oštěpů a šípů) z jihozápadního Yukonu a Selwin Mountains. Většina vzorků složením odpovídala jedlové pryskyřici (Helwig a kol., 2014). Systematicky zaměřenou studii sledující rozdíly ve smolných a dehtových produktech tepelné degradace dřeva s ohledem na původ dřevin pomocí Py-GC/MS publikovali Puchinger a kol. Ukázali, že tato technika dovo-luje rozlišení použitých dřevin a rozdíly jsou velmi dobře zviditelněny použitím lineární diskriminační analýzy (LDA) (Puchinger a kol., 2007). GC/MS umožnila na základě profilu seskviterpenů, triterpenů a mastných kyselin prokázat damarovou pryskyřici ve vzorcích z vraků lodí (Burger a kol., 2009). Detailně se damarovými pryskyřicemi zabývá i další práce Burgerové a kol. (2011). V tomto sdělení se autoři zabývají taxonomickou charakterizací recentních čerstvých pryskyřic druhu *Dipterocarpaceae* a nalezením biomarkerů, které umožňují klasifikovat typ pryskyřice v archeologických nálezech z Bruneje (mj. ve dvou vzorcích nalezených v nádobách opět z vraku lodi). Zajímavý je postup zpracování vzorků použitý v této práci. Vychází se z předběžné frakcionace surového extraktu pomocí kapalinové chromatografie na silikagelu (**obrázek 3-15**). Analýza jednotlivých frakcí vede ke snížení složitosti chromatogramu, usnadnění identifikace jednotlivých typů přítomných sloučenin a zlepšení limitů detekce metody.

Z výsledků studie autoři vytvořili molekulární charakteristiky jednotlivých rostlinných druhů používaných pro získávání damarových pryskyřic (**tabulka 3-2**). Použitý postup ukazuje klasický přístup k taxonomické charakterizaci založený na přímém profilování těch typů rostlinných metabolitů, které se mohou mezi jednotlivými rostlinnými druhy významně lišit. Je pravdou, že nalezení velkých rozdílů mezi jednotlivými látkami je do určité míry otázkou štěstí. Častější je v dnešní době kombinace charakterizace s využitím nástrojů vícerozměrné statistiky, která pracuje s daleko větším počtem (i méně se v profilu lišících) metabolitů.

Tabulka 3-2 Molekulární charakteristiky (markery) čerstvých damarových pryskyřic (+, dominující složky; –, minoritní složky)

	Dammaradien-3-on	α a β -amyrenony	betulonal	oleanonové a ursonové aldehydy
<i>Shorea guiso</i> Blume	+	+	–	–
<i>Dipterocarpus</i> <i>obtusifolius</i> Teysm	+	–	+	–
<i>Dipterocarpus</i> cf. <i>Dyeri</i>	+	–	+	+
<i>Dipterocarpus intricatus</i> Dyer	+	–	+	–



Obrázek 3-15 Postup zpracování vzorku pryskyřic pomocí frakcionace kapalinovou chromatografií (DCM, dichlormethan; AcOEt, ethylacetát)

Analýzou nálezů jantaru kombinací tepelné desorpce s GC/MS (tedy TD-GC/MS) a infračervenou spektroskopií se zabývá práce týmu Virgolicchio a kol. (2010). S využitím vícerozměrné statistiky dosáhli klasifikace různých typů jantaru. Chemickou charakterizací a rozlišením různých jantarů typu valchovitu a študlovitu v nálezech z doby halštatské se zabývá práce českého autorského kolektivu (Havelcová a kol., 2016). Autoři využili kombinace dat z TMAH-Py-GC/MS (podrobnosti o metodě jsou uvedeny dále), ATR-FTIR a FT-Ramanovské spektroskopie. V jantarech „baltského typu“ byly vedle dehydroabietové kyseliny nalezeny rovněž D-fenchylalkohol, kafr, borneol a jantarová kyselina (Park a kol., 2016). Tyto látky jsou považovány za typické konstituenty baltských jantarů. Rozlišení kanadských jantarů bylo založeno na řadě lipofilních látek uvolněných po pyrolýze vzorků. Mezi ně patřily labdany, jantarová kyselina, komunol (communol), komunová kyselina, ozol, ozová kyselina atd. (Poulin a Helvig, 2016). GC/MS byla použita i pro bližší průzkum černých korálků z nálezů v čínské archeologické lokalitě Changle Cemetery v Ningxii z období dynastie Han (202 př.n.l. – 220 n. l.). Dle analýz však v tomto případě nejde o výrobek z pryskyřice. Data ukazují, že jde spíše o materiál připomínající uhlí, o čemž vypovídá charakteristický profil n-alkanů, acyklických

isoprenoidů a terpenoidů (Sun a kol., 2020). Tato práce ukazuje, jak důležitá je chemická analýza už při základní charakterizaci materiálů.

Py-GC/MS a TMAH-Py-GC/MS umožnila přiblížit původ černého, lesklého povlaku pokrývajícího skalní malby v jeskyni Little Lost River (Idaho, USA). Data byla porovnána s analýzou tepelně upravené huminové kyseliny a amberatu (krustě podobné asfaltu), kterou produkuje křeček huňatoocasý (dříve také lesomyš, *Neotoma cinerea*), a neznámý materiál má svým složením blíže k huminové kyselině, což dle autorů naznačuje geologický původ povlaku spíše než antropogenní (Fezzey a Armitage, 2006). Tato studie ukazuje, jak významná je pro analýzu komplexních archeologických materiálů dostupnost vhodných (nebo vhodně připravených) srovnávacích materiálů. Bez nich by ani vysoce selektivní GC/MS metody neumožnily odpovědět otázku původu prehistorických materiálů. Poznamenejme, že stáří, kvalita a způsob ošetření archeologického dřeva charakterizuje přítomnost i některých dalších nízkomolekulárních látek. Například Glastrup a kol. dávají do souvislosti obsah kyseliny mravenčí s obsahem polyethylenglykolu přidaného do dřeva pro jeho konzervaci a obsah kyseliny octové se stářím dřeva. Tato studie byla prováděna na vzorcích ze starověkých lodí Vasa, Bremer Kogge a Oberlander boat a dánských vikingských plavidel (Glastrup a kol., 2006). Py-GC/MS byla použita i pro analýzu černého pevného materiálu asfaltové povahy v keramické nádobě ze 14.–13. století př. n. l. (Kypr) a organických patin z bronzové sochy Neptuna z r. 1566 n. l. (Bologna, Itálie). V těchto materiálech byly nalezeny alifatické mono- a dikarboxylové kyseliny, zřejmě pocházející z rostlinného oleje. V případě sochy Neptuna je patina patrně pozůstatkem ošetření olejem s řadou atmosférických depozic (Chiavari, 1991). Podobně byla tato technika použita pro analýzu patin ze zlatých nádob z egyptských nálezů (poklad „Tři princezen“ z doby faraona Thutmosise III.). Získané chromatogramy – pyrogramy – vykazovaly vysoký stupeň vzájemné shody, což poukazuje na souvislost studovaných objektů. Studované pyrogramy byly podobné pyrogramům získaným analýzou standardních směsí solí mastných kyselin s dlouhými řetězci (Shedrinsky a kol., 1991). Curie-point Py-GC/MS byla použita pro analýzu organických zbytků z vnitřních a vnějších částí nádob nalezených v původních římských osídleních v Nizozemí (Uitgeest-Groot Dorregeest; Oudemans a Boon, 1991). Byly detekovány mastné kyseliny, markery proteinů a polysacharidů a na vnějších částech nádob rovněž polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), které byly součástí kondenzátů z kouře (dehtů) pravděpodobně pocházejících z vaření na ohni (jsou tedy důkazem úpravy potravin za zvýšené teploty). Je vhodné doplnit, že dehtové/asfaltové materiály (živice) byly studovány i v jiných souvislostech. Py-GC/MS byla použita pro důkaz obchodu a exportu surových živic z oblastí kolem Mrtvého moře do egyptských obchodních center (3900–2200 př. n. l.), patrně v souvislosti s rozsáhlým používá-

ním materiálů asfaltové povahy pro mumifikaci ve starověkém Egyptě (Connan a kol., 1992). Přítomnost asfaltových složek byla potvrzena i v balzamovacích prostředcích z egyptské mumie datované do 7. stol. př.n.l. (Colombini a kol., 2000).

Py-GC/MS byla rovněž použita k výzkumu semen ředkve a ječmene z archeologických nálezů. V pyrogramech dominovaly produkty rozkladu proteinů a Maillardových sloučenin (vznikajících z aminokyselin a cukrů), zejména alkylpyrazinů a alkylpolysulfidů. Studie vede k závěru, že degradace proteinů a polysacharidů ve velmi dlouhém časovém kontextu je omezená (Bland a kol., 1998). Výsledky tedy potvrzují, že proteiny a polysacharidy lze v archeologických materiálech rostlinného původu detekovat a využít pro podrobnější výzkum. V práci Poinara a Stankiewiczze byly v řadě fosilních zbytků živočišného původu (člověk neandrtálský, mamut, divoký osel, kůň, pavián, jeskynní medvěd atd.) nalezeny 2,5-diketopiperaziny z dipeptidů obsahujících aminokyselinu prolin, které jsou zřejmě pozůstatky bílkovin, mj. kolagenu (Poinar a Stankiewicz, 1999). „Flash“ pyrolýza v kombinaci s plynovou chromatografií umožňuje i **blíží charakterizaci ligninu jako základní složky archeologických dřev** (van Bergen a kol., 2000). Tato studie ukazuje, že nepřítomnost 3-methoxy-1,2-benzendiolů zřejmě souvisí s demethylací syringylových jednotek v ligninu krytosemenných rostlin, která nastává velmi brzy v průběhu rozkladu dřeva. Zajímavých prací zabývajících se charakterizací ligninu v archeologických dřevěch vzniklo v průběhu času více (Giachi, 2003; Colombini a kol., 2009; a další). Analýza PAH umožňuje poodhalit původ opálených zuhelnatělých zbytků dřev a studium vzniku ohňů v paleolitických obdobích – paleofires events (Zou a kol., 2010). Práce Ribechini a kol. se zabývala studiem rozdílů ve složení kůry z běžných druhů stromů: topolu černého, buku lesního, habru obecného, kaštanovníku setého, dubu cesmínovitého, dubu letního, dubu korkového a břízy bělokoré (Ribechini a kol., 2015). Byly použity dvě techniky: přímá hmotnostní spektrometrie látek uvolněných zvýšenou teplotou z materiálu (evolved gas analysis – mass spectrometry, EGA-MS) a GC/MS po úpravě vzorku alkalickou hydrolýzou, extrakcí rozpouštědlem (hexanem a diethyletherem po okyselení vzorku na pH = 2 kyselinou chlorovodíkovou) a derivatizací silylačním činidlem (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid, BSTFA). EGA-MS, u které nedochází k chromatografické separaci a uvolnění analytů/jejich pyrolýzních produktů je řízeno nastavovanou teplotou, umožnila získat přehled o suberinu, ligninu a polysacharidech, které jsou přítomny v rostlinných buněčných stěnách a jejich profil je ovlivněn druhem rostliny (zde stromů). Technika GC/MS dovolila detailní analýzu zejména lipofilních látek, mezi které patřily zejména mastné alkoholy (s počtem uhlíků, C20–C28), nasycené mastné kyseliny (C20–C28), γ -hydroxykyseliny (nasycené: C16–C26; nenasyčené a vícehydroxylované), α , γ -dikarboxylové kyseliny (C16–C24) a substituované (označené jako

α , γ -diC_{18:1} a 9-methoxy-10-hydroxy- α , γ -diC_{18:0}). Kombinace detailního studia získaných chromatogramů a MS spekter s vícerozměrnou analýzou dat (PCA) umožnila vyslovit některá fakta o studovaných kůrách s potenciálem k jejich bližší klasifikaci. EGA-MS analýzou bylo zjištěno, že kůra břízy a dubu korkového obsahuje nižší obsahy polysacharidů (celulosity a hemicelulosity) a vyšší obsahy suberinu. Obsah polysacharidů v kůře buku lesního byl největší ze všech sledovaných vzorků. Py-GC/MS byla použita i pro charakterizaci sub-fosilizovaných semen ostružiny a plané jabloně z archeologického průzkumu žumpy z 10. stol. n. l. (Coppergate, York). Analýza odhalila produkty pyrolýzy polysacharidů a polyfenolů svědčící o přítomnosti lignocelulosity. V pyrolýzátu dominoval guaiacol (2-methoxyfenol) a jeho deriváty (4-methylguaiacol, 4-vinylguaiacol, 4-ethylguaiacol, trans-iso Eugenol). Významně byl však zastoupen i syringol a jeho deriváty (2,6-dimethoxy-4-methylphenol nebo 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenol)ethanol – tyto struktury nebyly rozlišeny, 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol, syringylaceton a (pravděpodobně) propiosyringon). Méně zastoupené, ale stále velmi dobře patrné, byly markery hemicelulosity (zejména 4-hydroxy-5,6-dihydro-(2H)-pyran-2-on) a celulosity (hydroxypropanol, methylester pyrohroznové kyseliny, 2-furaldehyd, 1-acetoxypentan-2-on, 2,3-dihydro-5-methylfuran-2-on, 1,6-anhydro- β -D-glukopyranosa). Pyrolýzát semenného obalu semínka ostružiny z archeologického nálezu byl velmi podobný pyrolýzátu recentního semínka této rostliny (McCobb a kol., 2001).

Kombinace analytické pyrolýzy s GC/MS může posloužit i k širší identifikaci zbytků rostlin. Analýzou velkého množství rostlinných druhů obývajících středomořské oblasti v období neolitu byly specifikovány molekulární markery dovolující jejich taxonomické zařazení. Schellekens a kol. analyzovali kořeny a nadzemní části řady rostlin (Schellekens a kol., 2013). Vybrané příklady jsou uvedeny v **tabulce 3-3**. Charakteristické signály byly z naměřených pyrogramů vybrány na základě jejich pravděpodobného původu a chemické podobnosti. Je třeba upozornit, že většinou nejde o původní látky přítomné v rostlinném materiálu, ale o produkty jejich tepelné degradace. Je zřejmé, že možnosti identifikace jsou omezené a zdaleka ne všechny studované druhy rostlin je možno uvedeným postupem rozlišit. V některých případech se dokonce nezdařilo markery významné pro některé rostliny chemicky spolehlivě identifikovat. Některé taxonomické rysy jsou však analýzou chemických markerů postihnutečné.

Tabulka 3-3 Rostlinné druhy studované technikou Py-GC/MS a nalezené molekulové markery indikující přítomnost jednotlivých rostlinných druhů (vybrané příklady, převzato a upraveno z Schellekens a kol., 2013)

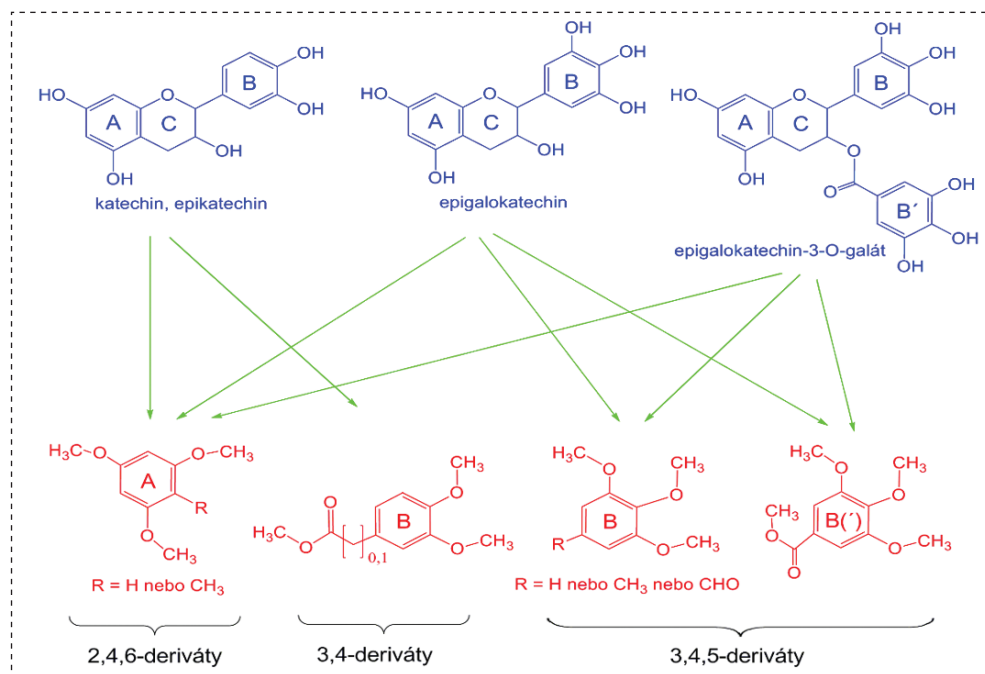
Čeleď	Název	Latinský název	Vybraný molekulový marker
Cupressaceae	Jalovec červenoplodý	<i>Juniperus oxycedrus</i>	junipene (seskviterpenoid)
Pinaceae	Borovice halepská	<i>Pinus halepensis</i>	methyl ester kyseliny dehydroabietové
Anacardiaceae	Řečík lentišek	<i>Pistacia lenticus</i>	C23:1 alkylfenol
Fabaceae	Hrachor cizrnový	<i>Lathyrus cicera</i>	3-methoxyfenol
	Hrachor setý	<i>Lathyrus sativa</i>	
	Čočka	<i>Lens culinaris</i>	
	Bob obecný	<i>Vicia faba</i>	
	Víkev	<i>Vicia sativa</i>	
Oleaceae	Olivovník	<i>Olea europaea</i>	benzaldehyd*, methoxybenzaldehyd
Poaceae	Ječmen	<i>Hordeum vulgare</i>	marker s m/z hodnotou 290**
	Pšenice setá	<i>Triticum aestivum</i>	
	Pšenice naduřelá dvouzrnka	<i>Triticum dicoccum</i>	

* – společný marker s *Phyllirea angustifolia*; ** – marker doposud neobjasněné struktury, společný ječmeni, pšenici seté, pšenici dvouzrné a kořeni kavylu halfového

Lze předpokládat, že přesnějších výsledků bude možno dosáhnout integrací výsledků z více analytických technik. Vzhledem ke komplexnosti pyrogramů byly zkoušeny dokonce i možnosti kombinace pyrolýzy s dvourozměrnou plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (Py-GCxGC/MS). Takto byly analyzovány tradiční ručně vyráběné papíry z východní Asie (Han a kol., 2016). Dvourozměrná chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií byla použita i pro studium organických reziduí na prehistorických kamenných nástrojích (Perrault a kol., 2016). **Řada prací využívá GC/MS a Py-GC/MS pro studium umělé degradace materiálů.** Zkoumán byl například vliv UV záření na chemické změny dřeva. Zajímavým experimentem je on-line spojení UV ozařování s Py-GC/MS. Práce ukázala, že UV záření ovlivňuje zejména ligninovou frakci dřeva. Byly pozorovány významné rozdíly mezi UV degradovatelností jedlového a kaštanového dřeva. Kaštanové dřevo je degradováno významně pomaleji (Mattonai a kol., 2019).

Zajímavou variantou umožňující studium výšemolekulárních zbytků potravin je již dříve zmíněná kombinace působení hydroxidu tetramethylamonného (TMAH) s teplotně asistovanou hydrolýzou a methylací a GC/MS analýzou (THM-GC/MS nebo též TMAH-GC/MS). **Touto technikou je možno analyzovat například zbytky polymerních taninů (proanthokyaninů) ze starověkých vín a určit**

tak, která rezidua mají původ v produktech ze zpracování vinných hroznů. Při úpravě vzorků TMAH dochází k depolymerizaci řetězce proanthokyanidinových jednotek, jejich štěpení (rozštěpení C-kruhu flavanového skeletu) a jejich methylaci. Proces štěpení flavanového skeletu, methylaci a strukturu vznikajících látek ukazuje schéma na **obrázku 3-16**. Takto vznikají látky 2,4,6-trimethoxybenzen, 2,4,6-trimethoxytoluen, di- a trimethoxystyren, methylester kyseliny 3,4-dimethoxybenzoové, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyd a další, které jsou snadno detekovány GC/MS technikou (Garnier a kol., 2003).



Obrázek 3-16 Vznik benzenoidních produktů během termochemolýzy v přítomnosti TMAH (převzato a upraveno z Garnier a kol., 2003)

Některé z těchto látek mohou vznikat i termálním rozkladem ligninů, které jsou významnou složkou sedimentárních materiálů a jsou hojně přítomny v archeologických nálezech. Autoři však uvádějí, že při degradaci ligninů vzniká i řada jiných charakteristických látek („phenolic C6–C3 constituents“ s odkazem na práci Vane a kol., 2001), které byly v diskutované studii pozorovány „jen vzácně“. Je patrné, že výsledky založené na této metodě musí být interpretovány opatrně a podpořeny řadou kontrolních experimentů. Vedle toho byla s využitím GC/MS techniky po předchozí pyrolýze analyzována semena z hroznů révy vinné získaná během

archeobotanického průzkumu nálezů ze středověkého byzantského venkovského osídlení v oblasti Salento (Lecce, Itálie). Byly zjištěny vysoké obsahy 4-methylkatecholu a 4-methylguajakolu, které jsou obvykle spojovány s degradací ligninu, který vnější vrstvy semene obsahují. Vedle toho byly nalezeny indikátory přítomnosti cukrů, například 3-hydroxy-2-methyl-2-cyclopenten-1-on (Capellini a kol., 2010). Technika využívající teplotně asistované hydrolýzy vzorků s methylací byla použita i pro studium laků v čínských archeologických nálezech („Období válčících států“, 475 a 221 př. n. l.). Studie přináší řadu zajímavých poznatků k lakovacím technikám používaným ve starověké Číně (Fu a kol., 2020).

Instrumentálně komplikovanější, ale pro analýzu komplexních vzorků efektivní, je **kombinace off-line („oddělené“) pyrolýzy se silylací na mikrovlákně s GC/MS** (offline analytical pyrolysis solid-phase microextraction with on-fiber silylation and gas chromatography-mass spectrometry, Py SPME Syl GC/MS). Tato technika byla použita pro studium povrchových úprav strunných nástrojů vyrobených starými mistry v období 16.–18. stol. (Stradivari a jeho současníci). Studii předcházela velice komplexní analýza řady běžných pryskyřičnatých materiálů (kalafuna, jantar, mastix, sandarak, elemi), šelaku, barviv (mořeny barvířské, Dragon's blood, prášku z Aloe vera) a včelích produktů (propolisu, včelího vosku), která umožnila porovnáním s analýzou autentických vzorků získat řadu informací k technologii úpravy vzácných dřevěných objektů (Kasprzok a kol., 2020).

Plynová chromatografie se v řadě experimentálních uspořádání uplatňuje v charakterizaci potravinových ingrediencí v keramických nádobách pomocí řady archeologických biomarkerů. Patří sem zejména **analýza lipidického profilu (přes analýzu mastných kyselin) a charakteristických sterolů (fytosterolů přítomných v rostlinách a zoosterolů v živočiších)**. Poměr vybraných mastných kyselin pak umožňuje určit, z jakých živočichů daný potravinový zbytek pocházel. Rozlišit lze zbytky ryb, přežvýkavců a monogastričních zvířat. Možnosti využití profilování obou typů látek, tedy lipidů a sterolů, přehledně popisuje článek Rošiaka a kol. (2020).

Netypickou pro oblast archeologie, ale velmi užitečnou technikou, se stala **preparativní plynová chromatografie**. Ta umožnila separaci a izolaci několika mastných kyselin. Frakcionované mastné kyseliny mohly být podrobeny **datování založeném na izotopu uhlíku ^{14}C** (Evershed a kol., 2002; Stott a kol., 2003). O deset let později byla preparativní varianta plynové chromatografie použita v kombinaci s programovanou teplotou odpařování vzorku při jeho dávkování. Po optimalizaci umožňovala vyvinutá metoda s vysokou účinností zachyt řady látek a mezi nimi i vysokovroucích složek n-hentriakontanu a methyl lignocerátu. Autoři uvádějí, že tuto metodu je možno dobře použít pro různé třídy látek včetně n-alkanů, esterů mastných kyselin, esterů vyšších mastných alkoholů,

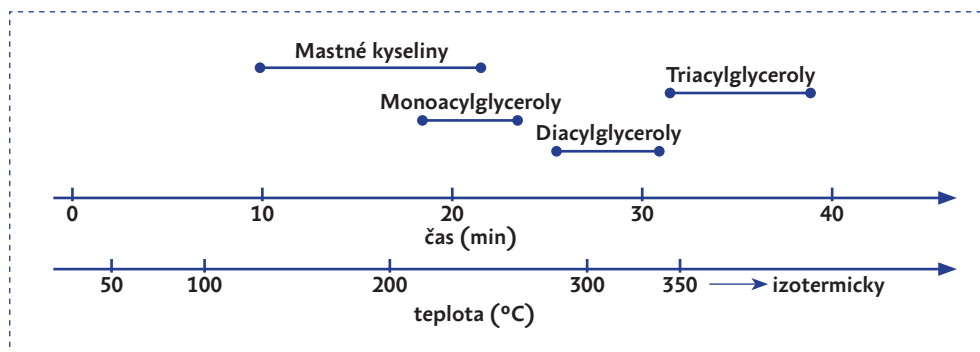
polycyklických aromatických uhlovodíků a steranů (Zhang a kol., 2013). Vítězné tažení kombinace preparativní plynové chromatografie s látkově-specifickým datováním založeným na ^{14}C se odráží v recentní práci skupiny prof. Eversheda publikované v prestižním časopise Nature (Casanova a kol., 2020). Pro datování bylo využito izolovaných kyselin palmitové a stearové (patrně nejvíc probádaných a spolehlivých). Autoři uvádí, že vyvinutá metoda dovoluje spolehlivě určit (1) dobu používání nalezených archeologických nádob, (2) stáří organických reziduí přítomných v nádobách, (3) chronologii míst i při absenci tradičně datovatelných materiálů, (4) přímé ověření typochronologie nádob.

Py-GC/MS se osvědčila i pro detekci anorganických pigmentů. Jako příklad může sloužit analýza polychromovaných čínských archeologických objektů (terakotových nádob datovaných do doby 206 př.n.l. – 23 n. l.). Ve spektru z Py-GC/MS analýzy byly nalezeny izotopy rtuti (monitoring iontů s m/z 198, 200 a 202) a síra (monitoring iontů s m/z 64 dokazující přítomnost produktů pyrolýzy SO_2 a S_8). Tyto výsledky ukazují na přítomnost cinnabaritu (rumělký) ve vzorcích polychromie (Chiavari a Mazzeo, 1999).

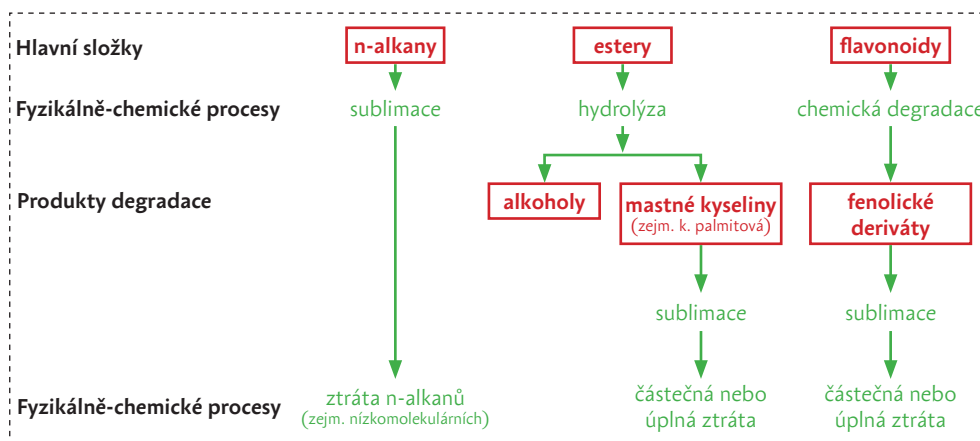
Možnosti plynové chromatografie jsou omezeny těkavostí analytů. Rozšířené možnosti dává **vysokoteplotní plynová chromatografie**, jak ukázal Evershed se svým týmem už v roce 1990 (Evershed, 1990). Tuto techniku použili pro analýzu intaktních lipidů (mono, di a triacylglycerolů a voskových esterů) v extraktech z keramických nádob z raného středověku. Protické skupiny volných mastných kyselin a hydroxylovaných sloučenin pokryli trimethylsilylací. Pro detekci byla použita hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací s rozhraním upraveným pro práci s vysokou teplotou. Schéma na **obrázku 3-17** demonstruje, při jakých teplotách mohou být separovány a eluovány jednotlivé acylglyceroly dle stupně acylace. S vývojem kvalitních a velmi stabilních stacionárních fází se možnosti dlouhodobé práce za vysokých teplot významně rozšiřují.

Chemickými přeměnami včelího vosku a jeho používáním v archeologických souvislostech se s využitím akcelerovaného stárnutí (při 60 a 100 °C po dobu 7 měsíců) a technik GC, GC/MS a FTIR zabýval Regert a kol. (2001). Pozorovány byly ztráty nízkomolekulárních n-alkanů (především zřejmě sublimací) a hydrolyza esterů vedoucí ke tvorbě odpovídajících mastných alkoholů se sudým počtem uhlíků a palmitové kyseliny. Fenolické látky byly zachyceny v modelově zestařených vzorcích, ale nebyly identifikovány v žádném ze studovaných autentických archeologických vzorků (organické zbytky z keramických nádob z období neolitu). Schéma na **obrázku 3-18** shrnuje dominantní procesy probíhající při stárnutí (degradaci) včelího vosku. Výzkum složení včelího vosku v archeologických kontextech pokračoval v dalších letech (Garnier a kol., 2002; Kimpe a kol., 2002). Spolu s dalšími látkami bylo prokázáno použití včelího vosku ve zbytcích

těsnících a impregnačních materiálů a maleb z vraků lodí nalezených ve starověkém přístavu San Rossore (Pisa, Itálie). Vedle GC/MS byla dále pro průzkum vraků použita FTIR, EDX (energy-dispersive X-ray micro-analysis), XRD (X-ray diffraction) (Colombini a kol., 2003). V této souvislosti asi není překvapivé, že GC/MS byla použita i pro analýzu keramických artefaktů používaných pro manipulaci se samotným medem (skladovací nádoby – hrnce a úly, 2.–5. stol. n. l., Pyrenejský poloostrov). V těchto vzorcích byla nalezena celá řada látek různé struktury od cukrů přes mastné kyseliny, aminokyseliny až po isoeugenol (vonná složka přítomná v řadě rostlin). Důležitou je identifikace hydroxymethylfurfuralu vznikajícího degradací cukrů, který se v medech často vyskytuje (Oliveira a kol., 2019).



Obrázek 3-17 Vysokoteplotní plynová chromatografie v analýze acylglycerolů (převzato a přeloženo z práce Eversheda a kol., 1990)



Obrázek 3-18 Schéma fyzikálně-chemických procesů probíhajících při degradaci včelího vosku (převzato z cit. Regert a kol., 2001)

Analýza lipidického profilu má velký potenciál při klasifikaci organických materiálů biogenního původu (Evershed a kol., 1990). Porovnání obsahu mastných kyselin a jejich izotopických profilů umožňuje například rozlišit tuk přežvýkavců od monogastrických hospodářských zvířat. Důležitým momentem při využití analýzy lipidů je fakt, že tukové materiály používané našimi předky jsou snadno zachytávány ve vrstvách neglazované keramiky v nádobách. Porézní mikrostruktura pálené hlíny dokáže zachovat podstatné množství jinak snadno degradovatelných biomolekul (Evershed a kol., 1997). Rozlišení původu zbytků tuků je předmětem řady prací z různých regionů (Anglie, 2500 př. n. l., Dudd a kol., 1999; Norsko, doba železná, Heron a kol., 2010 (mj. ω -(o-alkylfenyl) alkanové kyseliny, jako markery olejů z mořských živočichů) a další). Evershed a kol. nadto popisuje tvorbu ketonů s dlouhými alkylovými řetězci kondenzací mastných kyselin při jejich pyrolýze v přítomnosti pálené hlíny (Evershed a kol., 1995). Pozornost je dlouhodobě věnována i lipofilním látkám, které se mohou do neglazované keramiky uvolňovat z rostlinného materiálu. Byla publikována studie simulující používání starověkých keramických nádob pro zpracování zelí se zaměřením na složky epikutikulárního listového vosku (Charters a kol., 1997). **Pro věrohodnou analýzu je naprosto klíčová analýza kontrolních vzorků, např. z vnějších částí střepů z nádob** (Stern a kol., 2000), **okolní hlíny, srovnání obsahů v různých artefaktech** a podobně. Depozity lipidických látek byly pomocí GC/MS nalezeny i na prehistorických mlecích nástrojích. Diagnosticky je důležitý záchyt azealové kyseliny, která je oxidačním produktem nenasycených mastných kyselin. Podstatný je fakt, že tento marker byl nalezen na mlecích površích, ale ne na površích vzniklých rozlomením mlecích nástrojů (Buonasea, 2007). **I tento příklad ukazuje, jak důležitá je komunikace analytického chemika s archeologem nad situací v místě odběru a historickými a recentními souvislostmi studovaných objektů.** Pro detailní strukturní identifikaci lipidů přítomných v nalezených objektech je výhodné zapojení více metod. Příkladem může být kombinace HT-GC/MS s ESI-MS/MS analýzou, která dovolila detailní strukturní analýzu tukových reziduí v neolitických nádobách a následně rozlišení mléčného a adiposového tuku z rozdílných zdrojů – skot, ovce, kozy (Mirabaud a kol., 2007). Problematika analýzy reziduí lipidů s využitím GC technik a zejména s ohledem na používání mléka prehistorickými populacemi se dočkala kritického rozboru v přehledové práci Gerbaulta a kol. v roce 2013 (Gerbault a kol., 2013). Dodejme, že **poměr signálů mastných kyselin** není významný jen pro studium reziduí potravin. Analogicky **může být využit pro charakterizaci organických pojiv používaných na malbách.** Drakaki a kol. publikovali poměry mastných kyselin (C9/C16, C18:1/C18 a C16/C18) u několika typů organických pojiv (vaječný žloutek, lněný olej a lněný olej polymerizovaný) po jejich umělém zestaření. Byly

pozorovány významné rozdíly v těchto poměrech mezi jednotlivými materiály (Drakaki a kol., 2010). O pojivech v kulturně historických souvislostech je podrobněji pojednáno výše.

Spalování tukových a olejových materiálů bylo v historii hojně využíváno pro svícení. Kombinace umělého staření olejů s GC/MS analýzou a porovnání dat s autentickými vzorky umožnila určit druh oleje používaného v egyptských keramických lampách. Práce týmu Colombini ukazuje na použití oleje ze semen brukvovitých rostlin, *Brassicaceae* (Colombini a kol., 2005). Jiná studie uvádí vedle použití oleje ze semen brukvovitých rostlin (zejm. semen ředkve) rovněž významné použití oleje ricinového a živočišného tuku. V této studii je uvedeno několik vztahů mezi druhem materiálu a chemickým složením umožňujících klasifikaci použitého oleje, přičemž stojí za zmínku: 1. použití ricinového oleje prokazuje přítomnost ricinolejové a 9,12-dihydroxyoktadekanové kyseliny; 2. použití ředkvičkového oleje naznačuje přítomnost 13,14-dihydroxydokosanové a 15,16-dihydroxytetrakosanové kyseliny; 3. použití živočišných tuků indikuje přítomnost vysokých obsahů mastných kyselin $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ a 9,10-dihydroxyoktadekanové kyseliny v kombinaci se specifickými hodnotami $d^{13}C$ (Copley a kol., 2005).

Vedle lipidického profilu se ukazuje být zajímavé sledování profilu metabolitů cholesterolu (zejména tzv. 5- β -stanolů). Při poctivé interpretaci, srovnání s vhodnými referenčními vzorky a srovnání koncentrace 5- β -stanolů s jejich prekurzory a 5- α -izomery je možné výsledky analýz použít pro **hodnocení depozice výkalů v půdě v recentních i v archeologických souvislostech** (Bethell, 1994; Birk, 2012; ad.). Podobně, 5- β -stigmastanol a odpovídající 5- β -stanoly jsou biomarkery přírodního hnojení (Evershed a kol., 1997; Bull a kol., 1998). Stanovení sterolů (koprostanolu, cholesterolu, 24-ethylkoprostanolu, kampesterolu, stigmasterolu a β -sitosterolu), resp. některých jejich poměrů, např. cholesterol/(stigmasterol + kampesterol + β -sitosterol), umožňuje při dobrém vzorkovacím plánu charakterizovat užití jednotlivých místností v odkrytých prehistorických budovách – obyvací místnosti, kuchyně, stáje a podobně (Hjulstrom a Isaksson, 2009). Analýzou stanolů, stanonů, δ -(5)-sterolů a žlučových kyselin se zabýval i Birk a kolektiv (2012). Pro extrakci analytů z hlíny a pozemních sedimentů použili Soxhletovu extrakci a získali celkový lipidický extrakt (TLE). TLE zmýdelnili methanolickým roztokem hydroxidu draselného. Saponifikovaný extrakt byl dále frakcionován. Neutrální frakce byla přečištěna pomocí extrakce tuhou fází. Takto byly získány stanoly, stanony a δ -5-steroly, které byly dále silylovány. Žlučové kyseliny byly methylovány bezvodou HCl v methanolu. Tato technika umožňuje stopovou analýzu fekálních biomarkerů. Pozdější práce (Prost a kol., 2017) ukazuje možnosti použití fekálních biomarkerů pro odlišení zbytků exkrementů domácích zvířat a lidí. V této práci byly využity znalosti ze starší literatury a z vlastních provede-

ných analýz. Studovány byly exkrementy hovězího dobytka, koní, oslů, ovcí, koz, hus, prasat a lidí. Analýza δ -5-sterolů, 5- α -stanolů, 5- β -stanolů, epi-5- β -stanolů, stanonů a žlučových kyselin umožnila rozlišení všech těchto druhů s výjimkou dvojice hovězího dobytka a ovcí. Pozoruhodná je možnost rozlišení koňského trusu z poměru: (epi-5- β -stigmastanol:5- β -stigmastanol) + (epikoprostanol:koprostanol); spolu s přítomností chenodeoxycholové kyseliny. Metoda rovněž umožnila odlišení koziho trusu od ovčího/hovězího, které je založeno na rozdílech v obsahu chenodeoxycholové kyseliny.

Analýza triterpenoidu **miliacinu a jeho derivátů** umožňuje zase určit přítomnost reziduí **obilovin, a z nich zejména prosa** (*Panicum miliaceum*) **a čiroku** (*Sorghum*). Tyto látky jsou velmi stabilní a dlouhodobě přežívají v archeologicky relevantních objektech (nádoby apod.). Triterpenoidy byly analyzovány v souvislostech se stravovacími zvyky prehistorických a starověkých lidí (Kučera a kol., 2019) i s výživou domestikovaných zvířat, tedy pastvou a krmením (Copley a kol., 2004). Identifikace může být dále založena na fenolických lipidech – alkyresorcinolech (rozlišení pšenice a žita), jak uvádí Colonese a kol. (2017). Lucejko a kol. (2018) navrhli jako **biomarkery obilovin použít sekundární lipidové metabolity produkované ergotovými houbami** (*Claviceps*), které jako škůdci obiloviny často doprovázejí. GC/MS a LC/MS umožnily profilování mastných kyselin a triacylglyceridů-estolidů produkovaných těmito houbami. Analýza těchto látek je zajímavým rozšířením analytických možností při výzkumu zbytků obilovin i v případech, kdy mikroorganismy a fyzikálně-chemické procesy způsobí úplné rozložení obilovin ve starověkých nálezech.

V archeologickém výzkumu **kostí a zubů se jako velmi efektivní ukázala být kombinace metod měření izotopů s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií** (isotope ratio monitoring/gas chromatography/mass spectrometry, irm/GC/MS), vysokoteplotní chromatografií a její kombinací s hmotnostní spektrometrií. Tyto metody dovolují velmi citlivé stanovení cholesterolu a lipidů a spolu s poměrem stabilních izotopů uhlíku ^{13}C a ^{12}C (uváděná jako delta C-13 nebo d^{13}C) poskytují významné paleodietární informace (Stott a Evershed, 1996). Kombinace těchto metod umožnila i odhalení zbytků palmových plodů (*Phoenix dactylifera* L., *Hyphaena thebaica* L.). Pro studii byl zejména významný profil mastných kyselin (C12–C18, s netypicky vysokým obsahem C12) a hodnoty d^{13}C (Copley a kol., 2001). **Izotopová distribuce je využívána i ve spojení s on-line spalováním** (z angl. gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, GC-C-IRMS). Starší přehled aplikací od nástupu této techniky v r. 1990 do roku 1998 uvádí práce Meier-Augensteina a kol. (1999). Tato technika byla rovněž použita při rozlišení původu živočišných tuků (Mottram a kol., 1999). Určení d^{13}C specificky u mastných kyselin $\text{C}_{16:0}$ a $\text{C}_{18:0}$ v lipidických extraktech organických

zbytků z nádob objevených v prehistorických nalezištích Velké Británie metodou GC-C-IRMS prokázalo využívání mléka a produktů z něho už u neolitických osídlení. Princip metody je založen na faktu, že hodnota $\delta^{13}\text{C}$ u těchto mastných kyselin je měřitelně rozdílná u adiposového (tělního) a mléčného tuku (Copley a kol., 2003). Kombinace GC-C-IRMS, HT-GC a GC/MS byla použita rovněž při analýze složení starověkého „másla“ nalezeného ve skotských a irských rašelištích (tzv. bog butter). Tyto materiály byly dle analýzy lipidických extraktů vyrobeny z mléčných i adiposových tuků přežvýkavců. Pro rozlišení obou typů tuků byly použity grafy korelující hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ u $\text{C}_{16:0}$ a $\text{C}_{18:0}$ mastných kyselin ($\delta^{13}\text{C}(\text{C}_{16:0}) = f(\delta^{13}\text{C}(\text{C}_{18:0}))$) (Berstan a kol., 2004). Zajímavá je i práce využívající GC/MS a $\delta^{13}\text{C}$ pro určení původu vzorků archeologických kůží a způsobu jejich zpracování – činění (Spangenberg a kol., 2010).

Metodika sledování stabilních izotopů ($\delta^{13}\text{C}$) byla použita i pro studium biosyntetického původu mastných kyselin s C_{18} řetězcí v souvislosti s mlékem a adiposovým tukem. Bylo prokázáno, že vzorky ze zvířat volně se pasoucích (pastures) a z těch, které byly krmeny pící (fodders), se v izotopických profilech významně liší (Dudd a Evershed, 1998). Vedle delta mastných kyselin je zajímavé sledovat $\delta^{13}\text{C}$ i u vybraných aminokyselin. Coor a kol. analyzovali pomocí GC-C-IRMS trifluoracetyl-isopropyl (TFA-IP) estery aminokyselin v nálezech lidských kostí a zjistili, že $\delta^{13}\text{C}$ glycinu a fenylalaninu jsou významně vyšší u předků živících se stravou bohatou na mořské živočichy v porovnání s těmi, kteří se živili více masem pozemské fauny (Coor a kol., 2005). Možné je i rozlišení degradovaných tuků přežvýkavců (skot) a zvířat nepřežvýkavých (prase), jak uvádí Mukherjee a kol. (2007).

GC/MS se uplatňuje i při analýze reziduí omamných a návykových látek v archeologických vzorcích. Zajímavá je GC/MS identifikace takzvaných kavalaktonů, chemických složek nápoje kava. Kava je tradiční opojný nápoj původních obyvatel Oceánie vyráběný z kořenů rostliny kava kava, *Piper methysticum*. Kavalaktony (kawain, 7,8-dihydrokawain, yangonin, methysticin atp.) byly nalezeny v řadě artefaktů z archeologických průzkumů na Fidži (hliněné střepy, pohár z lebký a pohár z kokosového ořechu). Přítomnost reziduí těchto látek svědčí o používání tohoto nápoje již v dávných dobách na Pacifických ostrovech (Hocart a kol., 1993). Záchyt reziduí tetrahydropyridinových alkaloidů (arecaidinu a guvacinu) v nálezů ženských zubů během archeologického výzkumu na ostrově Rota (Mariánské ostrovy) zase poukazuje na používání betelu (semen rostliny *Areca catechu* L.) v tamních dávných kulturách. Analýza byla provedena GC/MS technikou v režimu selected ion monitoring – SIM (Hocart a Fankhauser, 1996). Dalším materiálem s psychoaktivními vlastnostmi, který byl v minulosti používán, je malý kaktus peyotl (*Lophophora williamsi*). Pomocí GC/MS a tenkovrstevné

chromatografie (TLC) byl v archeologických vzorcích tohoto kaktusu (nálezy datované do období 3780–3660 př. n. l.) nalezen meskalin (2-(3,4,5-trimethoxyfenyl) ethanamin) – psychoaktivní halucinogenní droga (El-Seedi a kol., 2005) tradičně používaná indiány jako prostředek spojení s božským světem a v nedávné historii zneužívaná například v univerzitních kampuzech (Bigelow a Edgar, 2006).

Rezidua kanabinoidů, jako jsou Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD) a kanabinol (CBN), byly rovněž detekovány v archeologických objektech (dva vápencové monolity, interpretované jako oltáře v Tel Aradu v Izraeli). Výsledky studie vedly k závěru, že na těchto monolitech bylo páleno konopí (Arie a kol., 2020). Práce Smith a kol. (2018) zase dokumentuje přítomnost opiových alkaloidů v malých džbánkových nádobách (Cypriot base-ring juglet). GC/MS a Py-GC/MS naznačily přítomnost degradovaného rostlinného oleje a patrně **reziduí papaverinu** (naznačující přítomnost máku). Detailní analýza opiových alkaloidů byla následně provedena pomocí LC/MS, která přítomnost papaverinu ve starověkých vzorcích jednoznačně potvrdila (vedle papaverinu byl nalezen i alkaloid thebain). Jinou návykovou látkou, která dlouhodobě přežívá v historických materiálech a může v nich být zachycena pomocí GC/MS, je **nikotin**. Ten byl například detekován ve starověkých dýmkách (nález v pahorku Adena s artefakty datovanými do doby cca 2500–2020 př. n. l. v rámci průzkumu v Cresap Mound Site, Západní Virginie, USA) (Rafferty, 2002). Z recentnějších vzorků je možno uvést zachycení reziduí morfinu extrahovaných z injekční stříkačky staré 125 let (Schablitsky, 2006). GC/MS rovněž potvrdila používání liány *Banisteriopsis* obsahující alkaloid **harmin** jako halucinogenního a medicínálního prostředku starověkými andskými populacemi ze severního Chile (Ogalde a kol., 2009). Ergosterol (5,7,22-ergostatien-3 β -ol) je považován za biomarker alkoholového kvašení a přítomnosti kvasinek v lipidických zbytcích nalezených v prehistorických nádobách. Tato látka je rovněž dobře identifikovatelná GC/MS technikou (Isaksson a kol., 2010). Pro detekci reziduí kofeinových nápojů byl jako dlouhodobý marker na základě modelových studií navržen samotný **kofein** (Reber a Kerr, 2012).

Plynová chromatografie umožňuje i analýzu malých organických kyselin, jako je **kyselina vinná, citronová, jablečná a jantarová**. Na detekci těchto látek je založen **průkaz reziduí vína** (ev. produktů vyráběných z vinných hroznů nebo vína), jak ukazují dvě práce Pecci a kol. z roku 2013 (Pecci a kol., 2013a; Pecci a kol., 2013b) a studie Garniera a Valamoti z roku 2016 obsahující řadu metodických vylepšení. Dalším alkoholickým nápojem, který byl hypoteticky používán starověkými středoamerickými populacemi, je pulque (kvašená šťáva z agáve). **Typickým problémem v určení zbytků složek takového typu vzorku je fakt, že jde o poměrně polární, ve vodě rozpustné látky, které mohou být snadno hydrolyzovány a vymyty z místa své depozice.** Skupina Correa-Ascencio a Eversheda

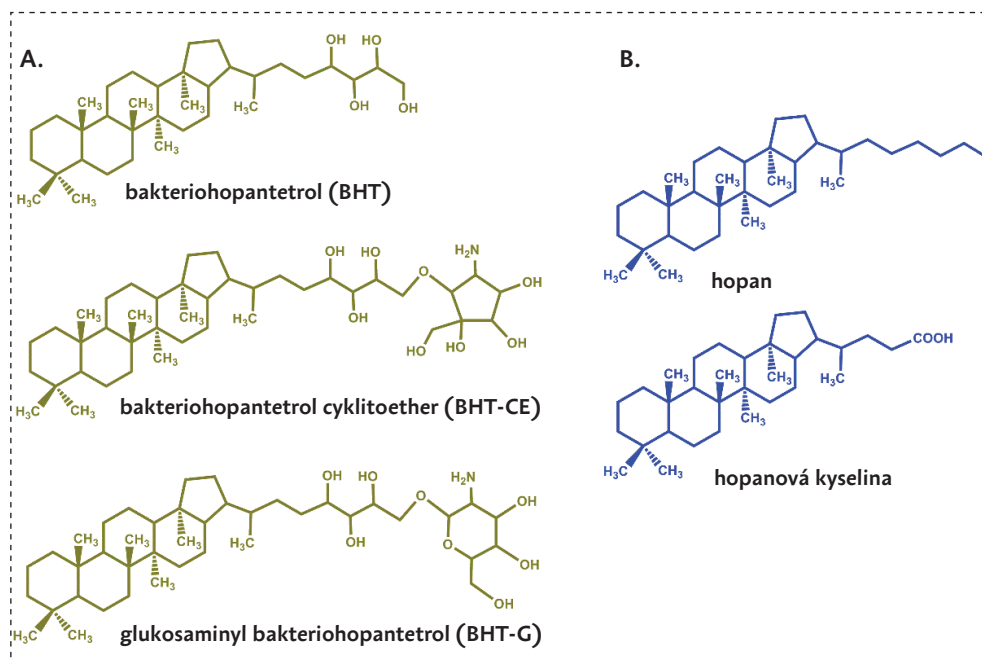
detekovala ve starověkých keramických nádobách látky bakteriohopanoidy, které mohou být považovány za markery působení bakterií *Zomomonas mobilis*. Tyto bakterie se účastní alkoholového kvašení. Bakteriohopanoidy jsou látky lipidické, silně nepolární a stabilní (chemická struktura vybraných intaktních látek je uvedena na **obrázku 3-19**), schopné přetrvat v chemicky nezměněné formě do dneška. Distribuce těchto látek je možno identifikovat GC/MS technikou v režimu SIM sledováním iontů s m/z 191 v lipidických extraktech obsahů zbytků nádob (Correa-Ascencio a kol., 2014). K bližšímu prostudování problematiky reziduí opojných látek v historickém kontextu je možno doporučit také přehledový článek Guerra-Doce (2015). **GC/MS analýza využívající spolupřítomnosti více či méně specifických markerů ve studovaných vzorcích umožnila prokázat i výrobu a užívání piva.** Mezi těmito markery jsou benzoová kyselina, skořicové kyseliny (hydroxyskořicová a methoxyskořicová), dikarboxylové kyseliny (jantarová, pimelová, suberová a azelaová), skvalen, glycerol a dusíkatá látka pyrolo[1,2-a]pyrazin-1,4-dion (Perruchini a kol., 2018). Posledně zmíněný pyrolo-pyrazinový derivát je nalézán v praženém ječném sladu a recentních pivech (Briggs a kol., 2004).

Na rozhraní mezi náboženskými a léčebnými účinky stojí složky z rostlin druhu *Ephedra*. Ve vzorcích z čínského archeologického naleziště Gumugou (nálezy zbytků větviček z období okolo 3800 př.n.l.) byly nalezeny látky benzaldehyd, tetramethyl-pyrazin a fenmetrazin. Výsledky byly porovnány s analýzami recentních vzorků, které se v přítomnosti těchto látek s archeologickými vzorky kvalitativně shodují. Tato data je tedy možno vysvětlit používáním rostlin druhu *Ephedra* už v dávné minulosti lidstva (Xie a kol., 2013).

Zajímavé informace přináší i analýza pozůstatků zubního kamene. Vzorky zubního kamene (recentní a 200 let staré vzorky) byly analyzovány kombinací kapalinové a plynové chromatografie. Zatímco dipeptidů, volných aminokyselin, volných nukleotidů a cukrů v čase významně ubývá, tuky většinou přetrvávají. Nasycené a mono-nenasycené mastné kyseliny se středně dlouhými a dlouhými řetězci jsou obvykle velmi dobře zachované. U řady metabolitů dochází stárnutím vzorků k významným změnám vlivem oxidace a dalšími procesy chemické degradace (Velsko a kol., 2017).

GC/MS analýza zubního kamene umožňuje doplnit celou řadu informací týkajících se starověké stravy a použití léčivých rostlin. Byly identifikovány zbytky olejnatých semen, mořské zdroje potravy (ryby, mlži, řasy), živočišné produkty (vejce, maso, mléko, mléčné výrobky), brukvovité rostliny, plody růžovitých rostlin, houby, víno a čaj. Specifické markery řady léčivek (např. *Digitalis sp.*, *Hyssopus officinalis*, *Artemisia sp.*, *Ephedra sp.*) poukazují na „farmaceutickou kulturu“ raně středověké italské populace, jak plyne z výzkumů v Colonně ve střední Itálii (Gismondi a kol., 2018).

Plynová chromatografie byla rovněž použita pro určení poměru D a L-enantiomerů aminokyselin. Tento poměr umožňuje po patřičné kalibraci odhadnout věk živočišných zbytků včetně pozůstatků člověka. Ve většině živých organismů existují aminokyseliny ve formě L-enantiomeru. Tato konfigurace je však termodynamicky nestabilní a bez biologických procesů živého organismu začne probíhat racemizace, tedy postupná přeměna části L-formy v D-formu. Ta může teoreticky probíhat do dosažení stejných množství obou forem (1:1, racemická směs). Proces racemizace tedy způsobuje zvyšování obsahu D-enantiomeru v mrtvých organismech nebo v neobnovujících se a pomalu se obnovujících tkáních a poměr D/L forem je úměrný jejich stáří. Rychlost racemizace je však ovlivňována řadou faktorů a mezi nimi významně teplotou. Tento faktor je třeba při interpretaci dat zohlednit. Na druhou stranu umožňuje studium racemizace aminokyselin ve vhodných souvislostech odhadovat například rozdíly v teplotách v různých nálezích (paleotemperature). Při použití plynové chromatografie je chirálního rozlišení možno dosáhnout dvěma způsoby. První zahrnuje použití chirální stacionární fáze (např. Chirasil-Val) a zvýšení těkavosti aminokyselin běžnou (achirální) derivatizací, např. anhydridem trifluoroctové kyseliny. Druhý způsob zahrnuje derivatizaci chirálním činidlem (enantiomerem vhodné látky nesoucím v molekule chirální centrum). Při reakci vzniknou z enantiomerů aminokyselin



Obrázek 3-19 Struktura intaktních bakteriohopanoidů, markerů alkoholového kvašení šťávy z agáve (A.) a produkty jejich diagenetické (sedimentární) přeměny (B.)

diastereomery, které je možno separovat na běžných (achirálních) stacionárních fázích. Využití plynové chromatografie pro určení enantiomerního poměru u aminokyselin je popsáno například v práci Franka a kol. (1977) a v přehledovém článku Johnsona a Millera (1997). **GC/MS analýzou diastereomerů fytanové kyseliny** (přesněji 3S,7R,11R,15-fytanové kyseliny (SRR) a 3R,7R,11R,15-fytanové kyseliny (RRR)) v extraktech z archeologické keramiky se zabývá studie Lucquina a kol. (2016). Zajímavé bylo zjištění, že obsah SRR diastereomeru byl vyšší v nádobách z pobřežních nálezů v porovnání s vnitrozemními vzorky. Tyto rozdíly jsou využitelné pro odlišení produktů přežvýkavců od vodních organismů.

Byly publikovány práce o možnostech použití GC a GC/MS a jejich kombinace s dalšími metodami v širokém rozmezí látek pro „**chemické mapování**“ **starověkých osídlení**. Například práce Middletona a kol. (2010) se souhrnně zabývá mapováním profilu řady látek v archeologických podlahách.

S rozvojem a zlepšováním dostupnosti sofistikované analytické instrumentace se významně rozšiřují možnosti GC/MS techniky. Vedle spojení GC s hmotnostními spektrometry osazenými jedním nebo třemi kvadrupóly se začínají významně prosazovat i spojení s analyzátory doby letu (TOF), respektive hybridními analyzátory typu kvadrupól – detektor doby letu (Q-TOF). **Výhodou těchto analyzátorů je velké hmotnostní rozlišení a možnost určení elementárního složení pozorovaných iontů z přesného měření jejich m/z hodnoty (exact mass measurement).** Tyto platformy se způsobem měření a manipulace s daty velmi přibližují technice LC/MS. To umožňuje lepší vzájemnou integraci dat z obou platform. Velké možnosti otevírá využití necílených technik poskytujících velké množství signálů různých látek, které je možno následně zpracovat pomocí přístupů souhrnně nazývaných „data mining“. Jednoduše řečeno, tyto přístupy umožňují získání velkého množství dat bez zacílení analýzy na předem vybrané analyty. Tento postup potom umožňuje „vytěžit“ i markery (látky charakteristické pro daný materiál, biologický druh, oblast, údobí apod.), které doposud nejsou v dané souvislosti známy. S těmito postupy rostou však i nároky na počítačové vybavení a znalosti (bio)informatiky. Uvedené trendy dobře demonstruje recentní článek publikovaný v časopise Scientific Reports (Korf a kol., 2020). V této práci je rovněž přehledně uveden krok po kroku postup přípravy a zpracování dat: surová GC/MS data jsou převedena do tzv. mass listu (zahrnuje identifikační znak, ID; m/z hodnotu a intenzitu daného signálu), vytvoří se extrahované chromatogramy a z nich tabulka EIC (ID; m/z a retenční čas, rt) a provede se dekonvoluce chromatogramů. Tím je získán tzv. feature list (ID; m/z; rt). Dále se provede tzv. deizotopování (přiřazení izotopických signálů k hlavnímu izotopu; všechny izotopy téhož iontu se spojí), korekce na retenční čas interního standardu, zarovnání prvků (jednotlivých markerů) a porovnání získaných markerů s databází umožňující identifikaci markerů.

Získaný set markerů (datová matice) se potom statisticky zpracuje (zpravidla s využitím vícerozměrné statistiky). Takto je možno například třídit vzorky podle zadaného kritéria (dle historického údobí, biologického původu vzorku, geografických aspektů apod.).

Literatura

- Ahn C., Obendorf S.K., Dyes on archaeological textiles: Analyzing alizarin and its degradation products, *Text. Res. J.* 2004, 74, 949–954.
- Ahn C., Obendorf S.K., GC-MS analysis of curcumin dye after selective degradation treatment, *Fiber. Polym.* 2007, 8, 278–283.
- Arie E., Rosen B., Namdar D., Cannabis and Frankincense at the Judahite Shrine of Arad, Tel Aviv, *Journal of the Institute of Archaeology of Tel Aviv University* 2020, 47, 5–28.
- Bethell P. H., Goad L. J., Evershed R. P., Ottaway J., Study of molecular markers of human activity – the used of coprostanol in the soil as an indicator of human fecal material, *J. Archaeol. Sci.* 1994, 21, 619–632.
- Bigelow B. C., Edgar K. J., *The UXL Encyclopedia of Drugs & Addictive Substances*, Thomson-Gale, 2006 (ISBN 1-4144-0444-1).
- Birk J. J., Dippold M., Wiesenberger G. L. B., Glaser B., Combined quantification of faecal sterols, stanols, stanones and bile acids in soils and terrestrial sediments by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2012, 1242, 1–10.
- Birk J. J., Teixeira W. G., Neves E. G., Glaser B., Faeces deposition on Amazonian Anthrosols as assessed from 5[beta]-stanols, *J. Archaeol. Sci.* 1994, 21, 619–632.
- Bland H. A., van Bergen P. F., Carter J. F., Evershed R. P., Early diagenetic transformations of proteins and polysaccharides in archaeological plant remains. In: *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere*, eds. Stankiewicz B. A., van Bergen P. F., 1998, 707, 113–131.
- Bleton J., Mejanelle P., Sansoulet J., Goursaud S., Tchaplal A., Characterization of Neutral Sugars and Uronic Acids After Methanolysis and Trimethylsilylation for Recognition of Plant Gums, *J. Chromatogr. A* 1996, 720, 27–49.
- Bonaduce I., Blaensdorf C., Dietemann P., Colombini M. P., The binding media of the polychromy of Qin Shihuang's Terracotta Army, *J. Cult. Herit.* 2008, 9, 103–108.
- Bonaduce I., Brecolaki H., Colombini M.P., Lluveras A., Restivo V., Ribechini E., Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Characterisation of Plant Gums in Samples from Painted Works of Art, *J. Chromatogr. A* 2007, 1175, 275–282.
- Brecolaki H., Andreotti A., Bonaduce I., Colombini M. P., Lluveras A., Characterization of Organic Media in the Wall-Paintings of the “Palace of Nestor” at Pylos, Greece: Evidence for a Secco Painting Techniques in the Bronze Age, *J. Archaeol. Sci.* 2012, 39, 2866–2876.
- Briggs D. E., Brookes P. A., Stevens R., Boulton C. A., *Brewing: Science and Practice*. Woodhead Publishing, Cambridge 2004.

- Bull I. D., van Bergen P. F., Poulton P. R., Evershed R. P., Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments – II, Soils from the Hoosfield Spring Barley Experiment treated with different quantities of manure, *Org. Geochem.* 1998, 28, 11–26.
- Buonasea T., Investigating the presence of ancient absorbed organic residues in groundstone using GC-MS and other analytical techniques: a residue study of several prehistoric milling tools from central California, *J. Archaeol. Sci.* 2007, 34, 1379–1390.
- Burger P., Charrie-Duhaut A., Connan J., Flecker M., Albrecht P., Archaeological resinous samples from Asian wrecks: Taxonomic characterization by GC-MS, *Anal. Chim. Acta* 2009, 648, 85–97.
- Burger P., Charrie-Duhaut A., Connan J., Albrecht P., Taxonomic characterisation of fresh Dipterocarpaceae resins by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): providing clues for identification of unknown archaeological resins, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2011, 3, 185–200.
- Casanova E., Knowles T. D. J., Bayliss A., Dunne J., Baranski M. Z., Denaire A., Lefranc P., di Lernia S., Roffet-Salque M., Smyth J., Barclay A., Gillard T., Classen E., Coles B., Ilett M., Jeunesse C., Krueger M., Marciniak A., Minnitt S., Rotunno R., van de Velde P., van Wijk I., Cotton J., Daykin A., Evershed R. P., Accurate compound-specific C-14 dating of archaeological pottery vessels, *Nature* 2020, 580, 506–510.
- Cappellini E., Gilbert M. T. P., Geuna F., Fiorentino G., Hall A., Thomas-Oates J., Ashton P. D., Ashford D. A., Arthur P., Campos P. F., Kool J., Willerslev E., Collins M. J., A multidisciplinary study of archaeological grape seeds, *Naturwissenschaften* 2010, 97, 205–217.
- Colombini M. P., Lucejko J. J., Modugno F., Orlandi M., Tolppa E. L., Zoia L., A multi-analytical study of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood, *Talanta* 2009, 80, 61–70.
- Colombini M. P., Giachi G., Modugno F., Pallecchi P., Ribechini E., The characterization of paints and waterproofing materials from the shipwrecks found at the archaeological site of the Etruscan and Roman harbour of Pisa (Italy), *Archaeometry* 2003, 45, 659–674.
- Colombini M. P., Modugno F., Menicagli E., Fuoco R., Giacomelli A., GC-MS characterization of proteinaceous and lipid binders in UV aged polychrome artefacts, *Microchem. J.* 2000, 67, 291–300.
- Colombini M. P., Modugno F., Ribechini E., Organic mass spectrometry in archaeology: evidence for Brassicaceae seed oil in Egyptian ceramic lamps, *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 890–898.
- Colombini M. P., Modugno F., Silvano F., Onor M., Characterization of the balm of an Egyptian mummy from the 7th century B.C., *Stud. Conserv.* 2000, 45, 19–29.
- Colonese A. C., Hendy J., Lucquin A., Speller C. F., Collins M. J., Carrer F., Gubler R., Kuhn M., Fischer R., Craig O. E., New criteria for the molecular identification of cereal grains associated with archaeological artefacts, *Sci. Rep.* 2017, 7, 6633.
- Connan J., Nissenbaum A., Conifer tar on the keel and hull planking of the Ma'agan Mikhael Ship (Israel, 5th century BC): identification and comparison with natural products and artefacts employed in boat construction, *J. Archaeol. Sci.* 2003, 30, 709–719.
- Connan J., Nissenbaum A., Dessort D., Molecular Archaeology – Export of Dead-Sea Asphalt to Canaan and Egypt in the Chalcolithic – Early Bronze-Age (4th–3rd Millenium BC), *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 1992, 56, 2743–2759.
- Copley M. S., Berstan R., Dudd S. N., Docherty G., Mukherjee A. J., Straker V., Payne S., Evershed R. P., Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 1524–1529.

- Copley M. S., Bland H. A., Rose P., Horton M., Evershed R. P., Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopic investigations of organic residues of plant oils and animal fats employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt, *Analyst* 2005, 130, 860–871.
- Copley M. S., Jim S., Jones V., Rose P., Clapham A., Edwards D. N., Horton M., Rowley-Conwy P., Short- and long-term foraging and foddering strategies of domesticated animals from Qasr Ibrim, Egypt, *J. Archaeol. Sci.* 2004, 31, 1273–1286.
- Copley M. S., Rose P. J., Clapham A., Edwards D. N., Horton M. C., Evershed R. P., Detection of palm fruit lipids in archaeological pottery from Qasr Ibrim, Egyptian Nubia, *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 2001, 268, 593–597.
- Corr L. T., Sealy J. C., Horton M. C., Evershed R. P., A novel marine dietary indicator utilising compound-specific bone collagen amino acid delta C-13 values of ancient humans, *J. Archaeol. Sci.* 2005, 32, 321–330.
- Correa-Ascencio M., Robertson I. G., Cabrera-Cortes O., Cabrera-Castro R., Evershed R. P., Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014, 111, 14223–14228.
- Domenech-Carbo M. T., Novel analytical methods for characterising binding media and protective coatings in artworks, *Anal. Chim. Acta* 2008, 621, 109–139.
- Domenech-Carbo M. T., Osete-Cortina L., Domenech-Carbo A., de Agredos-Pascual M. L. V., Vidal-Lorenzo C., Identification of indigoid compounds present in archaeological Maya blue by pyrolysis-silylation-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2014, 105, 355–362.
- Drakaki E., Kandyla M., Chatzitheodoridis E., Zergioti I., Serafetinides A. A., Terfixi A., Kouloumpi E., Moutsatsou A. P., Doulgerides M., Kantarelou V., Karydas A., Vlachou-Mogire C., Laser studies of metallic artworks, *Appl. Phys. A-Mater. Sci. Process.* 2010, 101, 349–355.
- Dudd S. N., Evershed R. P., Direct demonstration of milk as an element of archaeological economies, *Science* 1998, 282, 1478–1481.
- Dudd S. N., Evershed R. P., Gibson A. M., Evidence for varying patterns of exploitation of animal products in different prehistoric pottery traditions based on lipids preserved in surface and absorbed residues, *J. Archaeol. Sci.* 1999, 26, 1473–1482.
- El-Seedi H. R., De Smet P., Beck O., Possnert G., Bruhn J. G., Prehistoric peyote use: Alkaloid analysis and radiocarbon dating of archaeological specimens of Lophophora from Texas, *J. Ethnopharmacol.* 2005, 101, 238–242.
- Evershed R. P., Organic residue analysis in archaeology: The Archaeological biomarker revolution, *Archaeometry* 2008, 50, 895–924.
- Evershed R. P., Berstan R., Dudd S. N., Copley M. S., Morgan E. D., Quyeq A., Evershed R. P., Characterisation of 'bog butter' using a combination of molecular and isotopic techniques, *Analyst* 2004, 129, 270–275.
- Evershed R. P., Bethell P. H., Reynolds P. J., Walsh N. J., 5 beta-Stigmastanol and related 5 beta-stanols as biomarkers of manuring: Analysis of modern experimental material and assessment of the archaeological potential, *J. Archaeol. Sci.* 1997, 24, 485–495.
- Evershed R. P., Dudd S. N., Copley M. S., Berstan R., Stott A. W., Mottram H., Buckley S. A., Crossman Z., Chemistry of archaeological animal fats, *Accounts Chem. Res.* 2002, 35, 660–668.
- Evershed R. P., Heron C., Goad L. J., Analysis of Organic Residues of Archaeological Origin by High-temperature Gas Chromatography and Gas Chromatography Mass Spectrometry, *Analyst* 1990, 115, 1339–1342.

- Evershed R. P., Mottram H. R., Dudd S. N., Charters S., Stott A. W., Lawrence G. J., Gibson A. M., Conner A., Blinkhorn P. W., Reeves V., New criteria for the identification of animal fats preserved in archaeological pottery, *Naturwissenschaften* 1997, 84, 402–406.
- Evershed R. P., Stott A. W., Raven A., Dudd S. N., Charters S., Leyden A., Formation of long-chain ketones in ancient-pottery vessels by pyrolysis of acyl lipids, *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 8875–8878.
- Fabbri D., Chiavari G., Analytical pyrolysis of carbohydrates in the presence of hexamethyldisilazane, *Anal. Chim. Acta* 2001, 449, 271–280.
- Fezzey S., Armitage R. A., Pyrolysis GC-MS and THM-GC-MS studies of a black coating from Little Lost River Cave, Idaho, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2006, 77, 102–110.
- Frank H., Nicholson G. J., Bayer E., Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase, *J. Chrom. Sci.* 1977, 15, 174–176.
- Fu Y. C., Chen Z. F., Zhou S. H., Wei S. Y., Comparative study of the materials and lacquering techniques of the lacquer objects from Warring States Period China, *J. Archaeol. Sci.* 2020, 114, 105060.
- Garnier N., Cren-Olive C., Rolando C., Regert, M., Characterization of archaeological beeswax by electron ionization and electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 2002, 74, 4868–4877.
- Garnier N., Richardin P., Cheynier V., Regert M., Characterization of thermally assisted hydrolysis and methylation products of polyphenols from modern and archaeological vinederivatives using gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 2003, 493, 137–157.
- Garnier N., Valamoti S. M., Prehistoric wine-making at Dikili Tash (Northern Greece): Integrating residue analysis and archaeobotany, *J. Archaeol. Sci.* 2016, 74, 195–206.
- Gerbault P., Roffet-Salque M., Evershed R. P., Thomas M. G., How Long Have Adult Humans Been Consuming Milk?, *IUBMB Life* 2013, 65, 983–990.
- Giachi G., Bettazzi F., Chimichi S., Chemical characterisation of degraded wood in ships discovered in a recent excavation of the Etruscan and Roman harbour of Pisa, *J. Cult. Herit.* 2003, 4, 75–83.
- Gismondi A., D'Agostino A., Canuti L., Di Marco G., Martinez-Labarga C., Angle M., Rickards O., Canini A., Dental calculus reveals diet habits and medicinal plant use in the Early Medieval Italian population of Colonna, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018, 20, 556–564.
- Glastrup J., Shashoua Y., Egsgaard H., Mortensen M. N., Formic and acetic acids in archaeological wood. A comparison between the Vasa Warship, the Bremen Cog, the Oberlander Boat and the Danish Viking Ships, *Holzforschung* 2006, 60, 259–264.
- Guasch-Ferré N., Prada Pérez J. L., Vázquez de Agredos Pascual M. L., Osete-Cortina L., Doménech-Carbó M. T., Polysaccharide remains in Maya mural paintings: is it an evidence of the use of plant gums as binding medium of pigments and additive in the mortar?, *STAR: Science & Technology of Archaeological Research* (2020) (eISSN 2054-8923, Online).
- Guerra-Doce E., The Origins of Inebriation: Archaeological Evidence of the Consumption of Fermented Beverages and Drugs in Prehistoric Eurasia, *J. Archaeol. Method Theory* 2015, 22, 751–782.
- Hamm S., Bleton J., Tchaplá A., Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 235–243.
- Han B., Daheur G., Sablier M., Py-GC/MS in cultural heritage studies: An illustration through analytical characterization of traditional East Asian handmade papers, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2016, 122, 458–467.
- Havelcova M., Machovic V., Linhartova M., Lapcak L., Prichystal A., Dvorak Z., Vibrational spectroscopy

- with chromatographic methods in molecular analyses of Moravian amber samples (Czech Republic), *Microchem. J.* 2016, 128, 153–160.
- Hayek E. W. H., Krenmayr P., Lohninger H., Jordis U., Moche W., Sauter F., Identification of Archaeological and Recent Wood Tar Pitches Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Pattern Recognition, *Anal. Chem.* 1990, 62, 2038–2043.
- Hayek E. W. H., Krenmayr P., Lohninger H., Jordis U., Sauter F., Moche W., GC/MS and chemometrics in archaeometry, Investigation of glue on copper-age arrowheads, *Fresenius J. Anal. Chem.* 1991, 340, 153–156.
- Helwig K., Monahan V., Poulin J., Andrews T. D., Ancient projectile weapons from ice patches in northwestern Canada: identification of resin and compound resin-ochre hafting adhesives, *J. Archaeol. Sci.* 2014, 41, 655–665.
- Heron C., Nilsen G., Stern B., Craig O., Nordby C., Application of lipid biomarker analysis to evaluate the function of 'slab-lined pits' in Arctic Norway, *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 2188–2197.
- Hjulstrom B., Isaksson S., Identification of activity area signatures in a reconstructed Iron Age house by combining element and lipid analyses of sediments, *J. Archaeol. Sci.* 2009, 36, 174–183.
- Hocart C. H., Fankhauser B., Betel nut residues in archaeological samples of human teeth from the Mariana Islands, *Experientia* 1996, 52, 281–285.
- Hocart C. H., Fankhauser B., Buckle D. W., Chemical Archaeology of Kava, a Potent Brew, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7, 219–224.
- Charters S., Evershed R. P., Quye A., Blinkhorn P. W., Reeves V., Simulation experiments for determining the use of ancient pottery vessels: The behaviour of epicuticular leaf wax during boiling of a leafy vegetable, *J. Archaeol. Sci.* 1997, 24, 1–7.
- Chiantore O., Riedo C., Scalarone D., Gas Chromatography–Mass Spectrometric Analysis of Products from on-Line Pyrolysis/Silylation of Plant Gums Used as Binding Media, *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 284, 35–41.
- Chiavari G., Ferretti S., Galletti G. C., Mazzeo R., Analytical Pyrolysis as a Tool for the Characterization of Organic-Substances in Artistic and Archaeological Objects, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 1991, 20, 253–261.
- Chiavari G., Mazzeo R., Characterisation of paint layers in Chinese archaeological relics by pyrolysis-GC-MS, *Chromatographia* 1999, 49, 268–272.
- Isaksson S., Karlsson C., Eriksson T., Ergosterol (5, 7, 22-ergostatrien-3 beta-ol) as a potential biomarker for alcohol fermentation in lipid residues from prehistoric pottery, *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 3263–3268.
- Johnson B. J., Miller G. H., Review Article, Archaeological Applications of Amino Acid Racemization, *Archaeometry* 1997, 39, 265–287.
- Jones J., Higham T., Oldfield R., O'Connor T., Buckley S. A., Evidence for prehistoric origins of Egyptian mummification in late Neolithic burials, *PLoS One* 2014, 9, 1–14.
- Kandiah M., Urban P. L., Advances in ultrasensitive mass spectrometry of organic Molecules, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 5299–5322.
- Kasprzak L., Fabbri D., Rombola A. G., Rovetta T., Malagodi M., Identification of organic materials in historical stringed instruments by offline analytical pyrolysis solid-phase microextraction with on-fiber silylation and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 2020, 145, 104727.
- Kimpe K., Jacobs P. A., Waelkens M., Mass spectrometric methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots, *J. Chromatogr. A* 2002, 968, 151–160.

- Korf A., Hammann S., Schmid R., Froning M., Hayen H., Cramp L. J. E., Digging deeper – A new data mining workflow for improved processing and interpretation of high resolution GC-Q-TOF MS data in archaeological research, *Sci. Rep.* 2020, 10, 767.
- Kučera L., Peška J., Fojtík P., Barták P., Kučerová P., Pavelka J., Komárková V., Beneš J., Polcerová L., Králík M., Bednář P., First direct evidence of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) in Central Europe, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2019, 11, 4221–4227.
- Lattuati-Derieux A., Regert M., Volatile organic compounds emitted by materials related to cultural heritage, *Actual Chim.* 2008a, 318, 46–51.
- Lattuati-Derieux A., Thao S., Langlois J., Regert M., First results on headspace-solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry of volatile organic compounds emitted by wax objects in museums, *J. Chromatogr. A* 2008b, 1187, 239–249.
- Lucejko J. J., La Nasa J., Porta F., Vanzetti A., Tanda G., Mangiaracina C. F., Corretti A., Colombini M. P., Ribechini E., Long-lasting ergot lipids as new biomarkers for assessing the presence of cereals and cereal products in archaeological vessels, *Sci. Rep.* 2018, 8, 3935.
- Lucquin A., Colonese A. C., Farrell T. F. G., Craig O. E., Utilising phytanic acid diastereomers for the characterisation of archaeological lipid residues in pottery samples, *Tetrahedron Lett.* 2016, 57, 703–707.
- Malik R., Does Archaeology Stink? Detecting Smell in the Past Using Headspace Sampling Techniques, *Int. J. Histor. Archaeol.* 2021, 25, 273–296.
- Mathe C., Culioli G., Archier P., Vieillescazes C., Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2004, 1023, 277–285.
- Mattonai M., Watanabe A., Shiono A., Ribechini E., Degradation of wood by UV light: A study by EGA-MS and Py-GC/MS with on line irradiation system, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2019, 139, 224–232.
- McCobb L. M. E., Briggs D. E. G., Evershed R. P., Hall A. R., Hall R. A., Preservation of fossil seeds from a 10th century AD cess pit at Coppergate, York, *J. Archaeol. Sci.* 2001, 28, 929–940.
- Meier-Augenstein W., Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1999, 842, 351–371.
- Middleton W. D., Barba L., Pecci A., Burton J. H., Ortiz A., Salvini L., Suarez R. R., The Study of Archaeological Floors: Methodological Proposal for the Analysis of Anthropogenic Residues by Spot Tests, ICP-OES, and GC-MS, *J. Archaeol. Method Theory* 2010, 17, 183–208.
- Mirabaud S., Rolando C., Regert M., Molecular criteria for discriminating adipose fat and milk from different species by NanoESI MS and MS/MS of their triacylglycerols: Application to archaeological remains, *Anal. Chem.* 2007, 79, 6182–6192.
- Mottram H. R., Dudd S. N., Lawrence G. J., Stott A. W., Evershed R. P., New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery, *J. Chromatogr. A* 1999, 833, 209–221.
- Mukherjee A. J., Berstan R., Copley M. S., Gibson A. M., Evershed R. P., Compound-specific stable carbon isotopic detection of pig product processing in British Late Neolithic pottery, *Antiquity* 2007, 81, 743–754.
- Namdar D., Gilboa A., Neumann R., Finkelstein I., Weiner S., Cinnamaldehyde in Early Iron Age Phoenicians Flasks Raises the Possibility of Levantine Trade with South East Asia, *Mediterr. Archaeol. Archaeom.* 2013, 13, 1–19.
- Ogalde J. P., Arriaza B. T., Soto E. C., Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair

- by gas chromatography/mass spectrometry, *J. Archaeol. Sci.* 2009, 36, 467–472.
- Oliveira C., Araujo A., Ribeiro A., Delerue-Matos C., Chromatographic analysis of honey ceramic artefacts, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2019, 11, 959–971.
- Oudemans T. F. M., Boon J. J., Molecular Archaeology – Analysis of Charred (Food) Remains from Pregistoric Potter by Pyrolysis – Gas Chromatography – Mass Spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 1991, 20, 197–227.
- Park J., Yun E., Kang H., Ahn J., Kim G., IR and py/GC/MS examination of amber relics excavated from 6th century royal tomb in Korean Peninsula, *Spectrochim. Acta A* 2016, 165, 114–119.
- Pecci A., Almost ten years of plasters residue analysis in Italy: activity areas and the function of structures, *Period. Mineral.* 2013, 82, 393–410.
- Pecci A., Giorgi G., Salvini L., Ontiveros M. A. C., Identifying wine markers in ceramics and plasters using gas chromatography-mass spectrometry. Experimental and archaeological materials, *J. Archaeol. Sci.* 2013a, 40, 109–115.
- Pecci A., Ontiveros M. A. C., Garnier N., Identifying wine and oil production: analysis of residues from Roman and Late Antique plastered vats, *J. Archaeol. Sci.* 2013b, 40, 4491–4498.
- Perez-Arategui J., Ribechini E., Cepria G., Degano I., Colombini M. P., Paz-Peralta J., Ortiz-Palomar E., Colorants and oils in Roman make-ups-an eye witness account, *Trac-Trends Anal. Chem.* 2009, 28, 1019–1028.
- Perrault K. A., Stefanuto P. H., Dubois L., Cnuts D., Rots V., Focant J. F., A New Approach for the Characterization of Organic Residues from Stone Tools Using GCxGC-TOFMS, *Separations* 2016, 3, 16.
- Perruchini E., Glatz C., Hald M. M., Casana J., Tonney J. L., Revealing invisible brews: A new approach to the chemical identification of ancient beer, *J. Archaeol. Sci.* 2018, 100, 176–190.
- Pitthard V., Finch P., GC-MS Analysis of Monosaccharide Mixtures as Their Diethylthioacetal Derivatives: Application to Plant Gums Used in Art Works, *Chromatographia* 2001, 53, S317–S321.
- Poinar H. N., Stankiewicz B. A., Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 8426–8431.
- Poulin J., Helwig K., The characterisation of amber from deposit sites in western and northern Canada, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2016, 7, 155–168.
- Prost K., Birk J. J., Lehndorff E., Gerlach R., Amelung W., Steroid Biomarkers Revisited – Improved Source Identification of Faecal Remains in Archaeological Soil Material, *PLoS One* 2017, 12, e0164882.
- Punyu V. R., Harji R. R., Bhosle N. B., Sawant S. S., Venkat K., n-Alkanes in surficial sediments of Visakhapatnam harbour, east coast of India, *J. Earth Syst. Sci.* 2013, 122, 467–477.
- Puchinger L., Sauter F., Leder S., Varmuza K., Studies in organic archaeometry VII – Differentiation of wood and bark pitches by pyrolysis capillary gas chromatography (PY-CGC), *Ann. Chim.* 2007, 97, 513–525.
- Rafferty S. M., Identification of nicotine by gas chromatography/mass spectroscopy analysis of smoking pipe residue, *J. Archeol. Sci.* 2002, 29, 897–907.
- Reber E. A., Kerr M. T., The persistence of caffeine in experimentally produced black drink residues, *J. Archaeol. Sci.* 2012, 39, 2312–2319.
- Regert M., Investigating the history of prehistoric glues by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 244–254.
- Regert A., Alexandre V., Thomas N., Lattuati-Derieux A., Molecular characterisation of birch bark tar by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry: A new way for identifying archaeological glues, *J. Chromatogr. A* 1101, 2006, 245–253.

- Regert M., Colinart S., Degrand L., Decavallas O., Chemical alteration and use of beeswax through time: Accelerated ageing tests and analysis of archaeological samples from various environmental contexts, *Archaeometry* 2001, 43, 549–569.
- Ribechini E., Mangani F., Colombini M. P., Chemical investigation of barks from broad-leaved tree species using EGA-MS and GC/MS, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2015, 114, 235–242.
- Ribechini E., Modugno F., Perez-Arantegui J., Colombini M. P., Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials, *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 401, 1727–1738.
- Riedo C., Scalapone D., Chiantore O., Multivariate analysis of pyrolysis-GC/MS data for identification of polysaccharide binding media, *Anal. Methods*. 2013, 5, 4060–4067.
- Rosiak A., Kaluzna-Czaplinska J., Gatarek P., Analytical Interpretation of Organic Residues From Ceramics As a Source of Knowledge About Our Ancestors, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2020, 50, 189–195.
- Shedrinsky A. M., Stone R. E., Baer N. S., Pyrolysis – Gas Chromatographic Studies on Egyptian Archaeological Specimens – Organic Patinas on the 3 Princesses Gold Vessels, *J. Anal. Appl. Pyrol.* 1991, 20, 229–238.
- Schablitsky J., Genetic archaeology: The recovery and interpretation of nuclear DNA from a nineteenth-century hypodermic syringe, *Hist. Archaeol.* 2006, 40, 8–19.
- Schellekens J., Barbera G. G., Buurman P., Potential vegetation markers – analytical pyrolysis of modern plant species representative of Neolithic SE Spain, *J. Archaeol. Sci.* 2013, 40, 365–379.
- Smith R. K., Stacey R. J., Bergstrom E., Thomas-Oates J., Detection of opium alkaloids in a Cypriot base-ring juglet, *Analyst* 2018, 143, 5127–5136.
- Spangenberg J. E., Ferrer M., Tschudin P., Volken M., Hafner A., Microstructural, chemical and isotopic evidence for the origin of late neolithic leather recovered from an ice field in the Swiss Alps, *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 1851–1865.
- Staccioli, G. Garnier N., Richardin P., Cheynier V., Regert M., Characterization of thermally assisted hydrolysis and methylation products of polyphenols from modern and archaeological vine derivatives using gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 2003, 493, 137–157.
- Stern B., Heron C., Serpico M., Bourriau J., A comparison of methods for establishing fatty acid concentration gradients across potsherds: A case study using Late Bronze Age Canaanite amphorae, *Archaeometry* 2000, 42, 399–414.
- Stott A. W., Berstan R., Evershed R. P., Direct dating of archaeological pottery by compound-specific C-14 analysis of preserved lipids, *Anal. Chem.* 2003, 75, 5037–5045.
- Stott A. W., Evershed R. P., delta C-13 analysis of cholesterol preserved in archaeological bones and teeth, *Anal. Chem.* 1996, 68, 4402–4408.
- Styring A. K., Sealy J. C., Evershed R. P., Resolving the bulk delta N-15 values of ancient human and animal bone collagen via compound-specific nitrogen isotope analysis of constituent amino acids, *Geochim. Cosmochim. Acta* 2010, 74, 241–251.
- Sun N. Y., Wang R. F., Han B., Rao H. Y., Yang M., Yang Y. M., Nondestructive identification of a jet bead from the Changle Cemetery in Ningxia, China, *Microchem. J.* 2020, 157, 104907.
- van Bergen P. F., Poole I., Ogilvie T. M. A., Caple C., Evershed R. P., Evidence for demethylation of syringyl moieties in archaeological wood using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 71–79.

- Vane C. H., Martin S. C., Snape C. E., Abbott G. D., Degradation of Lignin in Wheat Straw during Growth of the Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Using Off-line Thermochemolysis with Tetramethylammonium Hydroxide and Solid-State ^{13}C NMR, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2709–2716.
- Velsko I. M., Overmyer K. A., Speller C., Klaus L., Collins M. J., Loe L., Frantz L. A. F., Sankaranarayanan K., Lewis C. M., Martinez J. B. R., Chaves E., Coon J. J., Larson G., Warinner C., The dental calculus metabolome in modern and historic samples, *Metabolomics* 2017, 13, 134.
- Virgolici M., Petroviciu I., Teodor E., Litescu S., Manea M., Ponta C., Niculescu G., Sarbu C., Medvedovici A., TD/CGC/MS and FT-IR characterization of archaeological amber artefacts from Roumanian collections (Roman age), *Rev. Roum. Chim.* 2010, 55, 349–355.
- Wendt C. J., Lu S. T., Sourcing archaeological bitumen in the Olmec region, *J. Archaeol. Sci.* 2006, 33, 89–97.
- Xie M. S., Yang Y. M., Wang B. H., Wang C. S., Interdisciplinary investigation on ancient Ephedra twigs from Gumugou Cemetery (3800b.p.) in Xinjiang region, northwest China, *Microsc. Res. Tech.* 2013, 76, 663–672.
- Zhang X. Y., Zhao L., Wang Y. X., Xu Y. P., Zhou L. P., Optimization of programmed-temperature vaporization injection preparative capillary GC for compound specific radiocarbon analysis, *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2136–2144.
- Zou S. L., Li R. C., Xie S. C., Zhu J. Y., Wang X. J., Huang J. H., Paleofire Indicated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil of Jinluojia Archaeological Site, Hubei, China, *J. Earth Sci.* 2010, 21, 247–256.

3.2.2.2 Kapalinová chromatografie (LC) a její spojení s hmotnostní spektrometrií (LC/MS)

Kapalinová chromatografie je vhodnou separační technikou pro analýzu převážně (ale nejen) organických reziduí extrahovaných či jinak odebraných z archeologických vzorků. Principem kapalinové chromatografie je separace směsi analytů, které jsou rozpouštěny v kapalně mobilní fázi a procházejí chromatografickým systémem, v němž interagují se stacionární fází. Míra této interakce (resp. rozdíl v síle interakcí) jednotlivých analytů ve směsi pak ovlivňuje míru jejich separace (rozdíl v časech, které tyto sloučeniny v systému stráví). Výhodou kapalinové chromatografie oproti plynové chromatografii je širší rozsah sloučenin, které jsme schopni separovat (máme k dispozici větší rozsah využitelných typů interakcí a není nezbytné analyty zplyňovat). Nevýhodou může být omezená rozpustnost analytů v mobilní fázi, resp. nekompatibilita některých rozpouštědel vzorků s mobilními fázemi. Nejpoužívanější variantou kapalinové chromatografie v analytickém rozměru je tzv. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. „high-performance liquid chromatography“), jejímž rysem je použití vysokého tlaku (cca do 400 bar) pohánějícího průchod mobilní fáze kolonou. Tím pádem je

možno použít jemnější částice stacionární fáze (o průměru cca 2–10 μm) a zvýšit tak účinnost separace. Dalším krokem v tomto směru je pak tzv. ultraúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC – ultra high-performance liquid chromatography), využívající tlaky cca do 1000 bar a umožňující použití kolon s částicemi o průměru menším než 2 μm (tzv. „sub 2 μm particle“ kolony).

V současnosti nejpoužívanějším separačním systémem je tzv. **systém reverzních (nebo „obrácených“) fází (RP-HPLC)**. Ten využívá nepolární stacionární fázi (typicky tzv. C8 nebo C18 – označuje, že povrch stacionární fáze je modifikován uhlovodíkovými řetězci o délce 8, resp. 18 uhlíků) a polární mobilní fázi (ta je zpravidla tvořena směsí vody a polárního organického rozpouštědla, jako je methanol nebo acetonitril). Kapalinová chromatografie používá rovněž jiné typy detektorů než chromatografie plynová. **Nejčastěji používanými jsou UV/Vis detektory**, v moderních přístrojích koncipované pro současný sběr širších rozsahů vlnových délek (detektory s diodovým polem, PDA, z angl. „photo-diode array“, resp. DAD, z angl. „diode-array detector“). V závislosti na použité vlnové délce je možné cíleně detekovat pouze barevné sloučeniny (např. při analýze reziduí barviv a pigmentů) a sloučeniny absorbující záření v ultrafialové oblasti spektra (např. sloučeniny s aromatickou strukturou). Ostatní typy detektorů (kromě hmotnostního spektrometru) se v níže uvedených článcích objevují jen sporadicky a budou popsány u těchto konkrétních případů. Lze říci, že hmotnostní spektrometr je vzhledem ke svým identifikačním schopnostem a vysoké selektivitě stále významnější detektor. Toto je společné moderní plynové i kapalinové chromatografii. Z hlediska typů materiálů a analytů, jež jsou v nich typicky vyhledávány, se v oblasti využití kapalinové chromatografie v archeologickém výzkumu setkáváme nejčastěji s těmito: textil (především analýzy barviv a použitých materiálů – rostlinné/živočišné vlákno), keramika (především obsahy nádob, popř. jejich fragmentů – typicky obsahující zbytky jídla, ale i jiných materiálů, zejména kapalin, které v nich byly skladovány), dřevo (zejména analýzy zkoumající míru poškození/rozkladu dřevěných artefaktů s ohledem na místo jejich nálezu, skladování, popř. i účinky použitých konzervačních látek), dále artefakty s možným obřadním významem (sošky a nástroje, identifikace složek rituálního významu, např. jantar nebo vonné pryskyřice), předměty denní potřeby (většinou spojeny s konzumací jídla či jiných poživatin, popř. ty, které byly používány např. k lovu), pozůstatky lidské i zvířecí (zejména kosti a zuby; identifikace biologického druhu, pohlaví, stáří jedince, typu jeho stravy, případně jeho nemoci a úrazů), půda (sledování projevů lidské činnosti), stavební materiál (zjišťování technologických postupů a materiálů, analýza barviv a poživ, analýza restauračních technik). Experimentální podmínky (separace i detekce) jsou přizpůsobeny chemickým vlastnostem předpokládaných/hledaných analytů.

V oblasti **analýzy barviv textilních materiálů** je primární technikou spojení HPLC a UV/Vis detekce. Celý proces analýzy většinou spočívá v extrakci textilu kapalinou (často za zvýšené teploty). Volba konkrétních podmínek je vázána na chemickou povahu cílových analytů. Nejčastěji se používá okyselená směs vody a methanolu v různých poměrech (Biesaga a kol., 2006; Ahn a kol., 2012), případně jiná rozpouštědla či jejich směsi, např. dimethylsulfoxid (DMSO, zejména pro barviva indigoidní struktury) v pracích Karapanagiotise a kol. (2008), Clementi a kol. (2016), nebo pyridin (Mouri a kol., 2014). Extrakce v kyselých podmínkách může způsobovat/urychlovat deglykosylaci (odštěpení cukerných jednotek) některých druhů glykosylovaných barviv. Rizikem je v tomto případě snížení (nebo úplná ztráta) signálu těchto glykosylovaných sloučenin; naopak s výhodou je možno tento přístup využít v případě, že chceme detekovat/stanovit sumu všech derivátů se stejnou základní strukturou a různým stupněm a typem glykosylace.

Po extrakci analytů následuje analýza získaných roztoků pomocí **HPLC s gradientovou elucí** s použitím kolony typu C8 (Degano a kol., 2011) či obvykleji C18, tedy v **systému reverzních fází**. Průzkum literatury ukazuje, že variabilita použitelných mobilních fází je poměrně vysoká. Typicky jsou používány binární a ternární směsi obsahující acetonitril, methanol a vodu. Často jsou mobilní fáze okyselovány kyselinami mravenčí, trifluoroctovou (TFA) nebo méně často methansulfonovou (Koren, 1995; Surowiec a kol., 2004; Biesaga a kol., 2006; Karapanagiotis a kol., 2008; Vanden Berghe a kol., 2009; Degano a kol., 2009; Degano a kol., 2011; Liu a kol., 2011; Kramell a kol., 2014; Mouri a kol., 2014; Elnaggar a kol., 2017; Jemo a kol., 2017).

Při použití UV/Vis detekce je významné vhodně zvolit **optimální vlnovou délku**, která se obvykle kryje s absorpčním maximem analyzované látky. Jejich rozsah s ohledem na cílové analyty ukazuje **tabulka 3-4**. Kromě toho, že výběrem měřené vlnové délky lze ovlivnit selektivitu metody vůči konkrétním skupinám analytů, je možné využít také poměry absorbancí při různých vlnových délkách pro zjištění poměru sloučenin v rámci jedné analýzy. Z těchto poměrů lze následně zjistit např. pravděpodobné místo původu barviva (Niemeyer a kol., 2015). V oblasti metodického výzkumu analýzy barviv pomocí HPLC-UV/Vis vyčnívá rozsahem optimalizovaných parametrů práce Nowika a kol. testující separaci indigoidních barviv na sedmi různých kolonách typu C18 (lišících se hustotou vázaných řetězců) a různým složením mobilní fáze. Na základě provedených experimentů byly vybrány optimální podmínky, které zajistily snížení výšky teoretického patra (parametr vyjadřující účinnost separace) a vylepšení tvaru píků. Rovněž byla zjištěna závislost výtěžnosti extrakce jednotlivých typů barviv (isatiny, indigotiny) na teplotě (Nowik a kol., 2011).

Tabulka 3-4 Používané detekční vlnové délky pro sledované analyty

Použitá vlnová délka [nm]	Analyty	Citace
254	alizarin, purpurin, pseudopurpurin	(Maier a kol., 2010; Jemo a kol., 2017)
275	alizarin, apigenin, brazilin, emodin, fisetin, hematoxylin, indigotin, kaempferol, karthamin, kvercetin, kyselina ellagová, kyselina gallová, k. karmínová, k. lakkaová, luteolin, morin, purpurin, rhamnetin	(Degano a kol., 2009)
275	berberin, palmatin	(Ahn a kol., 2012)
288	indigotiny, indirubiny	(Karapanagiotis a kol., 2013)
308	isatiny	(Clementi a kol., 2016)
350	luteolin, kvercetin, rutin	(Zhang a kol., 2005)
410	kyselina karmínová, k. kermesová a k. flavokermesová, alizarin, purpurin, rubiadin	(Mantzouris a kol., 2015)
430	alizarin	(Niemayer a kol., 2015)
450	alizarin	(Zhang a kol., 2005)
490	kyselina karmínová	(Zhang a kol., 2005)
540	indirubin	(Niemayer a kol., 2015)
548	indirubiny	(Clementi a kol., 2016)
600	indigotin	(Niemayer a kol., 2015)
608	indigotiny	(Clementi a kol., 2016)

Mezi **přírodními barvivy** je v historických souvislostech velmi významný týrský purpur. Toto barvivo je z chemického hlediska směsí několika sloučenin na bázi bromovaných derivátů indigotinu a indirubinu. Tradičně se získávalo extrakcí z mlžů čeledi ostrankovitých (zejména pak z ostranky purpurové, *Murex trunculus*). Vývojem metod pro identifikaci těchto barviv je věnována řada prací – první publikovaná práce využívající HPLC srovnává strukturu těchto sloučenin v recentním vzorku mlže *Murex trunculus* a v archeologickém vzorku keramického střepu barvicí kádě z Izraele nesoucího stopy barviv (Koren, 1995). Další studie pak s využitím HPLC-DAD zkoumají např. složení extraktů z ostranek. V těchto extraktech byly identifikovány bromované deriváty, které jsou na rozdíl od běžnějších barviv indigotinu a indirubinu unikátní pro tyto živočichy (Deviese a kol., 2011). Jednotlivé druhy ostranek je možno odlišit na základě relativního obsahu 6,6'-dibromoindigotinu (Clementi a kol., 2016). Metodicky významná je práce Karapanagiotise a kol. (2013) studující efektivitu extrakce archeologických vzorků různými druhy organických rozpouštědel (dimethylformamid, dimethylsulfoxid, pyridin). Stejný tým se zabýval podrobně možnostmi průkazu těchto barviv v textilních materiálech (Karapanagiotis a kol., 2019).

Dalšími často používanými barvivy vedle modrých indigoidů jsou červené anthrachinony (např. alizarin, purpurin, kyselina karmínová a její deriváty, kyselina lakkaová, santalin) a žluté flavonoidy (apigenin, kvercetin, luteolin). Tyto sloučeniny byly historicky získávány z mnoha rostlinných a hmyzích zdrojů lišících se obsahy těchto sloučenin. Mezi nejpoužívanější patří např. mořena barvířská (*Rubia tinctorum*), rýt barvířský (*Reseda luteola*), boryt barvířský (*Isatis tinctoria*), či zástupce hmyzí říše – červec nopálový (*Dactylopius coccus*). Účinnost jednotlivých metod pro extrakci těchto barviv z textilu se liší. V práci věnované extrakci fisetinu, luteolinu, apigeninu, alizarinu, purpurinu, rubiadinu, sulfuretinu, kurkuminu, demethoxykurkuminu, bisdemethoxykurkuminu, indigotinu, indirubinu, kyseliny karmínové a luteolin-7-O-glukosidu byl zkoumán vliv přídavku vodných roztoků kyselin do extrakční směsi. Jako vhodné byly vyhodnoceny HCl, TFA, směs kyseliny mravenčí a ethylendiamintetraoctové, kyselina šťavelová a kyselina citronová. Složení jednotlivých extrakčních médií je vhodné dále optimalizovat s ohledem na strukturu každého analytu (Valianou a kol., 2009). Další práce uvádí, že vhodným extrakčním médiem pro extrakce flavonoidů jsou směsi methanolu a kyseliny mravenčí. Směsi methanolu a ethylacetátu se naopak ukázaly jako nevhodné. Pro extrakci indigotinu je vhodná směs methanolu a dimethylformamidu (Vanden Berghe a kol., 2009). Pomocí HPLC-DAD byly také studovány historické vzorky oděvů ze Svaté Hory (Athos, Řecko), přičemž byly identifikovány pravděpodobné rostlinné a hmyzí zdroje použitých barviv (Karapanagiotis a kol., 2008). Zajímavý je výzkum pohřebního oděvu z Peru, u nějž autoři na základě výsledků navrhuji, že byl barven neznámým druhem hmyzu, jenž nepatří mezi červce a neprodukuje košenilové typy barviv (Degano a kol., 2009). Další práce určuje pravděpodobný rostlinný zdroj barviv použitých pro obarvení liturgického oděvu nalezeného v Dubrovniku (nalezeny byly alizarin, pseudopurpurin, indigotin, indirubin, kyselina gallová a kyselina ellagová). Pravděpodobnými zdroji barviv jsou mořena barvířská, rýt barvířský a boryt barvířský (Jemo a kol., 2017). Frei a kol. vyvinuli metodu pro simultánní analýzu barviv anthragallolu, alizarinu, purpurinu, rubiadinu, xanthopurpurinu, indigotinu, indirubinu, apigeninu, chrysoeriolu a luteolinu. Tato barviva jsou získávána z rostlinných zdrojů, zejména mořeny, borytu a rýtu. Separace těchto látek bylo dosaženo na koloně LiChroSorb RP-18 gradientovou elucí s využitím tříložkové mobilní fáze methanol/voda/kyselina fosforečná. Metoda byla použita pro sledování intenzity odbarvování textilních vláken směsí roztoku peroxodisíranu amonného a kyseliny fluorovodíkové (Frei a kol., 2010). Identifikace barviv umožňuje i komplexnější závěry. Ve vraku anglické lodi potopené v 18. století na pobřeží Argentiny byly nalezeny lidské ostatky a zbytky oděvů. HPLC analýza prokázala přítomnost alizarinu a purpurinu (barviva původem z mořeny barvířské). V kombinaci s dalšími informacemi (získanými

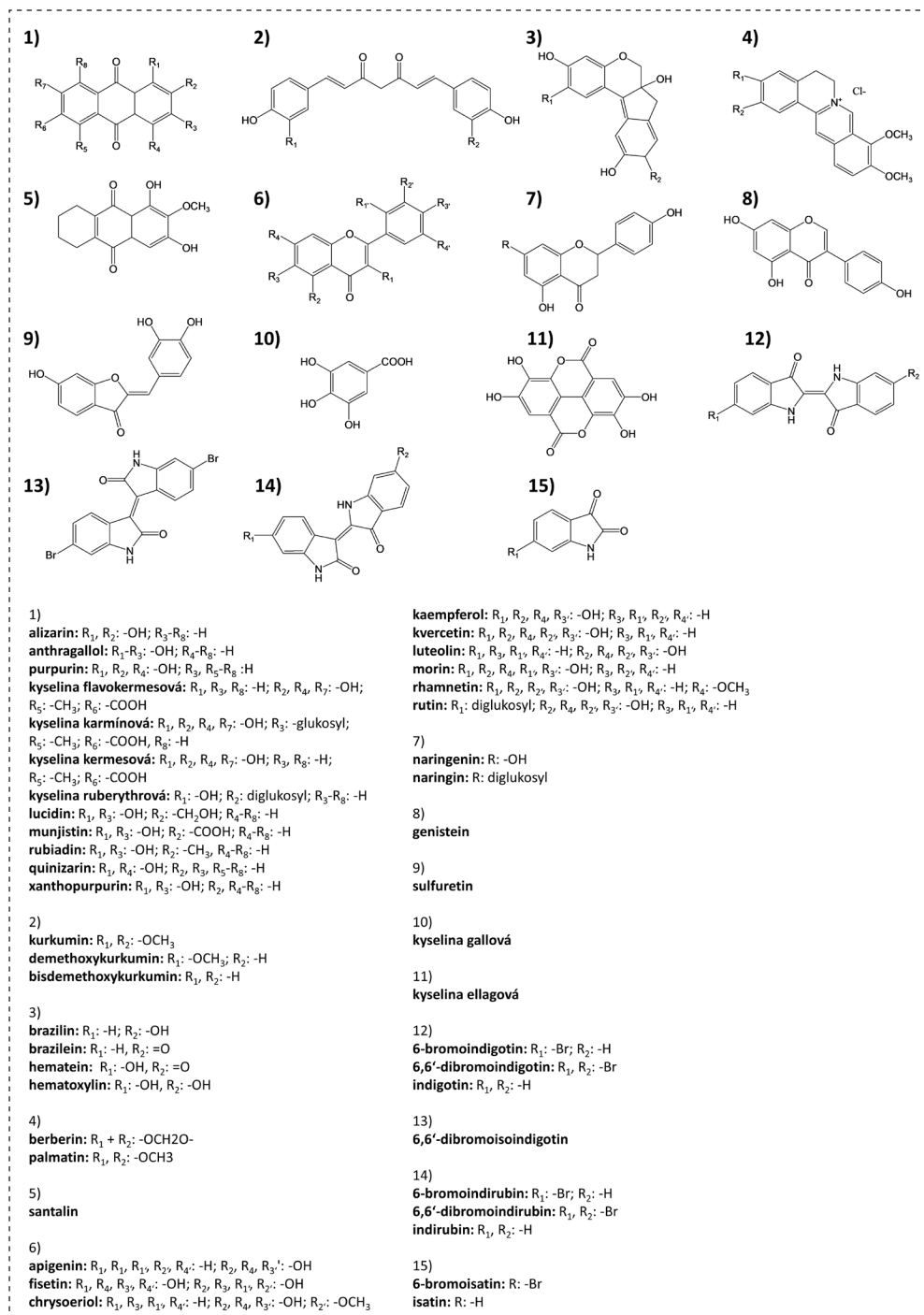
pomocí jiných technik v rámci stejné studie) bylo zjištěno, že nalezené ostatky pravděpodobně patří britskému vojínovi sloužícímu na této lodi. Jeho uniforma byla barvena mořenou barvířskou, což bylo typické právě pro britskou uniformu (Maier a kol., 2010). Výsledky analýz barviv dále mohou potvrzovat např. existenci obchodních stezek, na nichž se obchodovalo s barvivem a barvenými předměty (výskyt barviv v místech, která je ze svých zdrojů neposkytují). Takto byl zmapován pohyb žlutých barviv v Číně (Liu a kol., 2011) a červených a modrých barviv v Peru (Niemeyer a kol., 2015). Z dalších materiálů, které byly analyzovány kapalinovou chromatografií, jsou zajímavé dva historické vzorky egyptských kůží (datované do období přelomu letopočtu), v nichž byla potvrzena přítomnost taninů, konkrétně kyseliny gallové a ellagové (Elnaggar a kol., 2017), a dále barevné vrstvy z pohřebních figurín, v nichž byla potvrzena čtyři červená barviva (Mantzouris a kol., 2015). I v těchto případech byla pro analýzu využita reverzní fáze (C-18) a DAD detektor. HPLC umožňuje i analýzu zbytků barev na střepích keramických nádob. Takto byla na keramice prokázána přítomnost indigoidů (Ribechini a kol., 2013). **Obrázek 3-20** ukazuje struktury používaných barviv. HPLC-DAD umožňuje rovněž **analýzu terpenoidů a dalších nepolárních látek dokazujících přítomnost zbytků pryskyřic a vonných olejů v archeologických vzorcích**. Metoda byla použita pro separaci volných mastných kyselin v extraktech reziduí ze středomořských amfor. Na základě výsledků autoři odhadují, že některé nádoby obsahovaly olivový, jiné pak sezamový olej (Passi a kol., 1981). Pomocí RP-HPLC-DAD (s elucí vodným roztokem TFA a methanolem a detekcí při 210 nm) byly identifikovány terpenoidy z aztéckých obětních figurín. Cílem bylo zjistit konkrétní druh rodu březule (*Bursera*), jejíž pryskyřice byla využita při výrobě sošek. Kromě samotného archeologického vzorku byly analyzovány pryskyřice šesti recentních druhů rodu *Bursera* a s pomocí PCA byly dva z nich určeny jako pravděpodobné zdroje materiálu pro výrobu sošky (Lucero-Gómez a kol., 2014). Při analýze pryskyřic lze s výhodou využít možnosti fluorimetrické detekce (FLD). Ve vzorcích z těla egyptské mumie byly identifikovány vybrané triterpenoidy. Metoda zahrnovala předkolonovou derivatizaci vzorku dansylchloridem a optimalizaci excitační i emisní vlnové délky (Aksamija a kol., 2012). Stejná metoda byla použita také pro analýzu tmavé vnitřní vrstvy v amforách nalezených na pobřeží Tyrhénského moře. Analýza odhalila přítomnost retenu a monomethyletheru pinosylvinu. V kombinaci s výsledky měření pomocí GC/MS byla tato vrstva identifikována jako jehličnanová pryskyřice (Preusz a kol., 2019).

Další oblastí, kde je možné uplatnit analýzu pomocí HPLC-UV/Vis je **analýza reziduí potravin v archeologických nálezech**. Flamini a kol. (2003) analyzovali fosilní vzorky paprik druhu *Capsicum frutescens* a vzorky obětí jídla z Peru (kultura Chiribaya, 10.-15. století n. l.). Přestože ve vzorcích paprik byl nalezen

kapsaicin, což dokazuje jeho stabilitu, nebyla tato sloučenina nalezena ve vzorcích obětí, což lze interpretovat tak, že kultura Chiribaya nepoužívala papriky jako součást obětních darů. Dlouhou dobu je známo, že v archeologických materiálech je možno detekovat zbytky lipidů. Jejich profilování potom umožňuje odhadnout zdroj materiálu (rozlišení živočišných a rostlinných lipidů; případně bližší charakterizace biologického druhu). Typicky je pro tento účel používána GC/MS technika. Nicméně už poměrně starší práce Passi a kol. (1981) ukazuje, že po alkalické hydrolýze lipidických frakcí a derivatizaci uvolněných mastných kyselin pomocí p-bromfenacyl bromidu je možno HPLC s UV detekcí použít pro charakterizaci lipidických reziduí. Bromfenacyl estery mastných kyselin dobře absorbují při 254 nm, a proto metoda nabízí příznivé limity detekce. Tento přístup byl použit pro analýzu obsahů amfor ze středomořské oblasti (tři nálezy z Anatólie, Gazy a severní Afriky). **Obrázek 3-21** ukazuje chromatogramy směsi standardů mastných kyselin a extraktu z amfory nalezené v Gaze. Úprava vzorků spočívala v tříhodinové extrakci obsahu amfor v Soxhletově extraktoru směsí chloroform:methanol, 2:1 (v/v), a frakcionaci extraktu pomocí chromatografie na tenké vrstvě (na silikagelu). Jednotlivé frakce byly potom derivatizovány a analyzovány s využitím reverzní stacionární fáze (C18) a binární gradientové eluce s mobilními fázemi (A) 70 % acetonitril ve vodě okyselený kyselinou fosforečnou na pH=3.1 a (B) acetonitril. Výsledky analýz umožnily odhadnout typ oleje skladovaného v amforách (olivový a sezamový).

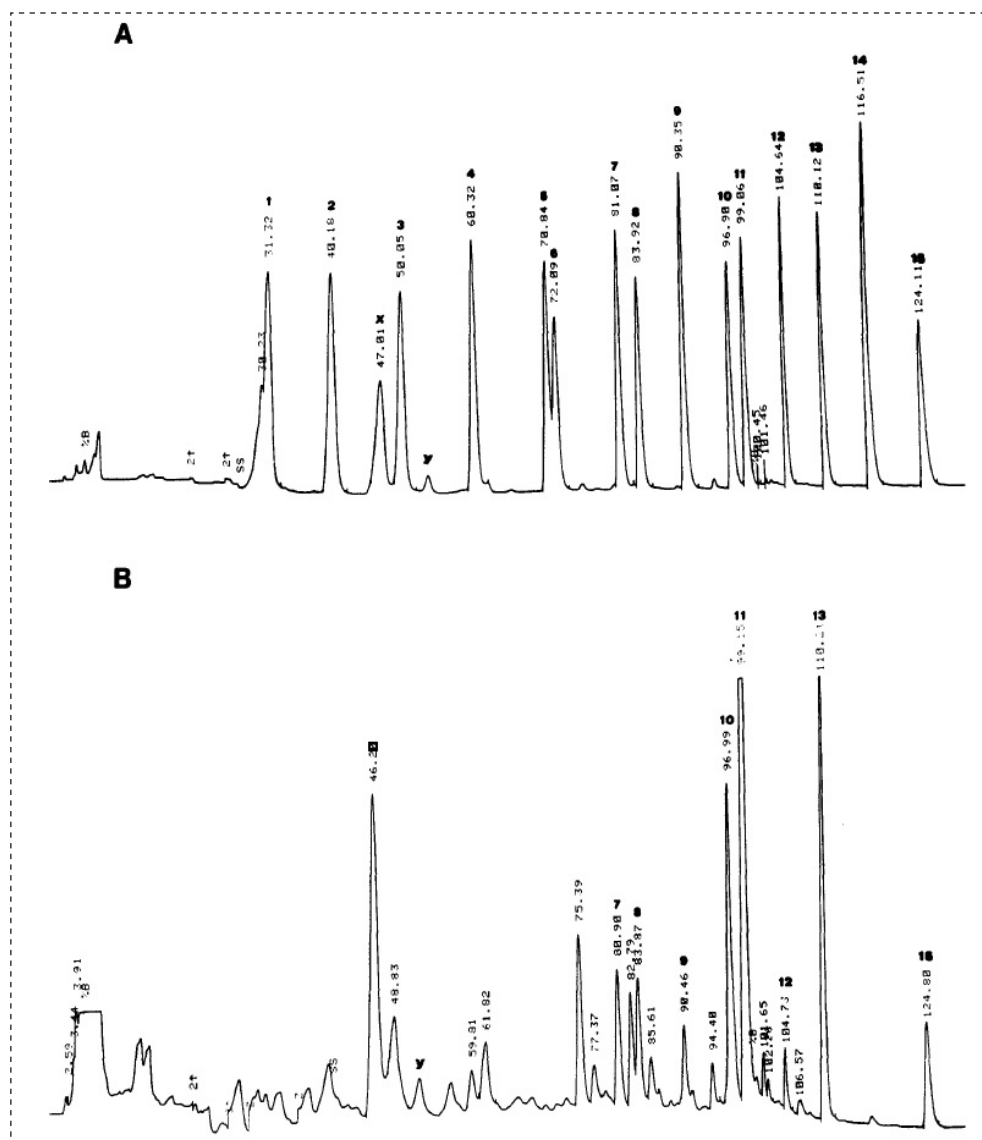
Zajímavou problematikou, kterou lze řešit pomocí kapalinové chromatografie, je **detekce přítomnosti bakterií tuberkulózy** (*Mycobacterium tuberculosis*). Metoda je založena na detekci mykologických mastných kyselin a esterů těchto kyselin – anthrylmethyl mykolátů, které jsou markery tuberkulózy. Studium těchto látek se zabývaly dva týmy. Gearney a kol. (2021) studovali lidské ostatky. Lee a kol. (2012) pracovali se vzorky bizona.

Obě studie využívají již dříve zmiňovanou kombinaci HPLC-FLD. Pro separaci byl využit jak systém normálních fází (silikagelová kolona Merck LiChrospher Si-60 a eluce směsí tetrahydrofuranu s hexanem (2:98, v/v)), tak systém reverzních fází (C18 kolona Phase Separations ODS a eluce směsí acetonitrilu a tetrahydrofuranu (1:1, v/v)). Eluce byla v obou případech izokratická. Na tyto studie navázala další práce zabývající se kostmi z Coimbry (Portugalsko) datovanými do 19.–20. století a mykocerózovými kyselinami. Předúprava vzorku pro HPLC-UV/Vis analýzu zahrnovala derivatizaci kyselin na pentafluorbenzylestery, které byly následně detekovány při vlnové délce 263 nm. Vzhledem k tomu, že se opět jedná o kyseliny s dlouhým alifatickým řetězcem, byl pro jejich separaci s výhodou využit systém normálních fází se silikagelovou kolonou a izokratickou elucí směsí heptan:ethylacetát 98:2, v/v (Redman a kol., 2009). Přítomnost solí močové ky-



Obrázek 3-20

Struktury organických barviv používaných v historii pro výtvarné účely a barvení textilu (níže v legendě je uvedena substituce pro zástupce jednotlivých druhů barviv)



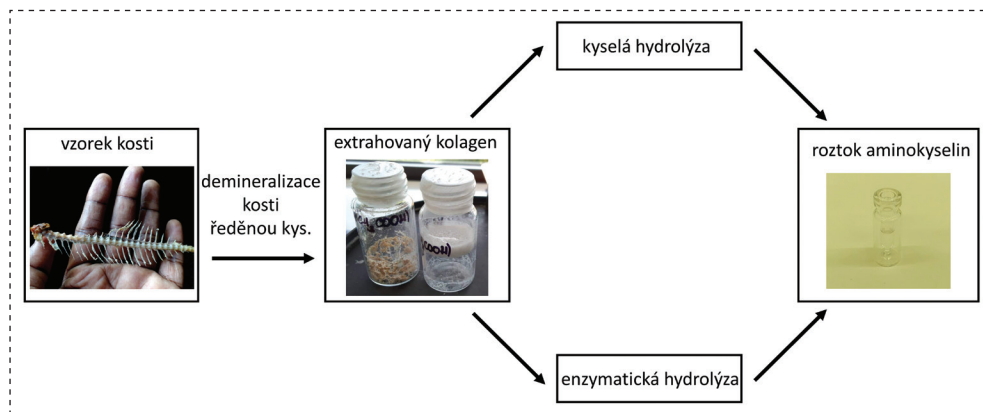
Obrázek 3-21

HPLC-UV analýza frakcí lipidického extraktu obsahu starověkých amfor (A – analýza směsi standardů mastných kyselin, B – extrakt vzorku, identifikace mastných kyselin: 1. $C_{9:0}$ 2. $C_{10:0}$ 3. $C_{11:0}$ 4. $C_{12:0}$ 5. $C_{13:0}$ 6. $C_{14:0}$ 7. $C_{15:0}$ 8. $C_{16:0}$ 9. $C_{17:0}$ 10. $C_{18:0}$ 11. $C_{19:0}$ 12. $C_{20:0}$ 13. $C_{21:0}$ 14. $C_{22:0}$ 15. $C_{23:0}$) (převzato z Passi a kol., 1981).

seliny (urátů) v tělesných ostatcích indikuje onemocnění dnou (Swinson a kol., 2010). Uráty byly úspěšně detekovány pomocí HPLC-UV/Vis a metoda je autory navrhována pro diagnostiku dny v archeologické praxi.

Poměrně širokou oblastí v archeologickém výzkumu je **analýza proteinů, peptidů a aminokyselin (AK)**. Většina HPLC metod využívá pro detekci hmotnostní spektrometrii a budou zmíněny později. Existují ale také práce využívající jednodušší UV-Vis detekce. Předmětem analýzy je nejčastěji kostní kolagen, který je zpravidla získán demineralizací kostí pomocí silné organické kyseliny. Ten je následně kyselé nebo enzymaticky hydrolyzován, a poté jsou stanoveny jednotlivé AK (**obrázek 3-22**). Zejména významnou aplikací je stanovení stáří lidských ostatků pomocí HPLC stanovení poměru D- a L-aminokyselin. Metoda je založena na zvyšování poměru D- a L-enantiomerů se stárnutím organismu (podrobněji viz kapitola o plynové chromatografii, 3.2.2.1). Analytický postup zahrnuje předkolonovou derivatizaci směsí o-ftalaldehydu a 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glukopyranosidu (převedení enantiomerů na diastereomery s rozdílnou retencí na stacionární fázi) a následnou HPLC analýzu s gradientovou elucí (zvyšování obsahu acetonitrilu oproti fosfátovému pufru ve 40% vodném methanolu v mobilní fázi) na koloně typu C8. Metoda byla použita pro analýzu hydrolyzátů kolagenu z lidských kostí a vzorku vlněného koberce. Autoři uvádějí standardní chybu metody v rozmezí 14,2–40,5 let. Současně konstatují, že pomocí této metody je možno se 100% jistotou rozlišit vzorky, jejichž stáří se liší o více než 100 let (Csapo a kol., 1998). Spolehlivost metody by však bylo vhodné dále ověřit větším počtem vzorků.

Specifickou variantou kapalinové chromatografie jsou miniaturizované varianty využívající velmi malých průměrů kolon a nízkých průtoků mobilní fáze. Tyto techniky mohou být dále děleny např. na **kapilární a nanokapali-**



Obrázek 3-22 Schéma extrakce aminokyselin ze vzorku kosti

novou chromatografií, a to v závislosti na vnitřním průměru použitých kolon. U kapilární chromatografie se vnitřní průměry kolon pohybují v rozmezí 2,1 mm – 100 µm (Abian a kol., 2003) a u nanokapalinové chromatografie jsou pak menší než 100 µm (Asensio-Ramos a kol., 2017). Výhodou miniaturizace separační kolony jsou nižší nároky na množství vzorku a mobilní fáze, v některých ohledech je však vyžadována speciální instrumentace (upravený systém čerpání mobilní fáze, spojovací kapiláry s malými mrtvými objemy, miniaturizované detekční cely apod.). Oblasti využití těchto technik se shodují s oblastmi, které byly popsány výše pro HPLC, jedná se koneckonců pouze o „škálování“ této techniky směrem k nižším objemům. Nanokapalinová chromatografie (s C18 kolonou o vnitřním průměru 75 µm) byla využita pro analýzu proteinů po jejich enzymatické hydrolýze na peptidy. Kromě separační kolony byla v této práci využita i trap-kolona (se stejným typem stacionární fáze) pro purifikaci (odsolení) vzorku po enzymatickém štěpení proteinů. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr (Stevens a kol., 2010). Kapilární LC v kombinaci s MS byla využita rovněž k analýze proteinových poživ v nástěnné malbě, v níž byla odhalena přítomnost buvolího αS1-kaseinu. Jako detektor byl využit vysokorozlišující hmotnostní spektrometr s ESI a analyzátořem typu Q-TOF (Corso a kol., 2012). Podobná studie (rovněž s využitím kapilární kapalinové chromatografie) se zaměřila na vzorky nástěnných maleb pocházejících z počátku 20. století. V těchto vzorcích byl nalezen vaječný bílek i žloutek, což bylo v souladu s relevantními historickými recepty. Dále byl objeven rovněž kasein (jako marker mléka), nicméně autoři studie si nebyli jisti, zda bylo mléko použito jako pojivo, jako součást média pro restaurování, nebo jako součást podkladové vrstvy. Byla rovněž využita on-line úprava vzorku odsolením s využitím zachycení analytů na trap-kolonci (Chambery a kol., 2009). V další práci byla pro účely analýzy nekolagenních proteinů využita ultraúčinná kapalinová chromatografie (stacionární fáze BEH C18, rozměry kolony 75 mm × 250 µm, velikost částic 1,7 µm). Z archeologických vzorků kostí dobytka z Velké Británie a Kypru byly extrahovány peptidy, jejichž MS/MS spektra extrahovaná z příslušných chromatografických píků byla následně porovnána s mezinárodní databází proteinů SwissProt. Tímto způsobem bylo identifikováno několik nových proteinů, z nichž jeden byl autory navržen jako vhodný zdroj fylogenetických informací (Wadsworth a kol., 2014).

Vedle proteinů a peptidů byly miniaturizované varianty chromatografie využity i pro **analýzu malých molekul (metabolitů)**. Pomocí nanoLC/MS/MS byla analyzována přibližně 1600 let stará dýmka nalezená v severní Alabamě. Ve vzorku odebraném z této dýmky byl úspěšně detekován **nikotin**; také v tomto případě byla analýza provedena na koloně typu C18 s gradientovou elucí. Mobilní fáze byla tvořena octanem sodným okyseleným kyselinou mravenčí a okyseleným

methanolem (Carmody a kol., 2018). **Kapilární LC/MS lze využít pro identifikaci barviv.** Tento přístup byl zvolen pro analýzu indigoidů v modrých pigmentech nalezených na pohřebních artefaktech ze západního Mexika. Úspěšná detekce těchto barviv znamená posunutí hranice známého používání indigoidních barviv v této geografické oblasti cca o 400 let zpět oproti nejstarším dosud známým nálezům, tj. do období cca 400–200 př.n.l. (de Argados-Pascual a kol., 2019).

Výše popisované klasické chromatografické metody jsou vhodné zejména pro analýzu organických sloučenin. Jedním z módů umožňujících **analýzu anorganických složek je iontová (nebo též iontově-výměnná) chromatografie** (IC, resp. IEC). Jak název napovídá, umožňuje tato technika **separaci analytů ve formě iontů** (kationtů nebo aniontů). Vzhledem k tomu, že tyto analýzy však probíhají v poměrně extrémních podmínkách (eluze silnými kyselinami či bázemi), je většinou nutné, aby byl těmto metodám uzpůsoben celý chromatograf (typická je např. záměna kovových částí přístroje za plastové). Na trhu je proto k dispozici řada chromatografických systémů dedikovaných pro IC. Tyto přístroje většinou využívají vodivostní detektory (CD – z angl. „conductivity detector“). IC se ukázala být velmi efektivní analytickou technikou i pro archeologii. Aniontově-výměnná chromatografie v preparativním měřítku byla použita pro přečištění ionizovaných monomerů získaných hydrolýzou celulózy z historického vzorku dřeva z Chelfordu. Použitá metoda využívá sériově zapojený amperometrický a UV/Vis detektor. Izolované monomery byly dále podrobeny ^{14}C datování (Hodgins a kol., 2001). IC lze spojit rovněž s MS. Osvědčilo se zejména spojení s ICP-MS (o metodě je pojednáno v kap. 3.2.1.3). Toto spojení bylo využito např. pro stanovení poměru izotopů stroncia ^{87}Sr a ^{86}Sr ve vzorcích kostí. Hlavním úkolem IC (zde na principu kationtové výměny) byla separace izotopů ^{87}Sr a ^{87}Rb (Latkoczy a kol., 2001). Podobná instrumentace byla zvolena také např. pro analýzu izotopů boru přítomného ve vzorcích skla z římského období (Devulder a kol., 2013). IC byla využita i pro studium složení povrchů historických malt. Cílem byla kvantifikace obsahu síranových a siřičitanových iontů vznikajících interakcí vzdušného oxidu siřičitého s materiálem (Sabbioni a kol., 2001). Dalšími aplikacemi IC jsou analýza solí poškozujících nálezy potopených amfor z kotviště poblíž Beguru (Katalánsko, Španělsko) (López-Arce a kol., 2013) a studium složení solné eflorescence na povrchu dřevěných domů v norském Trondheimu (Catelli a kol., 2016). IC přispěla k posouzení vhodnosti (či spíše nevhodnosti) dřívějších restaurátorských zásahů (použití halitu a sádrovce) při opravách historického domu v Maroku, k jehož stavbě byl využit minerál kalkarenit (Aalil a kol., 2016). V oblasti kovových materiálů zmiňme IC analýzu cínu a mědi v bronzových artefaktech. Chromatografie umožnila separaci těchto kovů od zbytku matrice pro jejich následnou kvantitativní analýzu pomocí ICP-MS (Balliana a kol., 2013). Technika disponuje

i dostatečnou citlivostí a selektivitou pro určení obsahu olova v naplaveném zlatu z Irska (Standish a kol., 2013). IC byla aplikována také pro kontrolu účinnosti odstraňování chloridů z historické potopené železné dělové koule pocházející z vraku lodi z 18. století. Byly testovány celkem čtyři metody odstraňování chloridů a odstraněné ionty byly kvantifikovány pomocí CD (Coelho a kol., 2014). Obsah chloridů byl rovněž stanoven při studiu míry chemického poškození železných artefaktů (např. řetězů, háků, lopat, seker apod.) nalezených v moři v italské Kalábrii (Pingitore a kol., 2015). Pomocí IC (a dalších metod) bylo analyzováno složení římských **malt** používaných ve vnitřních a vnějších prostorách domů. Z výsledků vyplývá, že tehdejší technologie rozlišovala různé druhy malt pro venkovní a vnitřní použití lišící se v obsazích dolomitu a kalcitu i v profilu použitých pojiv (Birolo a kol., 2017). IC umožnila zachytit stopy solí v objevených jámách na ryby v Súdánu. Ve vzorcích půdy byly nalezeny stopy halitu a jedná se tak o prozatím nejstarší důkaz konzervace ryb pomocí soli na světě – předpokládané stáří nálezů činí zhruba 6400 let př. n. l. (Maritan a kol., 2018). Metodologicky zajímavou prací je rovněž analýza uměle ponořeného dřeva pomocí kolony Rezex ROA Organic Acid H⁺ (8%), na níž byly separovány cukry s následnou detekcí PDA detektorem a refraktometrickým detektorem. Studie dokazuje, že dochází k úbytku v obsahu jednoduchých cukrů v průběhu času. Důvodem je pravděpodobně jejich vyplavování do vody (Lourencon a kol., 2016).

Zvýšení vnitřního průměru chromatografické kolony umožňuje separaci většího množství složek vzorku. Sledováním signálu vhodného detektoru můžeme pak řídit jímání separovaných složek do samostatných nádobek a jednotlivě s nimi dále pracovat. Tyto techniky se zpravidla označují jako **semipreparativní nebo preparativní chromatografie**. Mezi tyto techniky patří klasická sloupcová chromatografie, při níž dochází k pohybu mobilní fáze pouze vlivem gravitace, a tzv. střednětlaká kapalinová chromatografie (MPLC) s tlaky do 240 bar. Preparativní LC byla využita např. pro separaci monomerů cukrů z enzymatického hydrolyzátu celulózy z archeologického vzorku dřeva. Byla využita anexová kolona a amperometrická detekce (Hodgins a kol., 2001). S využitím preparativní kolony naplněné silikagelem a hexanem jako mobilní fází byly separovány uhlovodíky a jejich funkční deriváty v balzamovacím materiálu ze čtyř egyptských mumii pro následnou analýzu izolovaných frakcí pomocí GC/MS (Maurer a kol., 2002). Sloupcová LC byla použita i pro purifikaci houbových metabolitů za účelem druhové identifikace archeologických vzorků houbových stromat (Surup a kol., 2018). Nejčastější aplikací preparativních metod v archeologické analýze je však **separace AK z proteinových hydrolyzátů za účelem následné izotopové analýzy $\delta^{13}\text{C}$** (pomocí níž lze odhadnout preferovanou stravu jedince). Takto byly separovány AK po derivatizaci fluorenylmethyloxykarbonylchloridem, FMOCl (O'Connell

a kol., 2001). Jinou možností z dílny Trippa a kol. (2006) je dvoustupňová separace nativních AK s využitím kombinace chromatografie v reverzním módu (separující méně polární AK) a ion-párovací chromatografie (separující zbylou směs polárnějších AK). Vyvíjeny byly také metody na bázi kolony Primesep-A využívající tzv. směsný mód separace (kombinace hydrofobních interakcí zajišťovaných C12 řetězci a elektrostatických interakcí vyvolaných přítomností ionizovaných karboxylových skupin) schopný oddělit širší spektrum AK v rámci jedné analýzy (McCullagh a kol., 2010; Marom a kol., 2012; Dinnis a kol., 2019).

Velmi využívanou instrumentální kombinací v oblasti separačních metod je **spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem**. Podrobnější informace o hmotnostní spektrometrii jsou uvedeny v kapitole o přímé hmotnostní spektrometrii a o plynové chromatografii a GC/MS (kap. 3.2.1.3 a 3.2.2.1) a několik prací je zmíněno i dříve v kapitole o miniaturizovaných LC technikách. Typickou ionizační technikou je při spojení MS s kapalinovou chromatografií **elektrosprej**. Pro méně polární látky lze dobrých citlivostí dosáhnout s použitím **chemické ionizace nebo fotoionizace za atmosférického tlaku**. V případě využití tandemové hmotnostní spektrometrie (nejběžněji s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu (QqQ) nebo iontové pasti, IT) můžeme dosáhnout zvýšené citlivosti pro přesnou kvantifikaci obsahu cílového analytu ve vzorku, popř. můžeme fragmentovat neznámou sloučeninu. Detekce vzniklých fragmentů pak může napomoci odhalit klíčové strukturní znaky a z nich pak identitu sloučeniny. Je vhodné poznamenat, že LC/MS techniky využívající MS s analyzátozem na principu trojitého kvadrupólu patří k nejcitlivějším kvantitativním analytickým technikám. Pro spojení s kapalinovou chromatografií se používají hmotnostní analyzátory s nízkým (typicky jednotkovým) rozlišením (jednoduchý kvadrupól – Q, QqQ, IT) a s rozlišením vysokým (detektor doby letu (TOF), orbitální past (Orbitrap, O) a iontová cyklotronová rezonance (ICR) a jejich kombinace s Q nebo IT – tzv. hybridní analyzátory). Způsob práce a zejména interpretace dat se dle rozlišovacích schopností hmotnostního analyzátoru významně liší. Proto bude v následujícím textu o LC/MS pojednáno o obou typech analyzátorů zvlášť. Pro spojení s HPLC je významná i rychlost skenování, se kterou dokáže hmotnostní spektrometr pracovat. Je totiž třeba si uvědomit, že u rychlých HPLC analýz dochází k eluci jednotlivých látek z kolony v řádu desítek sekund a hmotnostní spektrometr musí „stihnout“ naměřit pro každou látku dostatečný počet spekter, abychom získali kvalitní signál, resp. spektrum, a „dostatečný počet bodů pro každý chromatografický pík“ pro kvalitní kvantitativní analýzu. Mezi rychlé analyzátory řadíme Q, QqQ a TOF a mezi pomalejší (navzdory pokroku v této oblasti) IT a O.

Spojení HPLC/DAD/ESI-MS s Q analyzátozem bylo využito v oblasti analýzy barviv. Berberin a palmatin byly detekovány jako markery použití kůry korkovní-

ku ve vzorcích textilu (Ahn a kol., 2012). Spojení HPLC/DAD a HPLC/ESI-MS/MS bylo využito pro analýzu barviv extrahovaných z archeologických vzorků textilu z Číny. V extraktech byla nalezena barviva na bázi anthrachinonů, gallotaninů a indiga. Byla provedena optimalizace podmínek pro tyto typy barviv. Dosta- tečné separace bylo dosaženo s využitím kolon RP-18 Kinetex, RP-18 Nucleodur 100-5 a RP-18 Superspher. Jako mobilní fáze se osvědčily různé směsi, tj. acetonitril:tetrahydrofuran (9:1, v/v) a voda:acetonitril:tetrahydrofuran (50:45:5, v/v) pro indigoidy; 0.6% (v/v) HCOOH ve vodě a 0.6% (v/v) HCOOH v acetonitrilu pro apigenin, genistein, luteolin, kvercetin, kyselinu karmínovou, rutin, kyselinu kermesovou, kyselinu flavokermesovou, brazilin/brazilein, kaempferol, kyselinu ellagovou, isatin, lawson a kyselinu galovou; 0.6% (v/v) HCOOH ve vodě a 0.6% (v/v) HCOOH v methanolu pro alizarin, purpurin, chinizarin a rubiadin. Zde je však třeba upozornit na to, že tetrahydrofuran může „leptat“ plastové části chromatografů (kapiláry a spojovací materiál) – při jeho použití je tedy třeba opatrnosti. Jako hmotnostní analyzátor byl použit QqQ. Měření bylo prováděno v režimu MRM (fragmentace vybraných rodičovských iontů a sledování vybraných fragmentů, které z nich vznikají; „multireaction monitoring“) umožňujícím analýzu s velkou citlivostí i selektivitou (Kramell a kol., 2014). Mouri a kol. (2014) pak analyzovali flavonolová barviva z celosvětově rozšířených rostlinných zdrojů. Práce byla zaměřena zejména na studium odlišností mezi aglykony a glykosylovanými sloučeninami. Jedním z hlavních zjištění byla vyšší schopnost aglykonových forem barviv vázat se na proteinová vlákna (vlna, hedvábí) oproti glykosylovaným formám. Ve studii Zhanga a kol. (2005) byly testovány metody pro extrakci barviv z historických vzorků textilu rovněž z Číny. Dobrých výsledků bylo dosaženo s využitím směsi 37% HCl:methanol:voda, 2:1:1 (v/v/v), směsi kyselina mravenčí:methanol, 5:95 (v/v) a směsi 0.001M ethylendiamintetraoctové kyseliny H_2EDTA :acetonitril:methanol, 2:10:88 (v/v/v)). V této práci byla pro separaci použita méně běžná stacionární fáze – silikagel chemicky modifikovaný čtyřuhlíkatými řetězci (C4 fáze), na níž byly separovány alizarin, kvercetin, kyselina karmínová, luteolin a rutin. Na tuto studii autoři navazují další prací odhalující lokální zdroje nalezených barviv (Zhang a kol., 2008). V jiné práci byla provedena analýza historických vzorků vlny a hedvábí z Číny. Výsledky prokázaly, že tato vlna byla barvena flavonoidy, zatímco hedvábí bylo barveno protoberberiny. Důvodem je fakt, že protoberberiny jsou v dané oblasti vzácnější a propůjčují obarveným tkaninám jasnější barvy (Liu a kol., 2013). HPLC/DAD/MS byla využita pro vyhodnocení účinnosti osmi různých druhů extrakčních metod pro extrakci barviv (anthrachinonů, flavonoidů a indigoidů) z vlny barvené košenilou, mořenou, borytem, rýtem, kempeškovým dřevem a fernambukovým dřevem. Jako nejlepší extrakční metoda byla vyhodnocena extrakce kombinací Na_2EDTA a dimethylformamidu

(Manhita a kol., 2011). HPLC/ESI-MS/MS byla úspěšně použita i pro analýzu proteinových poživ. I v této práci bylo využito vysoké citlivosti analyzátoru typu QqQ (Birolo a kol., 2017).

Spojení HPLC/MS se běžně využívá také v analýze nepolárních sloučenin.

Významnou skupinou nepolárních látek, které byly analyzovány pomocí HPLC/MS v archeologických vzorcích, jsou **steroidní hormony**. Obsah těchto sloučenin byl sledován v mrožích kostech a jejich podkožním tuku. Byly studovány možnosti zvýšení citlivosti MS detekce derivatizací dansylchloridem, který je obvykle používán při spektrofotometrické a fluorimetrické detekci. Na základě obsahu progesteronu, testosteronu, kortizolu a estradiolu lze odhadovat míru stresu u těchto zvířat a z těchto dat pak rekonstruovat informace o stavu populace v průběhu času (Charapata a kol., 2018). Velmi dobře se HPLC/MS uplatňuje v analýze složení olejů. Řada prací je zaměřena na **analýzu triacylglycerolů** (TAG). Ty byly sledovány v obsahu historických římských lamp (Kimpe a kol., 2001) a nádobí (Kimpe a kol., 2002). Tyto práce využívají pro ionizaci TAG metodu chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI), která je pro méně polární látky obvykle vhodnější než běžněji používaný elektrosprej. Získaná data umožňují rozlišit živočišný a rostlinný tuk. TAG byly rovněž cílem HPLC/MS analýz v několika studiích obsahu archeologických nádob (Charrie-Duhaut a kol., 2007; Romanus a kol., 2007; Romanus a kol., 2008; Romanus a kol., 2009; Baeten a kol., 2010). Pomocí HPLC/MS/MS bylo studováno složení pryskyřice nalezené na řecké amfoře – ve vzorku byly identifikovány **kyseliny dehydroabietová, isopimarová a pimarová prokazující pryskyřičný původ materiálu** (Zareva a kol., 2010). Doplňme, že pro bližší rozlišení původu pryskyřičných materiálů, typicky jantaru, je možné využít i sledování rozdílů v obsahu kyseliny jantarové, která je poměrně polární sloučeninou. **Porovnání obsahu kyseliny jantarové umožnilo např. rozlišení vzorků baltského a rumunského jantaru** (Teodor a kol., 2009). Analogicky bylo v jiné práci stejného autorského týmu možno odlišit rumunský jantar od dánského (Truica a kol., 2012). V těchto studiích byl jako iontový zdroj použit ESI v negativním ionizačním módu (tvorba aniontů).

Jak bylo již uvedeno dříve, zajímavou oblastí archeologie je studium **stravovacích zvyků starých civilizací**. K poznání v této oblasti významně přispívá i spojení HPLC/MS. Interpretace vychází z analýz vybraných (a již dříve popisovaných) druhů biomolekul – zejména AK a TAG. Využít lze však rovněž specifické sloučeniny (tzv. markery) vyskytující se v přírodě jen v některých potravinách. Methylxanthiny theobromin a kofein tak posloužily jako markery kakaa ve zbytcích z mayské nádoby pocházející z Guatemaly (Hurst a kol., 1989). HPLC/PDA/MS analýza těchto látek byla prováděna v systému reverzních fází s C18 kolonou a jako mobilní fáze byla použita směs vody, methanolu, kyseliny octové a octanu

sodného. Na tuto práci pak úspěšně navázali i další autoři (Soleri a kol., 2013; Kaplan a kol., 2017). Zajímavostí je, že v rámci jedné ze studií se autoři neúspěšně pokusili o detekci těchto sloučenin, avšak místo theobrominu objevili v nádobách pocházejících z Mexika a datovaných do období přelomu letopočtu kapsaicin. Tuto látku je možno použít, jak již výše zmíněno v jiné souvislosti, jako marker pro důkaz přítomnosti papriky ve vzorku (Powis a kol., 2013). Detekce kyseliny vinné a syringové v nádobách pak může pomoci identifikovat zbytky vína. Kromě přírodního obsahu těchto kyselin lze využít také alkalickou hydrolýzu, která rozkládá malvidin (charakteristické barvivo červeného vína) rovněž na kyselinu syringovou a stanovit tak odděleně tuto kyselinu jako „volnou“ a „vázanou“, např. pro odstínění vlivu přirozeného obsahu této kyseliny v matrici (Guasch-Jané a kol., 2004; Guasch-Jané a kol., 2006a; Guasch-Jané a kol., 2006b; Barnard a kol., 2011; Bianco a kol., 2015).

Celá řada původních prací se zabývá HPLC/MS analýzou AK. Významná je jejich analýza v hydrolyzátu kostního kolagenu, jak bylo již zmíněno v úvodu této kapitoly. Takto uvolněné AK jsou analyzovány pomocí **hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů** (IRMS – z angl. „isotope-ratio mass spectrometry“). Zjištěné izotopové poměry umožňují rozlišení různých druhů stravy (např. rozlišení stravy rostlinné od stravy tvořené mořskými plody). Společným rysem dále citovaných prací je rovněž využití kolony Primesep-A. Pionýrskou prací v této oblasti je analýza kosti z 15. století (McCullagh a kol., 2006), na niž navázaly další autorské kolektivy (Dunn a kol., 2011; Pollard a kol., 2011). Pokročilejší instrumentace v oblasti hmotnostní spektrometrie (tzv. vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie, HRMS – z angl. „high-resolution mass spectrometry“) umožňuje hmotnostní měření s vysokým rozlišením a určení hodnoty m/z s vysokou přesností. Připomeňme, že vysoká přesnost měření umožňuje určení elementárního složení detekované sloučeniny a vysoké rozlišení umožňuje rovněž analyzovat látky s velmi blízkými hodnotami m/z a dále tak zvýšit selektivitu spojené metody. Spojení HPLC a hmotnostního spektrometru s analyzátozem typu Orbitrap bylo využito k analýze obsahu barviv ve vzorku dekorativní dečky z kostela Bosco Marengo poblíž Alessandrie (Itálie), tvořené hedvábnými a lněnými vlákny. Výsledky byly použity jako srovnávací pro testování reflektanční spektroskopie, která je vyvíjena jako alternativní neinvazivní technika vhodná pro archeologické aplikace (Gulmini a kol., 2013). Pomocí kombinace HPLC/ESI-MS (na koloně typu C18 a s využitím mobilní fáze tvořené směsí vody, acetonitrilu a TFA; využití Q-TOF analyzátoru) byla potvrzena přítomnost alizarinu na historických mramorových sochách. Získaná data se stala základem pro vývoj rutinní HPLC/DAD metody (Bracci a kol., 2019). Vedle vláken je možné analyzovat obsahy barviv např. také v **kosmetických materiálech**. V řecké pyxidě datované do prvních

století našeho letopočtu byla metodou HPLC/DAD/MS s využitím FT-ICR jako MS analyzátoru identifikována anthrachinonová barviva munjistin a pseudopurpurin (Van Elslande a kol., 2008). Moderním a velmi efektivním nástrojem je **spojení ultraúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií** (UHPLC/HRMS) poskytující vysokou rozlišující schopnost jak v chromatografickém, tak ve hmotnostně-spektrometrickém rozměru analýzy a umožňující velmi rychlé analýzy. Spojení UHPLC/HRMS bylo využito pro studium barviv ve vzorku keramiky (barvená nádobka na kadidlo) a ve vzorcích barviv z rukopisu ze 16. století. Cílem bylo zjistit, zda tyto předměty pocházející z Mexika obsahují pigmenty na bázi indiga vyráběné domorodou předkolumbovskou technologií. Jednotlivé techniky výroby indiga lze odlišit na základě výsledného poměru indigotinu a indirubinu, jehož hodnota je ovlivněna použitým technologickým procesem. Na základě naměřených výsledků bylo určeno, že předměty obsahují barvy vyráběné domorodou technologií (Sanz a kol., 2012). Další studie spojující UHPLC a HRMS se zabývá analýzou vzorků textilu nalezených v Novém Městě pražském (Kohout a kol., 2016). Obě metody využívají kolonu typu C18 s průměrem částic menším než 2 μm a generické mobilní fáze (0,1% kyselina mravenčí ve vodě a v acetonitrilu). UHPLC/HRMS byla použita i pro analýzu TAG. Ty byly detailně analyzovány v recentních rostlinných olejích (La Nasa a kol., 2013) a v navazující studii organických reziduí z keramických nádob. Ve zkoumaných vzorcích byl nalezen vepřový tuk a rostlinný olej s vysokým podílem trioleinu a polynenasycených TAG. Pro tyto analýzy byla použita chromatografická kolona s povrchově porézní stacionární fází Poroshell 120 EC-18. Výhodou kolon obsahujících povrchově porézní částice je možnost použití konvenčních HPLC tlaků při účinnosti kolon, která odpovídá UHPLC instrumentaci (Saliu a kol., 2014). Profil TAG byl sledován také ve velrybím tuku a pomohl v rozlišení jednotlivých zkoumaných druhů velryb (Blanco-Zubiaguirre a kol., 2018). Při analýze keramických nádob z Peru pomohla analýza TAG a sterolů určit původ tuků. Bylo zjištěno, že ve zkoumaných nádobách byla skladována směs živočišných a rostlinných tuků (Lantos a kol., 2020). HPLC/MS technika byla využita také při analýze zuhelnatělých včelích pláství. Cílem analýzy byla identifikace voskových monoesterů. V kombinaci s archeobotanickým nálezem semen *Vitis vinifera* (révy vinné) jde o důkaz o včelaření v Pádské nížině v době železné s využitím květů vinné révy jako zdroje potravy pro včely (Castellano a kol., 2017). Poslední zajímavou skupinou lipidů s významem pro archeologii jsou **lipidy produkované houbou paličkovici nachovou** (*Claviceps purpurea*). Jedná se o lipidy bohaté na kyselinu ricinolejovou. Nízký stupeň nenasycenosti těchto glyceridů zajišťuje jejich poměrně vysokou stabilitu i u archeologických vzorků, takže jsou vhodnými kandidáty pro analýzu, navíc strukturně odlišnými od jiných perzistentních lipidů. Jejich přítomnost pak

může být (vzhledem k poměrně selektivnímu parazitickému chování paličkovi-
ce) využita pro **nepřímý důkaz přítomnosti obilovin**. Rovněž v této studii byla
využita povrchově porézní kolona Poroshell 120 EC-18, která poskytovala velmi
dobrou separační účinnost. Při analýze byla použita vyšší teplota kolony – byla
termostatována na 45 °C (Lucejko a kol., 2018).

V oblasti **analýzy proteinů** (tzv. **proteomiky**) pomocí kombinace kapalinové
chromatografie a vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie dominuje tzv. „shot-
gun proteomika“, jejímž principem je digesce proteinů a analýza vzniklých se-
parovaných peptidů pomocí MS/MS. Následným porovnáním získaných spekter
s proteinovými databázemi je pak možné identifikovat původní proteiny. UHPLC/
HRMS byla využita také pro určení pohlaví „milenců z Modeny“ – mladého páru
pohřbeného „ruku v ruce“. Cílem analýz byly proteinové digestáty zubní sklo-
viny obou těl, v nichž byl hledán amelogenin – protein, který existuje ve dvou
izoformách označovaných jako X a Y (s kódováním odpovídajícím příslušným
pohlavním chromozomům). Na základě přítomnosti či absence izoformy Y pak lze
usoudit, zda vzorek pochází z mužského či ženského těla. V obou vzorcích zubní
skloviny byla autory nalezena izoforma Y a v kontrastu s osteologií, která určila
heterogenní pohlaví páru (muž a žena), bylo tak na základě chemické analýzy
určeno, že se jedná o pár mužů. Identifikace zmiňované izoformy Y amelogeninu
byla provedena na základě tří charakteristických peptidů, které jsou autory do-
poručovány jako vhodné markery tohoto proteinu (Lugli a kol., 2019).

V rámci archeologického výzkumu se můžeme setkat také s potřebou **analýzy
psychoaktivních látek**. Kombinace dvou HPLC/MS/MS přístrojů využívajících
jako analyzátory QqQ a FT-ICR byla využita pro analýzu tmavého olejovitého
materiálu nalezeného v nádobce tvaru makovice. Cílem analýzy byly v tomto
případě alkaloidy a ve vzorcích byly objeveny makové opiáty thebain a papaverin.
Paralelně probíhaly také experimenty s uměle stařenými makovými oleji, v nichž
byly i po staření nalezeny další makové alkaloidy. Původní hypotéza, že nádoba
obsahovala opium, byla zpochybněna výsledky GC/MS analýz, podle nichž byl
nosným médiem (matricí) olej. Závěr studie tak konstatuje, že se pravděpodobně
jednalo o nádobku na skladování makového oleje, popř. vonného oleje s makovým
(Smith a kol., 2018). Zub ze skeletu z doby železné nalezeného ve Vietnamu byl
testován na přítomnost sloučenin, které by potvrdily užívání betelového sousta
– tradičního stimulantu užívaného v jihovýchodní Asii. LC/ESI-MS analýza
využívající klasickou kolonu typu C18, resp. pentafluorfenylovou (PFP) kolonu
a detekci pomocí hmotnostních spektrometrů typu QqQ a Q-TOF prokázala pří-
tomnost arekolinu, primární psychoaktivní sloučeniny z arekového ořechu, jenž
je součástí „sousta“. S ohledem na další informace o zkoumaném jedinci (zejména
na přítomnost patologií na jeho těle) vyslovili autoři hypotézu, že betelové sousto

mu sloužilo jako lék pro potlačení bolesti (Krais a kol., 2017). Dalším příkladem analýzy návykových látek v zubech (v tomto případě nikotinu v zubním kameni) je práce zabývající se tzv. „pre-kontaktními“ jedinci ze střední Kalifornie (tzn. domorodci žijícími bez kontaktu s Evropany). Z deseti testovaných vzorků byl nikotin nalezen ve dvou. Kromě nikotinu byly ve vzorcích sledovány i signály dalších alkaloidů (např. atropinu a kofeinu), které však nebyly zachyceny (Eerkens a kol., 2018). Zajímavá je rovněž analýza sbírky rituálních předmětů z Bolívie uložených v kožené tašce, na jejichž povrchu byly nalezeny stopy psychotropních látek ze skupiny dimethyltryptaminů, kokainu a jeho metabolitu benzoylecgoninu. Po porovnání s výskytem těchto sloučenin v přírodních produktech vyplývá z výsledků provedených experimentů, že uvedená sbírka musela zahrnovat minimálně tři různé zdroje psychotropních látek s odlišným geografickým původem, a tedy že v 10. století n. l. probíhal v jižní Americe cílený transport těchto materiálů (Miller a kol., 2019). Z dalších zajímavých studií využívajících vysokorozlišující MS uveďme ještě práci zabývající se studiem **jedů** používaných při lovu. V rámci této studie byly analyzovány stěry z hrotů šípů a dalších loveckých nástrojů (pocházejících z různých zdrojů po celém světě). Získané chromatogramy a spektra byly porovnávány s profily extraktů přírodních zdrojů jedů (např. rostlin rodů *Strychnus* a *Aconitum*) a v některých případech byla nalezena shoda v pozorovaných signálech (Borgia a kol., 2017). Analýzou jedu v šípů z Namibie bylo prokázáno, že obsahuje jed z rostliny *Strychnos madagascariensis*, což znamená, že buď jed, nebo celý šíp, musel být na místo nálezů v minulosti cíleně dopraven z oblasti, kde se tato rostlina vyskytuje, tj. patrně ze středovýchodního pobřeží Afriky nebo z Madagaskaru (Wooding a kol., 2017).

Častou používanou chromatografickou technikou zejména při analýze polymerních sloučenin je **gelová permeační chromatografie, GPC** (někdy také označovaná jako „vylučovací chromatografie“). Jejím principem je **oddělování jednotlivých složek směsi na základě rozdílů ve velikosti jejich molekul**. Velikost molekuly často koreluje s molekulovou hmotností, proto je možno po příslušné kalibraci vhodnými standardy GPC využívat k **určení molekulové hmotnosti analytů**. Tato metoda se využívá zejména pro frakcionaci biomolekul a syntetických polymerů. GPC se velmi dobře uplatnila při studiu polymerních frakcí získaných z recentních či historických vzorků dřeva a určení jejich střední molekulové hmotnosti. Obecně je možné říci, že degradace ligninu v archeologických vzorcích vede k relativnímu snížení jeho průměrné molekulové hmotnosti oproti zdravému dřevu. To prokázala například analýza acetylovaného ligninu extrahovaného z vraků lodí nalezených v San Rossore (Itálie) provedená s využitím kolony Agilent PL 3 μ m MIXED gel EMW220–400W (Colombini a kol., 2009). V návazné studii stejného týmu byla analýza acetylovaného ligninu doplněna o analýzu benzoylelovaného

vzorku dřeva (tento typ derivatizace umožňuje charakterizovat přítomnou směs polysacharidů). Bylo tak možné porovnat jednak změnu průměrné molekulové hmotnosti **ligninu** (vázaná polyfenolická frakce dřeva) a jednak změnu průměrné hmotnosti celulóзовé (polysacharidové) frakce. Tato studie dospěla k závěru, že polysacharidy jsou degradačními procesy ovlivněny více než lignin (Salanti a kol., 2010). Pomocí vylučovací chromatografie byly studovány rovněž vzorky dubového dřeva ze švédské lodi Vasa. Pro analýzu byly využity spojené kolony Mixed-A 20 μm (Polymer Laboratories) a i v tomto případě byl zjištěn pokles průměrné molekulové hmotnosti oproti zdravému dubovému dřevu, jež bylo použito jako reference (Lindfors a kol., 2008). Také tato studie byla později rozšířena, a to o analýzu vlivu amoniaku, který byl použit na ošetření vzorků dřeva ze stejné lodi. Byla použita stejná metodika jako v předchozí práci a bylo zjištěno, že zatímco u dřeva ošetřeného polyethylenglykolem (PEG) nedošlo ke změně průměrné molekulové hmotnosti, u dřeva neošetřovaného způsobilo použití amoniaku pokles průměrné molekulové hmotnosti, pravděpodobně vlivem alkalické hydrolýzy (Fors a kol., 2010). V další studii zabývající se vlivem chemikálií na stav dřeva byly pak vzorky z lodi Vasa vystaveny účinku železnatých solí v umělém stařicím experimentu zahrnujícím kontrolované hodnoty vlhkosti, teploty a relativního obsahu kyslíku ve vzduchu. Bylo zjištěno, že přítomnost železnatých solí urychluje degradační procesy ve dřevě. Ty ale mohou být naopak zpomaleny, pokud je dřevo ošetřeno PEG (Norbaksh a kol., 2013).

S ohledem na problematiku analýzy sacharidů zmiňme práci analyzující monosacharidy z rostlinných gum, využívaných jako pojiva v historických uměleckých dílech. Tyto sloučeniny byly extrahovány mikrovlnnou hydrolýzou vzorků obsahujících polysacharidy a následně analyzovány pomocí **superkritické fluidní chromatografie (SFC) ve spojení s MS**. Tato chromatografická metoda využívá jako mobilní fázi superkritický oxid uhličitý (s přísadami tzv. modifikátorů – např. alkoholů či organických kyselin) a kombinuje část výhod kapalinové i plynové chromatografie. Vyvinutá metoda využívá kolonu typu C18 a modifikátorem, přidávaným v gradientovém profilu, je směs methanol:voda:kyselina mravenčí 91:5:4 (v/v/v). V analyzovaných vzorcích byly identifikovány čtyři hexózy, tři pentózy, dvě deoxyhexózy a dvě uronové kyseliny v recentních reálných vzorcích, metoda je však vzhledem k cílovým analytům vhodná také pro analýzu historických/archeologických vzorků uměleckých děl (Pauk a kol., 2017).

V oblasti biomolekul se rovněž využívají metody **afinitní chromatografie**, jejímž principem je použití stacionární fáze se specifickými vazebnými místy, která vykazují vysokou selektivitu vůči cílovému analytu (např. využití kombinace **protilátka-antigen** nebo **receptor-ligand**). Analyt je při nanesení vzorku zadržen na koloně, zbytek matrice je vymyt v promývacím kroku vhodným rozpouštědlem

s nízkou eluční silou, a nakonec je jiným rozpouštědlem cíleně vymyt zachycený analyt. Pomocí afinitní chromatografie byla provedena detekce lidského hemoglobinu v historických vzorcích kostí (stáří 3–15 tisíc let). Jako stacionární fáze bylo využito imobilizované králičí antihemoglobinové sérum (Lendaro a kol., 1991). Kombinace afinitní i gelové permeační chromatografie pak byla použita pro purifikaci enzymových frakcí z extraktů kostí egyptské mumie s cílem detekovat alkalickou fosfatázu jako marker lidského původu těchto kostí. Tyto extrakty byly nejprve frakcionovány pomocí GPC (kolona HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade), jednotlivé frakce byly testovány na fosfatázovou aktivitu a aktivní frakce byly poté separovány pomocí afinitní chromatografie na agarózové koloně. Z výsledků studie vyplývá důležitý závěr, že alkalickou fosfatázu lze detekovat i ve 4 tisíce let starých vzorcích kostí (Kaup a kol., 2000).

Poslední rutinně používanou analytickou chromatografickou technikou je **chromatografie na tenké vrstvě** (tenkovrstvá chromatografie, TLC). Jejím principem je nanesení roztoku vzorku na desku se sorbentem a následný „vývoj“ chromatogramu ponořením okraje desky do vyvíjecího rozpouštědla. To vzhlíná díky kapilárním silám skrze desku a unáší jednotlivé analyty ze vzorku (rychlost jejich pohybu je ovlivněna mírou jejich interakce se sorbentem). Následně je deska vysušena a separované skvrny jednotlivých analytů jsou detekovány buď postřikem činidly, nebo jinými metodami (např. pomocí UV světla). Metodu je možno využít jak pro kontrolu přítomnosti/absence analytu ve vzorku, tak např. pro následnou extrakci skvrny a další analýzu získaného analytu/frakce. TLC byla využita např. pro předseparaci frakcí lipidických sloučenin extrahovaných ze vzorků keramiky. Byly použity desky se silikagelovým sorbentem a vyvíjecím činidlem byla směs benzenu a petroletheru, resp. směs petroletheru, diethyletheru a kyseliny octové. Skvrny byly zviditelněny buď zahříváním desky na 150 °C po postřiku 60% kyselinou sírovou, nebo postřikem bromkresolovou zelení (Passi a kol., 1981). V analytickém, ale i v preparativním měřítku byly pak separovány monoenové mastné kyseliny z adipoceru z těla nalezeného v bažině v Irsku. Pro separaci byly využity komerční aluminové desky a také laboratorně připravené silikagelové desky napuštěné roztokem dusičnanu stříbrného. Skvrny byly zviditelněny v UV světle po postřiku desky ethanolickým roztokem berberinu. Jednotlivé frakce byly následně z desek extrahovány a analyzovány pomocí GC/MS (Evershed, 1992). Další nepolární sloučeninou analyzovanou pomocí TLC je koprostanol (5- β -cholestan-3- β -ol). Tato sloučenina může sloužit jako **marker lidských fekálií**. Ve studii, zabývající se lokalizací odpadních jam z různých období lidské historie, byl koprostanol separován na komerčních silikagelových deskách a bylo zjištěno, že tato sloučenina přežije v půdě déle než 2000 let (Bethell a kol., 1994). Na tuto studii navázala další práce zabývající se detekcí 5- β -stigmastanolu

(marker přítomnosti hnoje) a dalších 5- β -stanolů. Tato práce nezahrnuje analýzu historických vzorků, nicméně autoři vyzdvihují „potenciál metody pro archeologické aplikace“ (Evershed a kol., 1997). Z ostatních zajímavých prací na téma archeologické analýzy pomocí TLC zmiňme detekci anthrachinonových a flavonoidních barviv ve vzorcích předkolumbovských textilních materiálů z jižního Peru, v nichž byly nalezeny kyselina karmínová (marker košenily) a purpurin. V kombinaci s informací o nepřítomnosti alizarinu bylo možno určit, že studované barvivo pochází z rostliny druhu *Relbunium* (Wallert a kol., 1996). O'Connell a kol. provedli TLC separaci kolagenových AK (detekovaných v UV světle po postřiku ninhydrinem), v separovaných frakcích určili **poměr $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{15}\text{N}$** a zkoumali souvislost těchto poměrů a faktu, zda se jedná o esenciální či neesenciální AK (O'Connell a kol., 2001). TLC umožnila rovněž zachytit přítomnost meskalinu v peyotlových „knoflicích“ nalezených v texaské jeskyni. Šlo o nejstarší důkaz užívání peyotlu v severní Americe (cca 5700 př. n. l.) (El-Seedi a kol., 2005). Dobrých výsledků bylo dosaženo i při TLC analýze anthrachinonových barviv na silikagelu extrahovaných ze vzorku oděvu z potopené lodi (součástí této práce je i HPLC analýza diskutovaná výše) (Maier a kol., 2010). Kromě studií historických vzorků zmiňme také z metodického hlediska zajímavou práci využívající TLC separaci **inkoustů** z kuličkových per na silikagelu s následnou přímou analýzou skvrn pomocí hmotnostní spektrometrie (TOF-SIMS), u níž autoři předpokládají „potenciál pro aplikaci v oblasti analýzy historických vzorků inkoustů“ (Coumbaros a kol., 2009).

Literatura

- Aalil I., Beck K., Brunetaud X., Cherkaoui K., Chaaba A., Al-Mukhtar M., Deterioration analysis of building calcarenite stone in the House of Venus in the archaeological site of Volubilis (Morocco), *Constr. Build. Mater.* 2016, 125, 1127–1141.
- Abian J., Carrascal M., Quantitative Peptide Determination Using Column-Switching Capillary Chromatography Interfaced with Mass Spectrometry, In: *Emerging Technologies in Protein and Genomic Material Analysis*, Marko-Varga G.A., Oroszlan P.U (eds.), *Journal of Chromatography Library* 2003, 68, 2003 (DOI:10.1016/S0301-4770(03)80006-4).
- Ahn C., Zeng X., Obendorf S. K., Analysis of dye extracted from *Phellodendron* bark and its identification in archaeological textiles, *Text. Res. J.* 2012, 82, 1645–1658.
- Aksamija A., Mathe C., Vieillescazes C., Liquid Chromatography of Triterpenic Resins after Derivatization with Dansyl Chloride, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 2012, 35, 1222–1237.
- Asensio-Ramos M., Fanali C., D'Orazio G., Fanali S., Chapter 27 – Nano-liquid chromatography, In: *Liquid Chromatography, Fundamentals and Instrumentation* (2. edice), Fanali S., Haddad P. R., Poole C. F., Riek-

- kola M.-L. (eds.), Elsevier 2017 (ISBN: 9780128053935).
- Baeten J., Romanus K., Degryse P., De Clercq W., Poelman H., Verbeke K., Luypaerts A., Walton M., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M., Application of a multi-analytical toolset to a 16th century ointment: Identification as lead plaster mixed with beeswax, *Microchem. J.* 2010, 95, 227–234.
- Balliana E., Aramendia M., Resano M., Barbante C., Vanhaecke F., Copper and tin isotopic analysis of ancient bronzes for archaeological investigation: development and validation of a suitable analytical methodology, *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 2973–2986.
- Barnard H., Dooley A. N., Areshian G., Gasparyan B., Faull K. F., Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late Chalcolithic Near Eastern highlands, *J. Archaeol. Sci.* 2011, 38, 977–984.
- Bethell P. H., Goad L. J., Evershed R. P., Ottaway J., The Study of Molecular Markers of Human Activity – the Use of Coprostanol in the Soil as an Indicator of Human Fecal Material, *J. Archaeol. Sci.* 1994, 21, 619–632.
- Bianco G., Granafei S., Colivicchi F., Cataldi T. R. I., Buchicchio A., Ancient pottery from archaeological sites in southern Italy: first evidence of red grape product markers, *Eur. J. Mass Spectrom.* 2015, 21, 693–699.
- Biesaga M., Wach A., Donten M., Maik J., Pyrzynska K., Acidic hydrolysis and extraction of natural dyes present in plants and ancient textiles, *Chem. Anal. (Warsaw)* 2006, 51, 251–265.
- Birolo L., Tomeo A., Trifuoggi M., Auriemma F., Paduano L., Amoresano A., Vinciguerra R., De Rosa C., Ferrara L., Giarra A., Luchini A., De Maio C., Greco G., Vergara A., A hypothesis on different technological solutions for outdoor and indoor Roman wall paintings, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2017, 9, 591–602.
- Blanco-Zubiaguirre L., Ribechini E., Degano I., La Nasa J., Carrero J.A., Inanez J., Olivares M., Castro K., GC-MS and HPLC-ESI-QToF characterization of organic lipid residues from ceramic vessels used by Basque whalers from 16th to 17th centuries, *Microchem. J.* 2018, 137, 190–203.
- Borgia V., Carlin M. G., Crezzini J., Poison, plants and Palaeolithic hunters. An analytical method to investigate the presence of plant poison on archaeological artefacts, *Quatern. Int.* 2017, 427, 94–103.
- Bracci S., Vettori S., Cantisani E., Degano I., Galli M., The ancient use of colouring on the marble statues of Hierapolis of Phrygia (Turkey): an integrated multi-analytical approach, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2019, 11, 1611–1619.
- Carmody S., Davis J., Tadi S., Sharp J. S., Hunt R. K., Russ J., Evidence of tobacco from a Late Archaic smoking tube recovered from the Flint River site in southeastern North America, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018, 21, 904–910.
- Castellano L., Ravazzi C., Furlanetto G., Pini R., Saliu F., Lasagni M., Orlandi M., Perego R., Degano I., Valotti F., de Marinis R. C., Casini S., Quirino T., Rapi M., Charred honeycombs discovered in Iron Age Northern Italy. A new light on boat beekeeping and bee pollination in pre-modern world, *J. Archaeol. Sci.* 2017, 83, 26–40.
- Catelli E., Banica F. G., Banica A., Salt efflorescence in historic wooden buildings, *Herit. Sci.* 2016, 4.
- Clementi C., Nowik W., Romani A., Cardon D., Trojanowicz M., Davantes A., Chaminade P., Towards a semiquantitative non invasive characterisation of Tyrian purple dye composition: Convergence of UV-Visible reflectance spectroscopy and fast-high temperature-high performance liquid chromatography with photodiode array detection, *Anal. Chim. Acta* 2016, 926, 17–27.
- Coelho J. C., Oliveira C. M., Carvalho M. D., Fonseca I. T. E., The efficiency of electrochemical methods

- for the removal of chloride ions from iron marine archaeological objects: A comparative study, *Mater. Corros.* 2014, 65, 38–44.
- Colombini M. P., Lucejko J. J., Modugno F., Orlandi M., Tolppa E. L., Zoia L., A multi-analytical study of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood, *Talanta* 2009, 80, 61–70.
- Corso G., Gelzo M., Chambery A., Severino V., Di Maro A., Lomoriello F.S., D'Apolito O., Dello Russo A., Gargiulo P., Piccioli C., Arcari P., Characterization of pigments and ligands in a wall painting fragment from Linternum archaeological park (Italy), *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 2986–2993.
- Coumbaros J., Kirkbride K. P., Klass G., Skinner W., Application of time of flight secondary ion mass spectrometry to the in situ analysis of ballpoint pen inks on paper, *Forensic Sci. Int.*, 2009, 193, 42–46.
- Csapo J., Csapo-Kiss Z., Csapo J., Use of amino acids and their racemisation for age determination in archaeometry, *Trac-Trends Anal. Chem.* 1998, 17, 140–148.
- de Agredos-Pascual M. L. V., Roldan-Garcia C., Murcia-Mascaros S., Barber D. J., Sanchez M. G. J., Faugere B., Darras V., Multianalytical characterization of pigments from funerary artefacts belongs to the Chupicuaro Culture (Western Mexico): Oldest Maya blue and cinnabar identified in Pre-Columbian Mesoamerica, *Microchem. J.* 2019, 150, 104101.
- Degano I., Biesaga M., Colombini M. P., Trojanowicz M., Historical and archaeological textiles: An insight on degradation products of wool and silk yarns, *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 5837–5847.
- Degano I., Colombini M. P., Multi-analytical techniques for the study of pre-Columbian mummies and related funerary materials, *J. Archaeol. Sci.* 2009, 36, 1783–1790.
- Deviese T., Ribechini E., Baraldi P., Farago-Szekeres B., Duday H., Regert M., Colombini M. P., First chemical evidence of royal purple as a material used for funeral treatment discovered in a Gallo-Roman burial (Naintre, France, third century AD), *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 401, 1739–1748.
- Devulder V., Degryse P., Vanhaecke F., Development of a Novel Method for Unraveling the Origin of Natron Flux Used in Roman Glass Production Based on B Isotopic Analysis via Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 2013, 85, 12077–12084.
- Dinnis R., Bessudnov A., Reynolds N., Deviese T., Pate A., Sablin M., Sinitsyn A., Higham T., New data for the Early Upper Paleolithic of Kostenki (Russia), *J. Hum. Evol.* 2019, 127, 21–40.
- Dunn P. J. H., Honch N. V., Evershed R. P., Comparison of liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS) and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) for the determination of collagen amino acid delta C-13 values for palaeodietary and palaeoecological reconstruction, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2011, 25, 2995–3011.
- Eerkens J. W., Tushingham S., Brownstein K. J., Garibay R., Perez K., Murga E., Kaijankoski P., Rosenthal J. S., Gang D. R., Dental calculus as a source of ancient alkaloids: Detection of nicotine by LC-MS in calculus samples from the Americas, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018, 18, 509–515.
- Elnaggar A., Leona M., Nevin A., Heywood A., The Characterization of Vegetable Tannins and Colouring Agents in Ancient Egyptian Leather from the Collection of the Metropolitan Museum of Art, *Archaeometry* 2017, 59, 133–147.
- El-Seedi H. R., De Smet P. A. G. M., Beck O., Posner G., Bruhn J. G., Prehistoric peyote use: Alkaloid analysis and radiocarbon dating of archaeological

- specimens of *Lophophora* from Texas, *J. Ethnopharmacol.* 2005, 101, 238–242.
- Evershed R. P., Chemical-Composition of a Bog Body Adipocere, *Archaeometry* 1992, 34, 253–265.
- Evershed R. P., Bethell P. H., Reynolds P. J., Walsh N. J., 5 beta-Stigmastanol and related 5 beta-stanols as biomarkers of manuring: Analysis of modern experimental material and assessment of the archaeological potential, *J. Archaeol. Sci.* 1997, 24, 485–495.
- Flamini G., Morelli I., Piacenza L., Archaeobotanic evidence of the preincaic chiribaya culture. Determination of capsaicinoids in archaeological samples of *Capsicum frutescens* and votive foods, *Phytochem. Anal.* 2003, 14, 325–327.
- Fors Y., Richards V., The Effects of the Ammonia Neutralizing Treatment on Marine Archaeological Vasa Wood, *Stud. Conserv.* 2010, 55, 41–54.
- Frei K. M., Vanden Berghe I., Frei R., Mannering U., Lyngstrom H., Removal of natural organic dyes from wool-implications for ancient textile provenance studies, *J. Archaeol. Sci.* 2010, 37, 2136–2145.
- Gernaey A. M., Minnikin D. E., Copley M. S., Dixon R. A., Middleton J. C., Roberts C. A., Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis, *Tuberculosis* (Edinb) 2001, 81, 259–265.
- Guasch-Jané M. R., Andres-Lacueva C., Jauregui O., Lamuela-Raventos R. M., The origin of the ancient Egyptian drink Shedeh revealed using LC/MS/MS, *J. Archaeol. Sci.* 2006, 33, 98–101.
- Guasch-Jané M. R., Andres-Lacueva C., Jauregui O., Lamuela-Raventos R. M., First evidence of white wine in ancient Egypt from Tutankhamun's tomb, *J. Archaeol. Sci.* 2006, 33, 1075–1080.
- Guasch-Jané M. R., Ibern-Gomez M., Andres-Lacueva C., Jauregui O., Lamuela-Raventos R. M., Liquid chromatography with mass spectrometry in tandem mode applied for the identification of wine markers in residues from ancient Egyptian vessels, *Anal. Chem.* 2004, 76, 1672–1677.
- Gulmini M., Idone A., Diana E., Gastaldi D., Vaudan D., Aceto M., Identification of dyestuffs in historical textiles: Strong and weak points of a non-invasive approach, *Dyes Pigments* 2013, 98, 136–145.
- Hodgins G. W. L., Butters T. D., Ramsey C. B., Hedges R. E. M., The chemical and enzymatic hydrolysis of archaeological wood cellulose and monosaccharide purification by high pH anion exchange chromatography for compound-specific radiocarbon dating, *Radiocarbon* 2001, 43, 209–215.
- Hurst W. J., Martin R. A., Jr., Tarka S. M., Jr., Authentication Of Cocoa In Maya Vessels Using High-Performance Liquid Chromatographic Techniques, *J. Chromatogr. A* 1989, 466, 279–289.
- Chambery A., Di Maro A., Sanges C., Severino V., Tarantino M., Lamberti A., Parente A., Arcari P., Improved procedure for protein binder analysis in mural painting by LC-ESI/Q-q-TOF mass spectrometry: detection of different milk species by casein proteotypic peptides, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 395, 2281–2291.
- Charapata P., Horstmann L., Jannasch A., Misarti N., A novel method to measure steroid hormone concentrations in walrus bone from archaeological, historical, and modern time periods using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2018, 32, 1999–2023.
- Charrie-Duhaut A., Connan J., Rouquette N., Adam P., Barbotin C., de Rozieres M. F., Tchapla A., Albrecht P., The canopic jars of Rameses II: real use revealed by molecular study of organic residues, *J. Archaeol. Sci.* 2007, 34, 957–967.
- Jemo D., Parac-Osterman D., Identification of Natural Dyes on 18th Century Liturgical Textiles from Dubrovnik, *Fibres Text. East. Eur.* 2017, 25, 113–120.

- Kaplan J., Umana F. P., Hurst W. J., Sun D., Stanley B., Pingarron L. B., Cardona M. O., Cacao residues in vessels from Chocoma, an early Maya polity in the southern Guatemalan piedmont, determined by semi-quantitative testing and high-performance liquid chromatography, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2017, 13, 526–534.
- Karapanagiotis I., Lakka A., Valianou L., Chrissoulakis Y., High-performance liquid chromatographic determination of colouring matters in historical garments from the Holy Mountain of Athos, *Microchim. Acta* 2008, 160, 477–483.
- Karapanagiotis I., Mantzouris D., Cooksey C., Mubarak M. S., Tsiamyrtzis P., An improved HPLC method coupled to PCA for the identification of Tyrian purple in archaeological and historical samples, *Microchem. J.* 2013, 110, 70–80.
- Karapanagiotis I., Verhecken-Lammens C., Kamaterou P., Identification of dyes in Egyptian textiles of the first millennium ad from the collection Fill-Trevisiol, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2019, 11, 2699–2710.
- Kaup Y., Weser U., Ancient metalloenzymes as possible markers in molecular archaeology, *J. Inorg. Biochem.* 2000, 79, 3–6.
- Kimpe K., Jacobs P. A., Waelkens M., Analysis of oil used in late Roman oil lamps with different mass spectrometric techniques revealed the presence of predominantly olive oil together with traces of animal fat, *J. Chromatogr. A* 2001, 937, 87–95.
- Kimpe K., Jacobs P. A., Waelkens M., Mass spectrometric methods prove the use of beeswax and ruminant fat in late Roman cooking pots, *J. Chromatogr. A* 2002, 968, 151–160.
- Kohout D., Viden I., Chudoba J., Brezinova H., Identification of Natural Dyes Extracted from Archaeological Textiles Using Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection, *Chem. Listy* 2016, 110, 818–827.
- Koren Z. C., High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of an Ancient Tyrian-Purple Dyeing Vat from Israel, *Israel. J. Chem.* 1995, 35, 117–124.
- Krais S., Klima M., Huppertz L. M., Auwarter V., Altenburger M. J., Neukamm M. A., Betel Nut Chewing in Iron Age Vietnam? Detection of Areca catechu Alkaloids in Dental Enamel, *J. Psychoactive Drugs* 2017, 49, 11–17.
- Kramell A., Li X., Csuk R., Wagner M., Goslar T., Tarasov P. E., Kreusel N., Kluge R., Wunderlich C. H., Dyes of late Bronze Age textile clothes and accessories from the Yanghai archaeological site, Turfan, China: Determination of the fibers, color analysis and dating, *Quatern. Int.* 2014, 348, 214–223.
- La Nasa J., Ghelardi E., Degano I., Modugno F., Colombini M. P., Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer, *J. Chromatogr. A* 2013, 1308, 114–124.
- Lantos I., Careaga V. P., Palamarczuk V., Aversente Y., Bonifazi E., Petrucci N. S., Maier M. S., Combined use of gas chromatography and HPLC-ESI-Q-TOF to assess the culinary uses of archaeological Santa Maria style ceramic vessels from El Colorado (Catamarca, Argentina), *Archaeol. Anthropol. Sci.* 2020, 12, 121.
- Latkoczy C., Prohaska T., Watkins M., Teschler-Nicola M., Stingeder G., Strontium isotope ratio determination in soil and bone samples after on-line matrix separation by coupling ion chromatography (HPIC) to an inductively coupled plasma sector field mass spectrometer (ICP-SFMS), *J. Anal. Atom. Spectrom.* 2001, 16, 806–811.
- Lee O. Y. C., Wu H. H. T., Donoghue H. D., Spigelman M., Greenblatt C. L., Bull I. D., Rothschild B. M.,

- Martin L. D., Minnikin D. E., Besra G. S., Mycobacterium tuberculosis Complex Lipid Virulence Factors Preserved in the 17,000-Year-Old Skeleton of an Extinct Bison, *Bison antiquus*, *Plos One* 2012, 7, e41923.
- Lendaro E., Ippoliti R., Bellelli A., Brunori M., Zito R., Citro G., Ascenzi A., On the Problem of Immunological Detection of Antigens in Skeletal Remains, *Am. J. Phys. Anthropol.* 1991, 86, 429–432.
- Lindfors E.-L., Lindström M., Iversen T., Polysaccharide degradation in waterlogged oak wood from the ancient warship Vasa, *Holzforschung* 2008, 62, 57–63.
- Liu J., Guo D. H., Zhou Y., Wu Z. Y., Li W. Y., Zhao F., Zheng X. M., Identification of ancient textiles from Yingpan, Xinjiang, by multiple analytical techniques, *J. Archaeol. Sci.* 2011, 38, 1763–1770.
- Liu J., Mouri C., Laursen R., Zhao F., Zhou Y., Li W. Y., Characterization of dyes in ancient textiles from Yingpan, Xinjiang, *J. Archaeol. Sci.* 2013, 40, 4444–4449.
- Lopez-Arce P., Zornoza-Indart A., Gomez-Villalba L., Perez-Monserrat E. M., de Buergo M. A., Vivar G., Fort R., Archaeological ceramic amphorae from underwater marine environments: Influence of firing temperature on salt crystallization decay, *J. Eur. Ceram. Soc.* 2013, 33, 2031–2042.
- Lourencon T. V., dos Santos P. S. B., Labidi J., Gatto D. A., Goncalves M. R. F., Wood under Fresh Water: Effect on the Chemical Properties and on Decay Resistance, *Maderas-Cienc Tecnol.* 2016, 18, 733–742.
- Lucejko J. J., La Nasa J., Porta F., Vanzetti A., Tanda G., Mangiaracina C. F., Corretti A., Colombini M. P., Ribechini E., Long-lasting ergot lipids as new biomarkers for assessing the presence of cereals and cereal products in archaeological vessels, *Sci. Rep.* 2018, 8, 3935.
- Lucero-Gomez P., Mathe C., Vieillescazes C., Bucio-Galindo L., Belio-Reyes I., Vega-Avina R., Archaeobotanic: HPLC Molecular Profiles for the Discrimination of Copals in Mesoamerica Application to the Study of Resin Materials from Objects of Aztec Offerings, *Archeosciences* 2014, 119–133.
- Lugli F., Di Rocco G., Vazzana A., Genovese F., Pinetti D., Cilli E., Carile M. C., Silvestrini S., Gabanini G., Arrighi S., Buti L., Bortolini E., Cipriani A., Figus C., Marciani G., Oxilia G., Romandini M., Sorrentino R., Sola M., Benazzi S., Enamel peptides reveal the sex of the Late Antique 'Lovers of Modena', *Sci. Rep.* 2019, 9, 13130.
- Maier M. S., Gomez B. A., Parera S. D., Elkin D., De Rosa H., Ciarlo N. C., Svoboda H., Characterization of cultural remains associated to a human skeleton found at the site HMS Swift (1770), *J. Mol. Struct.* 2010, 978, 191–194.
- Manhita A., Ferreira T., Candeias A., Dias C. B., Extracting natural dyes from wool-an evaluation of extraction methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 2011, 400, 1501–1514.
- Mantzouris D., Karapanagiotis I., Armenian cochineal (*Porphyrophora hamelii*) and purpurin-rich madder in ancient polychromy, *Color Technol.* 2015, 131, 370–373.
- Maritan L., Iacumin P., Zerboni A., Venturelli G., Dal Sasso G., Linseele V., Talamo S., Salvatori S., Usai D., Fish and salt: The successful recipe of White Nile Mesolithic hunter gatherer-fishers, *J. Archaeol. Sci.* 2018, 92, 48–62.
- Marom A., McCullagh J. S. O., Higham T. F. G., Sinitsyn A. A., Hedges R. E. M., Single amino acid radiocarbon dating of Upper Paleolithic modern humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2012, 109, 6878–6881.
- Maurer J., Mohring T., Rullkötter J., Nissenbaum A., Plant lipids and fossil hydrocarbons in embalming material of Roman Period mummies from the Dakhleh Oasis, Western Desert, Egypt, *J. Archaeol. Sci.* 2002, 29, 751–762.
- McCullagh J. S. O., Juchelka D., Hedges R. E. M., Analysis of amino acid C-13 abundance from human and

- faunal bone collagen using liquid chromatography/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 2761–2768.
- McCullagh J. S. O., Marom A., Hedges R. E. M., Radiocarbon Dating of Individual Amino Acids from Archaeological Bone Collagen, *Radiocarbon.* 2010, 52, 620–634.
- Miller M. J., Albarracín-Jordan J., Moore C., Capriles J. M., Chemical evidence for the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019, 116, 11207–11212.
- Mouri C., Mozaffarian V., Zhang X., Laursen R., Characterization of flavonols in plants used for textile dyeing and the significance of flavonol conjugates, *Dyes Pigments* 2014, 100, 135–141.
- Niemeyer H. M., Aguero C., Dyes used in pre-Hispanic textiles from the Middle and Late Intermediate periods of San Pedro de Atacama (northern Chile): new insights into patterns of exchange and mobility, *J. Archaeol. Sci.* 2015, 57, 14–23.
- Norbakhsh S., Bjurhager I., Almkvist G., Mimicking of the strength loss in the Vasa: model experiments with iron-impregnated recent oak, *Holzforschung* 2013, 67, 707–714.
- Nowik W., Marcinowska R., Kusiak K., Cardon D., Trojanowicz M., High performance liquid chromatography of slightly soluble brominated indigoids from Tyrian purple, *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1244–1252.
- O'Connell T. C., Hedges R. E. M., Isolation and isotopic analysis of individual amino acids from archaeological bone collagen: A new method using RP-HPLC, *Archaeometry* 2001, 43, 421–438.
- Passi S., Rothschild-Boros M. C., Fasella P., Nazzari M., Whitehouse D., An Application of High-Performance Liquid-Chromatography to Analysis of Lipids in Archaeological Samples, *J. Lipid Res.* 1981, 22, 778–784.
- Pauk V., Pluháček T., Havlíček V., Lemr K., Ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry procedure for analysis of monosaccharides from plant gum binders, *Anal. Chim. Acta* 2017, 989, 112–120.
- Pingitore G., Cerchiara T., Chidichimo G., Castriota M., Gattuso C., Marino D., Structural characterization of corrosion product layers on archaeological iron artifacts from Vigna Nuova, Crotone (Italy), *J. Cult. Herit.* 2015, 16, 372–376.
- Pollard A. M., Ditchfield P., McCullagh J. S. O., Allen T. G., Gibson M., Boston C., Clough S., Marquez-Grant N., Nicholson R. A., „These Boots Were Made For Walking”: The Isotopic Analysis of a C-4 Roman Inhumation From Gravesend, Kent, UK, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2011, 146, 446–456.
- Powis T. G., Murrieta E. G., Lesure R., Bravo R. L., Grivetti L., Kucera H., Gaikwad N. W., Prehispanic Use of Chili Peppers in Chiapas, Mexico, *PLoS One* 2013, 8, 79013.
- Preusz M., Triska J., Vrchotová N., Vilimek J., Enei F., Preusz K., Chemical profile of organic residues from ancient amphoras found in Pyrgi and Castrum Novum, Tyrrhenian Sea (Italy), *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2019, 24, 565–573.
- Redman J. E., Shaw M. J., Mallet A. I., Santos A. L., Roberts C. A., Gernaey A. M., Minnikin D. E., Mycosteroid acid biomarkers for the diagnosis of tuberculosis in the Coimbra Skeletal Collection, *Tuberculosis* 2009, 89, 267–277.
- Ribechini E., Perez-Arantegui J., Colombini M. P., Positive and negative-mode laser desorption/ionization-mass spectrometry (LDI-MS) for the detection of indigoids in archaeological purple, *J. Mass Spectrom.* 2013, 48, 384–391.

- Romanus K., Baeten J., Poblome J., Accardo S., Degryse P., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M., Wine and olive oil permeation in pitched and non-pitched ceramics: relation with results from archaeological amphorae from Sagalassos, Turkey, *J. Archaeol. Sci.* 2009, 36, 900–909.
- Romanus K., Poblome J., Verbeke K., Luybaerts A., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M., An evaluation of analytical and interpretative methodologies for the extraction and identification of lipids associated with pottery sherds from the site of Sagalassos, Turkey, *Archaeometry* 2007, 49, 729–747.
- Romanus K., Van Neer W., Marinova E., Verbeke K., Luybaerts A., Accardo S., Hermans I., Jacobs P., De Vos D., Waelkens M., Brassicaceae seed oil identified as illuminant in Nilotic shells from a first millennium AD Coptic church in Bawit, Egypt, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 783–793.
- Sabbioni C., Zappia G., Riontino C., Blanco-Varela M. T., Aguilera J., Puertas F., Van Balen K., Tombakari E. E., Atmospheric deterioration of ancient and modern hydraulic mortars, *Atmos. Environ.* 2001, 35, 539–548.
- Salanti A., Zoia L., Tolppa E. L., Giachi G., Orlandi M., Characterization of waterlogged wood by NMR and GPC techniques, *Microchem. J.* 2010, 95, 345–352.
- Saliu F., Degano I., Colombini M. P., Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2014, 1346, 78–87.
- Sanz E., Arteaga A., Garcia M. A., Camara C., Dietz C., Chromatographic analysis of indigo from Maya Blue by LC-DAD-QTOF, *J. Archaeol. Sci.* 2012, 39, 3516–3523.
- Smith R. K., Stacey R. J., Bergstrom E., Thomas-Oates J., Detection of opium alkaloids in a Cypriot base-ring juglet, *Analyst* 2018, 143, 5127–5136.
- Soleri D., Winter M., Bozarth S. R., Hurst W. J., Archaeological Residues and Recipes: Exploratory Testing for Evidence of Maize and Cacao Beverages in Postclassic Vessels from the Valley of Oaxaca, Mexico, *Lat. Am. Antiq.* 2013, 24, 345–362.
- Standish C., Dhuime B., Chapman R., Coath C., Hawkesworth C., Pike A., Solution and laser ablation MC-ICP-MS lead isotope analysis of gold, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 2013, 28, 217–225.
- Stevens S. M., Wolverson S., Venables B., Barker A., Seeley K. W., Adhikari P., Evaluation of microwave-assisted enzymatic digestion and tandem mass spectrometry for the identification of protein residues from an inorganic solid matrix: implications in archaeological research, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 396, 1491–1499.
- Surowiec I., Nowik W., Trojanowicz M., Identification of „insoluble“ red dyewoods by high performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-PDA) fingerprinting, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 209–216.
- Surup F., Narmani A., Wendt L., Pfitze S., Kretz R., Becker K., Menbrives C., Giosa A., Elliott M., Petit C., Rohde M., Stadler M., Identification of fungal fossils and novel azaphilone pigments in ancient carbonised specimens of *Hypoxylon fragiforme* from forest soils of Chatillon-sur-Seine (Burgundy), *Fungal Divers.* 2018, 92, 345–356.
- Swinson D., Snaith J., Buckberry J., Brickley M., High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Investigation of Gout in Palaeopathology, *Int. J. Osteoarchaeol.* 2010, 20, 135–143.
- Teodor E. D., Litescu S. C., Neacsu A., Truica G., Albu C., Analytical methods to differentiate Romanian amber

- and Baltic amber for archaeological applications, *Cent. Eur. J. Chem.* 2009, 7, 560–568.
- Tripp J. A., McCullagh J. S. O., Hedges R. E. M., Pre-parative separation of underivatized amino acids for compound-specific stable isotope analysis and radio-carbon dating of hydrolyzed bone collagen, *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 41–48.
- Truica G. I., Teodor E. D., Litescu S. C., Radu G. L., LC-MS and FT-IR characterization of amber artifacts, *Cent. Eur. J. Chem.* 2012, 10, 1882–1889.
- Valianou L., Karapanagiotis I., Chrysoulakis Y., Comparison of extraction methods for the analysis of natural dyes in historical textiles by high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 395, 2175–2189.
- Van Elslande E., Guérineau V., Thirioux V., Richard G., Richardin P., Laprevote O., Hussler G., Walter P., Analysis of ancient Greco-Roman cosmetic materials using laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 1873–1879.
- Vanden Berghe I., Gleba M., Mannering U., Towards the identification of dyestuffs in Early Iron Age Scandinavian peat bog textiles, *J. Archaeol. Sci.* 2009, 36, 1910–1921.
- Wadsworth C., Buckley M., Proteome degradation in fossils: investigating the longevity of protein survival in ancient bone, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2014, 28, 605–615.
- Wallert A., Boytner R., Dyes from the Tumilaca and Chiribaya cultures, south coast of Peru, *J. Archaeol. Sci.* 1996, 23, 853–861.
- Wooding M., Bradfield J., Maharaj V., Koot D., Wadley L., Prinsloo L., Lombard M., Potential for identifying plant-based toxins on San hunter-gatherer arrowheads, *S. Afr. J. Sci.* 2017, 113, 2016–0210.
- Zareva S., Kuleff I., The application of the derivative IR-spectroscopy and HPLC-ESI-MS/MS in the analysis of archaeology resin, *Spectrochim. Acta A* 2010, 76, 283–286.
- Zhang X., Laursen R. A., Development of Mild Extraction Methods for the Analysis of Natural Dyes in Textiles of Historical Interest Using LC-Diode Array Detector-MS, *Anal. Chem.* 2005, 77, 2022–2025.
- Zhang X., Good I., Laursen R., Characterization of dyestuffs in ancient textiles from Xinjiang, *J. Archaeol. Sci.* 2008, 35, 1095–1103.

3.2.3 Metody elektrochemické

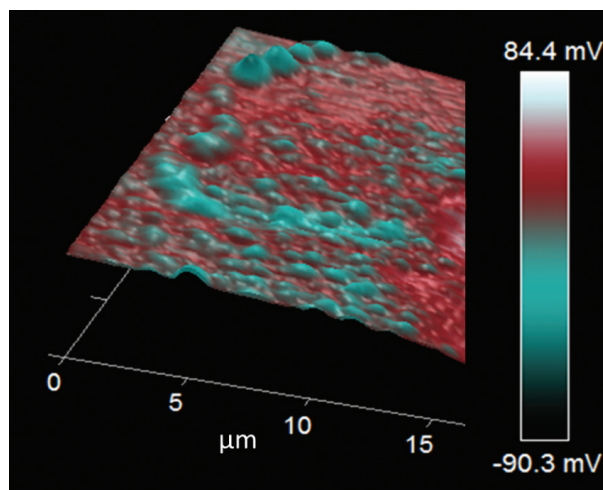
Lukáš Kučera, Lukáš Richtera

K analytickým metodám patří nedílně metody elektrochemické. Můžeme je dělit na **metody pracující bez měřitelného proudu** (např. potenciometrie) a **metody využívající proudu, který je vkládán nebo měřen** (např. voltametrie, coulometrie, amperometrie a elektrogravimetrie) (Harvey, 1950). Potenciometrické metody jsou používány rutinně v běžných laboratořích pro měření pH, koncentrací některých ionů a k dalším úkolům. Některé jsou zmíněny v kapitole 3.1.2. Tato kapitola chce informace doplnit o metody voltametrické a jejich miniaturizované (mikroskopické) varianty, které jsou vhodné pro mikroinvasivní postupy. Elektrochemické metody lze použít na výzkum původu vzorku nebo jeho částí. Konkrétním příkladem může být použití SWV (**Square wave voltametrie**) pro určení původu indiga z malby na klenbě ve španělském kostele ze 16. století v Santiago Apostolo v Jumille (Edwards a Vandenabeele, 2012). V rámci experimentu byly technikou SWV změřeny roztoky indiga z rostlin *Indigofera tinctoria* a *Isatis tinctoria*. Profily voltamogramů (poměry dvou dominantních signálů a vliv některých minoritních složek vzorku na tvar voltamogramů) indiga z *Isatis tinctoria* a z odebraného vzorku se shodovaly, což je ve shodě s písemnými prameny dokládajícími pěstování *Isatis tinctoria* v regionu Jumilla v minulosti. Autoři Doménech a kol. (2006) využili elektrochemii k analýze mayského modrého pigmentu, který je popisován jako anorganicko-organický pigment složený z minerálu palygorskitu, jílových minerálů a indiga. Tento pigment je hojně využíván v předkolumbovském období ve Střední Americe. Analýza byla zaměřena na sledování obsahu dehydroindiga, jenž je odvislý od způsobu přípravy pigmentu. Zejména významný vliv má zvýšení teploty v průběhu drcení a mletí (Doménech a kol., 2006). Vzhledem k práci s autentickými a velmi cennými materiály je důležitým parametrem velikost vzorku, resp. části vzorku, která je analýzou ovlivněna. Miniaturizací velikosti měřicí sondy je možno tento parametr významně redukovat. Zajímavě se v tomto ohledu jeví využití **elektrochemické skenovací mikroskopie** (SECM). Autoři Liu a kol. (2020) ji využili při analýze mezikrystalové koroze u archeologických stříbrných artefaktů. Mezikrystalová koroze vzniká hlavně z důvodu heterogenity materiálu způsobené rozdílnou krystalizací jednotlivých složek (např. Cu a Ag ve slitině), na což poukazují výsledky rozdílné elektrochemické aktivity v těchto oblastech. Autoři dále sledovali vznik mezikrystalové koroze při kontaktu stříbrného artefaktu s K_2SO_4 a KCl. Zajímavým zjištěním byla přítomnost chloridových iontů, která výrazně snižuje možnost vzniku koroze (snížení potenciálu) oproti síranovým iontům, kde je tento efekt opačný (Li a kol., 2020). Dalším příkladem „mikroelektrochemie“ může být **elektrochemický mód u mikroskopu atomár-**

ních sil (resp. spojení s Kelvinovou sondou, AFM-KPFM), kde měření rozdílného potenciálu na povrchu objektů dokáže ukázat distribuci jednotlivých komponent. Běžné rozlišení této techniky se pohybuje v nanometrech. Analýza mincovního materiálu je zaměřena zejména na měření povrchů, čímž nedojde k poškození studovaného materiálu. Tyto výsledky (bez ohledu na použitou metodu) mohou být ovšem velmi často ovlivněny úpravou povrchu mincí ve středověku (proces bělení – cílené obohacení svrchní stříbrné vrstvy vymýváním mědi roztokem vinanu draselného). Výsledky z měření na povrchu mince pomocí XRF uvedené v kapitole 3.2.1.2 ukázaly ryzost 51,8% Ag a pomocí SEM/EDS dokonce 95,6% Ag. Pro stanovení originální ryzosti mince je potřeba proměřit i vnitřní části mince (nábrusu). Náš autorský kolektiv (Kučera a kol., 2018) využil AFM-KPFM pro určení originální ryzosti (tedy ryzosti v době ražby) u středověkého širokého feniku z 12. století. Měření AFM-KPFM umožnilo stanovit morfologii jádra mince a významně přispělo k popisu obsahu a distribuce dvou hlavních kovů (Ag, Cu, **obrázek 3-23**), jejichž obsah na základě distribuce v ploše byl přibližně 31% stříbra a 69% Cu (při předpokladu, že se jedná pouze o binární slitinu) (Kučera a kol., 2018).

V archeologickém výzkumu je velmi často potřebné studované předměty nějakým způsobem datovat. Scholtz a kol. navrhli využití voltametrie, respektive **voltametrie imobilizovaných mikročastic** (VIMP), pro datování keramických materiálů. Principem metody je studium elektrokatalytické reakce materiálu přichyceného ke grafitové elektrodě impregnované parafinem za uvolňování kyslíku ve vodně-alkalickém prostředí (OER, oxygen evolution reaction). Základní myšlenkou metody je, že poškození způsobené v keramických předmětech kosmickým zářením a jinými zdroji vede k tvorbě vadných míst v keramice, která následně

Obrázek 3-23 AFM-KPFM měření nábrusu středověkého feniku (modrozelená oblast – stříbro, červená oblast – měď)



působí jako katalytická centra pro OER. Čím starší vzorek byl, tím vyšší je **potenciál pro OER** (Scholtz a kol., 1995; Scholtz a kol., 1989). Další elektrochemická datovací metoda je založena na studiu patiny u měděných a bronzových artefaktů. Koroze těchto předmětů vede v prvním kroku ke vzniku patiny tvořené hlavně kupritem (Cu_2O), která následně přechází na sekundární patinu, která je již silně závislá na okolním prostředí. V případě, že je daný artefakt v kontaktu s atmosférou bohatou na CO_2 a/nebo vápenným materiálem, dochází k částečné oxidaci kupritu na tenorit (CuO). Obě tyto látky dávají při voltametii dobře odlišené pásy. Pokud nebude povrch předmětu postižen jinými korozními mechanismy, tak poměr **signálů tenorit:kuprit bude postupně narůstat se stářím vzorku, resp. dobou koroze** (Doménech-Carbo a kol., 2014).

Literatura

- Doménech-Carbó A., Doménech-Carbó M. T., Capelo S., Pasías T., Martínez-Lázaro I., Dating archaeological copper/bronze artifacts using the voltammetry of microparticles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 9262–9266.
- Doménech A., Doménech-Carbó M. T., Vázquez de Agredos Pascual M. L., Dehydroindigo: A New Piece into the Maya Blue Puzzle from the Voltammetry of Microparticles Approach, *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 6027–6039.
- Edwards, H. G. M., Vandenabeele, P. Analytical Archaeometry. In: Edwards Howell a Peter Vandenabeele, ed. *Analytical Archaeometry: Selected Topics*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2012 (ISBN 978-1-84973-162-1).
- Harvey D., Analytical Chemistry, *Manuf. Chem. Aerosol. News.* 1950, 21, 256–258.
- Kučera L., Richtera L., Zmrzlý M., Jarošová M., Kučerová P., Bednář P., Determination of the Fineness of Medieval Coins—Evaluation of Methods in a Case Study of a Medieval Pfennig, *Archaeometry* 2018, 60, 325–341.
- Liu S., Shi M., Zhou Y., Li R., Xie Z., Hu D., Zhang M., Hu G., Scanning electrochemical cell microscopy: A powerful method to study the intergranular corrosion of archaeological silver artifacts. *J. Cult. Herit.* 2020, 46, 176–183.
- Scholz F., Nitschke L., Henrion G., A new procedure for fast electrochemical analysis of solid materials, *Sci. Nat.* 1989, 76, 71–72.
- Scholz F., Schröder U., Meyer S., Brainina K. Z., Zakhar-chuk N. F., Sobolev N. V., Kozmenko O. A. The electrochemical response of radiation defects of non-conducting materials an electrochemical access to age determinations, *J. Electroanal. Chem.* 1995, 385, 139–142.

4

Analýza (bio)makromolekul v archeologických nálezech a problémy kontaminace nálezů

Jaroslav Pavelka

4.1 Archeogenetika

Archeogenetika⁸ je dynamicky se rozvíjejícím oborem. Sám termín navrhl archeolog Colin Renfrew (Sokal, 2001). Jedná se o důležitou součást širších studií mnoha různých oblastí lidské minulosti, ale zahrnuje i obory a studie týkající se evoluce zvířat, rostlin, patogenů a domestikace (Bouwman a Rühli, 2016). V ideálním případě by se archeogenetická data měla stát pramenem informací o událostech v minulosti a doplňovat se s dalšími obory, jako je archeologie, archeozoologie, lingvistika, palynologie, paleontologie a chemie. Součástí archeogenetických metod jsou extrakce a sekvenace historické (ancient) DNA (aDNA) z různých organických zbytků a archeologických nálezů, ale také studium současných populací, protože jejich genetická výbava je dědictvím předků, o kterých tak lze díky tomu vyčíst další informace. Obě metody poznání minulosti se mohou doplňovat, ale jejich výsledky také nemusí vůbec souviset. Po některých dávných populacích nemusely zbýt v současných populacích zaznamenané genetické stopy. Stejně tak aDNA získaná z nálezů zatím podává velmi omezené a někdy nahodilé soubory dat. Nedávnou dobu poznamenaly spory o věrohodnost výsledků (Rizzi

⁸ Genetika – se zabývá studiem genů a vysvětluje, co jsou a jak fungují, také určuje, které vlastnosti se dědí a jak se předávají do dalších generací. Gen – sekvence nukleotidů v DNA (deoxyribonukleová kyselina), nebo v RNA (ribonukleová kyselina), DNA – molekula složená ze dvou řetězců, které jsou spojené a vytváří dvojitou šroubovici nesoucí informace pro fungování, vývoj, růst a reprodukci všech známých organismů, a podobně nukleové kyseliny fungují i u mnoha virů. DNA se skládá z jednotek zvaných nukleotidy, každý nukleotid je složen z cukru deoxyribózy, fosfátové skupiny a jedné ze čtyř nukleových bází, což může být adenin A, guanin G, cytosin C nebo thymín T. DNA sekvenování (čtení DNA, DNA sequencing) – je proces stanovení sekvence nukleové kyseliny, tedy pořadí nukleotidových bází – adeninu, guaninu, cytosinu a thyminu. Sekvence DNA jsou klíčové pro lékařskou diagnostiku, např. typ rakoviny nebo biologický výzkum mnoha oborů.

a kol., 2012), protože zvláště u lidských vzorků mohla současná DNA samotných archeologů (ale nejen jich), kontaminovat původní aDNA. Avšak metodika od té doby výrazně pokročila a výzkum aDNA se stává spolehlivým zdrojem informací (Rizzi a kol., 2012). S novými technologiemi je možno studovat evoluční procesy, testovat modely populační genetiky a paleoekologické změny. Zejména metody sekvenování DNA nové generace dokáží odlišit původní DNA od kontaminací. Ale zdaleka ne vše je v případě aDNA vyřešeno. Pokud není tkáň kontinuálně zamrzlá v ledu, DNA časem degraduje, rozpadá se do stále menších kusů. Sekvenování je tak omezeno na krátké úseky, které se zachovaly a dají se „přečíst“. Výhodou je, že za příznivých podmínek se jednotlivé úseky překrývají a lze tak „přečíst“ i delší úseky DNA.

Původní a tradiční metodologie se zakládala na třech krocích:

- a) PCR (polymerázová řetězová reakce, z angl. Polymerase Chain Reaction, je metoda rychlého zmnožení úseku DNA); dochází k namnožení několika krátkých a překrývajících se cílových fragmentů (60–200 párů bazí dlouhých) za účelem identifikace delších sekvencí DNA.
- b) Produkce a sekvenování několika klonů pro každý amplifikovaný fragment. DNA určitého organismu je třeba po fragmentech vložit do bakterií (každý bakteriální klon nese jeden fragment), a tak vznikne genomová či DNA knihovna. Tyto klony je potřeba podle nějakého klíče sekvenovat. Překrývání těchto fragmentů většinou umožňuje „přečíst“ delší úseky DNA. Pro aDNA se nejdříve namnoží pomocí PCR určité fragmenty, ty však mohou být z více zdrojů, původní aDNA i současná kontaminace od nálezců. Do jednotlivé bakterie je však možno vložit jen jeden fragment. Když se pak sekvenuje více zdánlivě totožných klonů, můžeme dostat odlišné sekvence. Někdy je možné rozlišit, která sekvence je z aDNA a která z recentní DNA, ale to závisí na konkrétních případech.
- c) Zarovnání a porovnání sekvencí z různých klonů a různých překrývajících se fragmentů za účelem rekonstrukce konečné konsenzuální sekvence celé oblasti zájmu (viz Rizzi a kol., 2012).

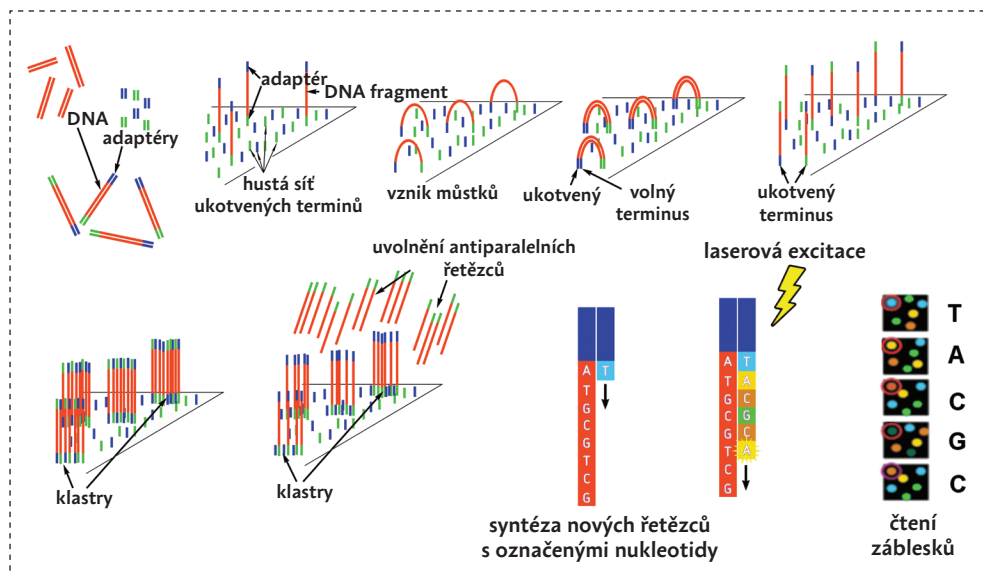
Pomocí tohoto protokolu od Kringse a kol. (1997) se povedlo první přečtení DNA z *Homo sapiens neanderthalensis*, ale pouze na úrovni mitochondriální DNA (mtDNA). V dalších letech byly téměř všechny studie aDNA založeny na mtDNA.

Zásadní zlom nastává s příchodem nových metod nazvaných „sekvenování nové generace“ (next generation sequencing). Takto nazýváme metody, které oproti starším metodám (Sangerovo sekvenování) **umožňují sekvenovat relativně velká množství řetězců DNA naráz a získat značné sumy dat**. Metody jsou

založeny na různých principech, převažuje využití PCR, ale v sofistikovanějších formách. Při použití těchto metod je DNA rozbita na fragmenty, pak je současně odděleně po fragmentech namnožena a následně je velké množství těchto fragmentů současně – paralelně – sekvenováno. Zpracována musí být velká množství takto získaných dat, protože se současně sekvenují až milióny různých fragmentů. Pro jednotlivé metody byl proto vytvořen příslušný software. Z řady metod je v současné době asi nejvíce využívána Illumina (Solexa), kde amplifikace DNA probíhá na destičce, na které se každý vhodně upravený a specificky dlouhý fragment množí pomocí můstkové metody. Nejdříve se fragmenty spojí ligací s dalšími uměle připravenými fragmenty, kterým odpovídají sekvence na destičce (vznik tzv. konstruktů). Konstrukty se pak spojí s odpovídajícími konci na destičce a při PCR množení vytváří obloukovité (můstkové) struktury, podle kterých byl proces nazván jako můstková PCR (**obrázek 4-1**). Sekvenování probíhá zaznamenáváním fluorescenčních záblesků na mnoha místech na destičce současně. Každý nově se začleňující nukleotid totiž nese vlastní značku, kterou je fluorofor, a tak se při současném nasednutí příslušné nukleové báze, např. adeninu, v jednom místě na mnoha kopiích původního fragmentu objeví záblesk určité barvy. Pro každou nukleovou bázi je použit jiný fluorofor a vzniká tak záblesk jiné barvy. Každý z mnoha fragmentů má svoji pozici na destičce, a tak jsou současně pomocí záznamového zařízení pro záblesky čteny jednotlivé fragmenty DNA. K aktivaci záblesků dochází pomocí laserové excitace značek na nukleotidech, záblesky jsou zaznamenány spektrofotometrem a vyhodnoceny. Každý cyklus vytváří čtyři obrazy, které zachycují emitovaná světla klastrů DNA ve čtyřech pásmech vlnové délky (Vaya a kol., 2010). Aby byl snížen počet chyb, dochází k různým korekcím, které vylepšují záznam signálů. Je to zejména barevný překryv emisních spekter čtyř barviv (**obrázek 4-1**). Vytvářením vhodných značek a jejich buzením při vhodných vlnových délkách se zabývaly starší práce dávno před vznikem prvního přístroje Illumina (Solexa), např. Li a Speed (1999).

Jako metody třetí generace se označují takové, kde je už bez PCR množení sekvenována jedna dlouhá molekula DNA v reálném čase. První metodou z této skupiny je sekvenování jedné molekuly v reálném čase (s česky poněkud morbidně znějící zkratkou SMRT, z angl. single-molecule real-time sequencing), druhá je nanopórové sekvenování,⁹ které dokáže sekvenovat v zařízení asi 10 cm dlouhém připojeném na notebook (**obrázek 4-2**).

⁹ Při nanopórovém sekvenování na přístroji MinION se využívá nanopórů, tedy velmi úzkých otvorů. DNA prochází skrze nanopór (nanometr = 10^{-9} m) v tenké nanomembráně. Tím, jak molekula proniká skrze nanopór, dochází ke změně elektrického proudu mezi elektrodami umístěnými v elektrolytu na obou stranách membrány. Každý ze čtyř nukleotidů ovlivňuje odlišným způsobem transport iontů v elektrolytu a tedy i proud (procházející) mezi elektrodami. Podle těchto změn je možno určit jednotlivé nukleotidy. Vyhodnocení provádí připojený PC s příslušným programem. První prototypy ale správně četly pouze 60–85 % testované DNA, novější přístroje už zvládají čtení s 95–99 % přesností. To



Obrázek 4-1 Schéma metody Illumina

Obrázek 4-2 Zařízení Nanopore MinION od Oxford Nanopore Technologies (Oxford, Velká Británie) napojený na standardní notebook (www.medgadget.com, detaily viz literatura)



už je únosné, stejně jako délka přečtené molekuly, podařilo se přečíst rekordní fragment o délce 79 000 bází. Přijatelná je také cena. Sekvenátory Illumina sice mají přesnost 99,9%, ale cenu kolem 1 milionu dolarů. Sekvenátory MinION stojí kolem 1 000 dolarů. Dalším příslušenstvím jsou vlastní články obsahující matici s nanopóry (těch je na matici cca 2 000) a jejich cena se pohybuje mezi 500 a 900 dolary, podle počtu zakoupených kusů.

Budoucnost bude jistě přát miniaturizaci a takové zařízení může být pro výzkum v terénu neocenitelnou pomůckou, samozřejmě nejen pro nativní vzorky z přírody, ale i pro archeogenetiku a paleogenetiku. Je známo, že aDNA se jakýmkoliv dalším ošetřením vzorků ničí, případně kontaminuje současnou DNA. Dobře provedené odebrání vzorku a zpracování okamžitě po nálezů je proto klíčové a poskytuje lepší výsledky než odběr z materiálu v laboratoři.

Metody nových generací jsou využitelné pro archeogenetiku v poměrně široké míře, například pro analýzy SNP (single nucleotide polymorphism). SNP, česky bychom asi mohli říci jednonukleotidový polymorfismus, pracuje s odlišností jednoho konkrétního nukleotidu na určité pozici chromozómu. Variabilita v těchto nukleotidech může, podle pozice, přispívat např. k různě velkým náchylnostem ke genetickým nemocem, či k odlišné expresivitě stejných genů u různých jedinců. SNP je možné využívat i na více chromozomech a porovnávat celé genomy. V případě většího množství vzorků je možné najít rozdíly mezi konkrétními populacemi. Tento postup představuje odlišný způsob porovnávání populací oproti práci s mitochondriální DNA a chromozomem Y, kde se sledovaly jen ženské nebo jen mužské linie. Zde se mohou sledovat kombinující se genomy uvnitř populací. Také se sleduje řádově větší množství markerů, často desítky tisíc. SNP samozřejmě nejsou jediným zdrojem variability genomu téhož druhu, ale pomocí nových metod sekvenování se dají, na rozdíl od jiných odlišností, dobře identifikovat. Wutke a Ludwig (2019) představili vylepšenou metodiku, kde se multiplex PCR, který v tomto případě amplifikuje pouze krátké úseky, kombinuje se sekvenováním nové generace. Jde patrně o lepší postup, než je použití pouze jedné ze sekvenačních metod nové generace. Autoři svou metodiku prezentují jako vhodnou pro generování dat z velkých souborů, ze špatně konzervovaných vzorků, jako jsou fosilní zbytky, forenzní stopy a muzejní exponáty. Tento přístup by měl být poměrně nízkonákladový, rychlý a použitelný pro forenzní genetiku, populační genetiku a fylogenetické výzkumné otázky.

4.2 Haploskupiny v archeogenetice

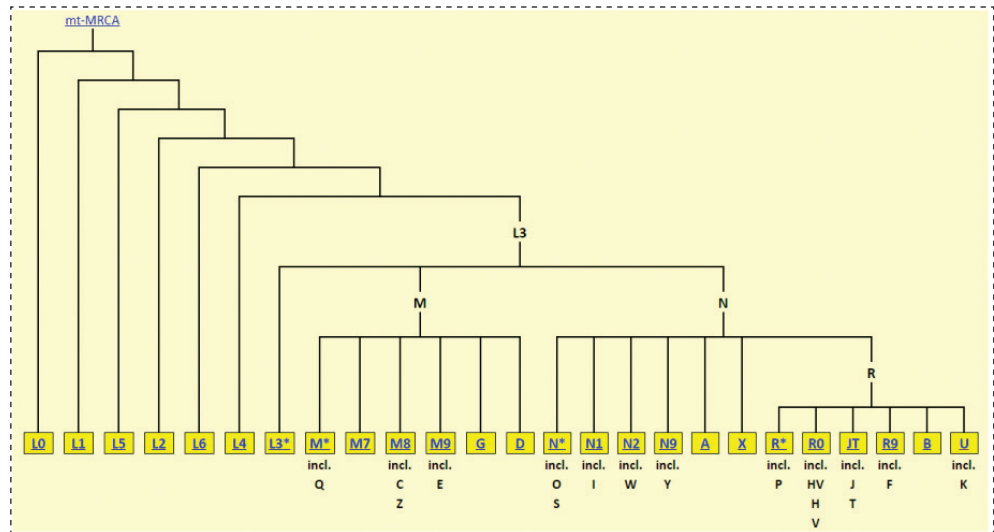
Výzkum v této oblasti započal již v době, kdy ještě metody sekvenování nové generace neexistovaly. V současné době se stále analyzují kratší úseky, které mají svou vypovídací hodnotu. Cílem je mapovat původ a posuny lidských populací na základě dnes existujících populací a tyto údaje promítat určitým způsobem do minulosti. Výzkum tohoto typu se soustřeďoval na recentní populace, kde je možno využít poměrně velkých vzorků, ale obvykle nevyužíval aDNA, nebo jen v omezené míře, což už se naštěstí změnilo. **Z dnešních populací lze získat hod-**

ně informací o předcích v současné době žijících lidí, ale zničené, nebo silně překryté dávné populace se nemusí podařit detekovat vůbec. Avšak pohled na minulost přes velké, v současnosti existující populace, také nemusí pomoci zachytit události z minulosti z menších oblastí. Toho může být příkladem analýza aDNA pocházející z 13 jedinců z oblasti dnešního Libanonu (z období mezi 3. až 13. stol.n.l.). Zde se právě uplatnil moderní přístup založený na SNP analýze dat z celého genomu, ne pouze SNP z chromozómu Y a části genomu mitochondriální DNA (mtDNA), jak bylo běžné v minulých letech. Tímto způsobem je možno podrobně genomy charakterizovat a porovnat je s dalšími. Kupříkladu se zjistí, že rozložení SNP určitého člověka odpovídá populaci ve Španělsku. Ze zmiňovaného libanonského souboru je zajímavých 9 křížáků z masového hrobu z třináctého století. Všechny ostatky jsou mužské, ale někteří pohřbení jedinci byli západní Evropané různého původu, jiní byli místní (geneticky nerozeznatelní od současných Libanonců) a dva jednotlivci byli směsicí evropských a blízkovýchodních předků. Tato zjištění poskytovala přímý důkaz, že **křížáci zanechali potomky s ženami v místní populaci.** Stopy křížení s Evropany nejsou dnes v žádné libanonské skupině významné, dokonce i libanonští křesťané jsou dnes geneticky podobní místním lidem, kteří zde žili během římského období, čtyři století před křížovými výpravami (Haber a kol., 2019a). V současné populaci Libanonu tedy už nelze potvrdit nějakou výraznou „příměs“ Evropanů, a tím spíše nelze konkrétně určit, že se tam někdy vyskytovali potomci křížáků. Bez analýzy aDNA tedy některé události vůbec nelze určit. Dá se říci, že analýzy DNA ze současných lidí mohou odhalit dávné velké populační posuny, ale nikoliv menší události, i když třeba kulturně, vojensky a politicky významné. Do následujícího přehledu v dalších kapitolách jsou už zahrnuty i současné práce, které aDNA využívají.

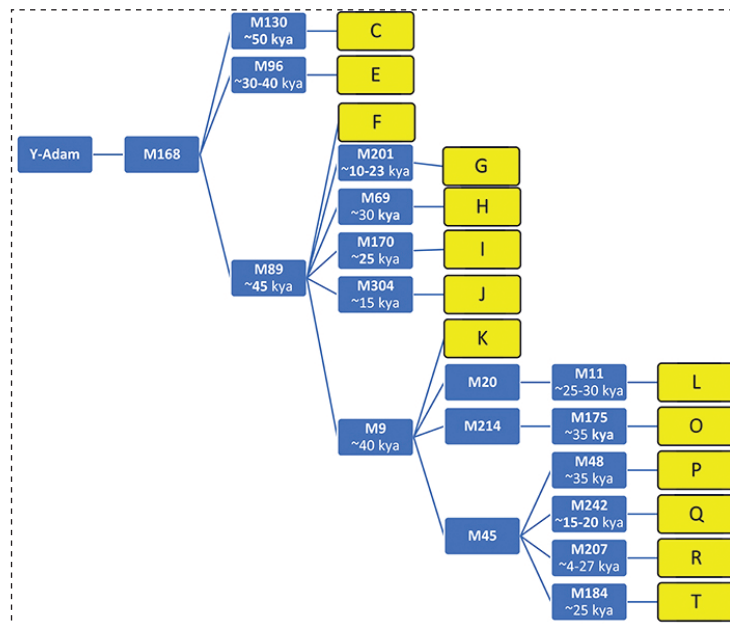
Pro způsob mapování migrací lidských populací se využívaly a dosud využívají specifické haploskupiny. Obecně se jako haploskupina označuje určitá skupina alel na různých místech stejného chromozomu, které se dědí společně. Pro analýzy populací se v nedávné minulosti pro ženskou linii používaly skupiny alel – v tomto případě šlo spíše o specifickou sekvenci na mtDNA (**obrázek 4-3**). V případě mužské linie jsou jednotlivé haploskupiny definovány SNP markery na chromozomu Y, který se předává jen po mužské linii (**obrázek 4-4**). SNP zde lze využívat pro porovnávání chromozomů Y mezi sebou.

4.2.1 Ženská linie: mtDNA

V případě mtDNA se sleduje jeden konkrétní úsek, o kterém se předpokládá, že už nekóduje žádnou informaci, ani pro protein, ani pro RNA, ani pro nějakou regulaci. To není nijak překvapivé, řadu genů pro mitochondriální proteiny převzalo jádro. Sledovaný úsek tedy náhodně kumuluje mutace, které se nijak nepromítají



Obrázek 4-3 Komplexní fylogenetický strom lidských variant mitochondriální DNA, každá skupina má řadu podskupin (L0, L1...), pro podrobnosti je nutno otevřít příslušný odkaz, <http://www.phylotree.org/tree/index.htm> (van Oven a Kayser, 2009).



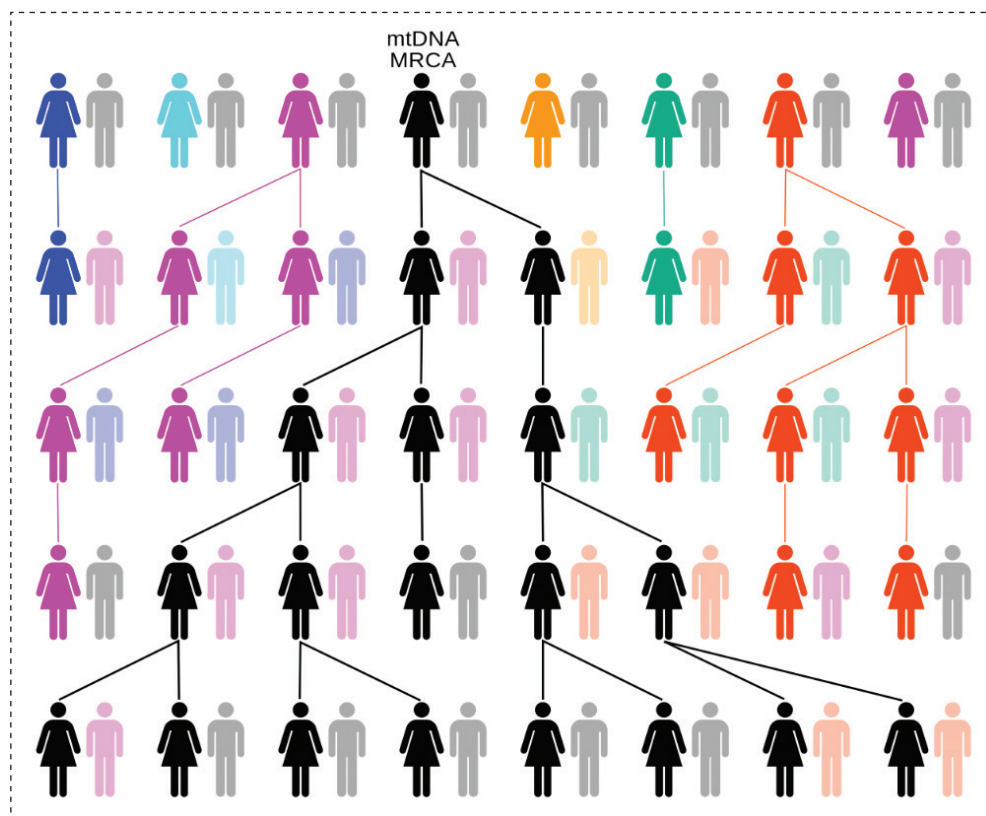
Obrázek 4-4 Čtrnáct hlavních haploskupin chromozomu Y (i zde existuje velké množství podskupin, které pro přehlednost nejsou uvedeny), schéma obsahuje i alternativní názvy haploskupin a přibližnou dobu vzniku (kya – tisíce let zpět od současnosti) (Smolenyak a Turner, 2004; Wells, 2007; Mahal a Matsoukas, 2018). Podrobnosti je možno dohledat na SOGG (International Society of Genetic Genealogy) <http://isogg.org/tree/index.html>.

do životaschopnosti nositele, proto se jedná o vhodnou část DNA, která je použitelná jako marker pro stopování rozdílů mezi populacemi a pátrání po tom, jak se která skupina oddělila od původní. **Mitochondriální DNA má nepopíratelnou výhodu v tom, že prochází přes generace pouze po ženské linii a dědí se z matky na potomky a jen dcery ji zas přenášejí dál.** Nedochází tedy k výměnám genetické informace jako u jaderné DNA, kde se uplatňují chromozomy od obou rodičů, a také mezi chromozomy původně od matky a otce dochází k výměnám chromatid.

Pomocí mtDNA se podařilo vystopovat původ ženské linie v Africe a její šíření z Afriky do celého světa. V kořeni všech těchto skupin je jedna hypotetická žena (tzv. „mitochondriální Eva“). Tato žena je proto označovaná i jako „most recent common ancestor“ (MRCA), nebo „last common ancestor“ (LCA) (případně concestor), tedy „poslední společný předek“. Je to proto, že se po mitochondriální linii jedná o společného předka všech současných lidí. To samozřejmě neznamená, že žila jen ona, ale pouze její mitochondriální linie přežila, zanechala potomky, zatímco linie žen, které žily ve stejné době, byly přerušeny – například tím, že v průběhu času měly ženy z těchto linií pouze syny, nikoliv dcery, které by mitochondriální DNA přenesly do dalších generací. Jaderná DNA žen z těchto linií však pokračovala normálně dál (**obrázek 4-5**).

Připomeňme si zde zásadní poznatky na tomto poli. **Mitochondriální Eva nesla mitochondriální haploskupinu označenou L** (Behar a kol., 2008), vyskytly se však problémy s datací stáří této haploskupiny, protože z genetických dat není snadné určit dobu jejího vzniku. Jednou z nejčastějších metod odhadu pro datování mitochondriální Evy i pro vznik různých haploskupin byla kumulace mutací v čase. V tomto případě se předpokládala substituce nukleotidových bází s frekvencí $1,26 \times 10^{-8}$ substituce na nukleotid za rok (Mishmar a kol., 2003). Substituce znamená náhradu a v tomto případě označuje situaci, kdy díky mutacím je třeba adenin v DNA řetězci nahrazen po určité době cytosinem. Tato mutační rychlost ale předpokládá lineární vztah mezi nahromaděním substitučních mutací a uplynulým časem. Uvedený předpoklad však nemusí být zcela přesný, někdy se mutace mohou vytvářet rychleji a jindy pomaleji, také různé úseky genomu podléhají mutačním změnám odlišně. Proto se objevily pokusy o kalibraci dat na základě archeologické datace příchodu některých lidských skupin na nové lokality: Kanárské ostrovy, Oceánie, expanze lidí v Americe, osídlování Evropy po posledním zalednění (Soares a kol., 2009), které měly datace zpřesnit. I přes tyto snahy je nutno počítat jen s odhady a možnými nepřesnostmi. **Stáří mitochondriální Evy, a tedy i haploskupiny L se odhaduje na 99–148 tisíc let** (Poznik a kol., 2013). Zvláště u starších prací se však můžeme setkat i s odhady sahajícími do ještě vzdálenější minulosti. Geografické místo výskytu a migrací haploskupin se určuje

mnohem přesněji než časové období jejich vzniku. Místo se stanovuje na základě postupu a diverzifikace jednotlivých linií, které mají živé nositele, případně jsou určeny z archeologických nálezů na daném území. Lokalitou vzniku haploskupiny L, tedy oblastí, kde žila hypotetická mitochondriální Eva, je východní Afrika (Gonder a kol., 2007). Od skupiny L se odštěpily dvě skupiny: L0 a L1-6; obě tyto skupiny se v průběhu času větvaly – a přibývaly v nich nové mutace. Skupina L0 zahrnuje nejstarší podtřídy L0d a L0k, které se obě vyskytují téměř výhradně mezi Khoisany v jižní Africe, ale také omezeně v Tanzanii (Tishkoff a kol., 2007). Jedná se tedy o nejstarobylější současné geneticky definované lidské skupiny. Patří mezi ně zejména známí Sanové (Kungové, Křováci, Khwe, Sho, Basarwa), což jsou původní obyvatelé jižní Afriky a dodnes se vyskytují v Mosambiku, Lesothu, Zimbabwe, Botswaně, Svazijsku, Angole a Namibii. Byli do značné míry vytlačeni a překryti bantuskými kmeny a později i bělochy. Podařilo se jim přežít jen v pustých oblastech, například v poušti Kalahari. Patří do khoisanské jazykové



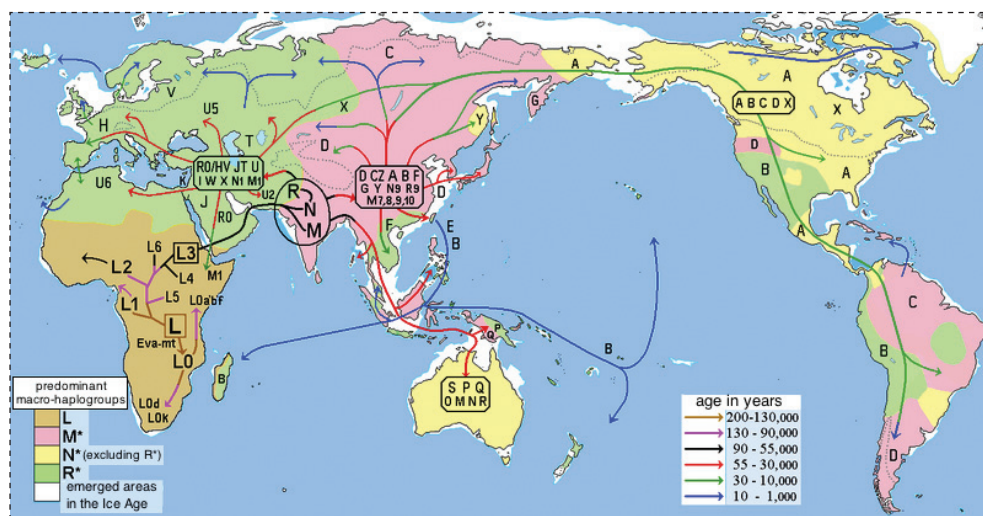
Obrázek 4-5

Linie vedoucí zpět k „mitochondriální Evě“ (zánik některých linií v každé generaci je způsoben náhodným driftem nebo výběrem. V příkladu je jen pět generací, barevné figurky představují vyhynulé matrilineální linie a černá matrilineální linie, která pochází z mtDNA MRCA).

skupiny a části se stále daří žít původním sběračsko-loveckým způsobem života, i když mnozí byli donuceni k přechodu na zemědělství.

Na tomto místě by bylo vhodné doplnit, jak se haploskupiny označují. **Hlavní klady (větve), se tradičně nazývají „haploskupiny“ a označují se velkými latinskými písmeny (např. H, J atd.). Odvozené subklady se označují střídáním kladných celých čísel a malých latinských písmen (např. J2, J1a, J1b1, atd.).** Pokud nejsou superklady (makroskupiny) označeny jediným písmenem (např. M nebo N), jsou označeny zřetěžením názvů kladů (např. HV), a pokud se míní další nadřazená vrstva, která tyto klady obsahuje a už nenese nějaké pojmenování, označuje se předponou „pre-“, např. pre-HV (Richards a kol., 2000).

Haploskupiny L1–6 se oddělily od haploskupiny L0 („Khoisanů“) odhadem po 20 000 letech (Soares a kol., 2009). Ještě nediferencovaná haploskupina L1–6 byla nalezena u neandrtálců na Kavkaze a na Altaji (Ferreira a kol., 2018). To by mohlo souviset s migracemi z Afriky a míšením se staršími populacemi. Po těchto migracích už ale nejsou v současných populacích žádné stopy. Haploskupina L1 se vyskytuje nejčastěji ve střední Africe a západní Africe. Nejvyšší frekvenci výskytu má mezi Pygmeji. Její rozšíření bylo zřejmě dříve větší a její současný omezený výskyt je způsoben expanzí kmenů Bantuů, viz dále (Quintana-Murci a kol., 2008). Haploskupina L2 vznikla v západní Africe, ale dnes je rozšířena na celém kontinentu. Dříve se šíření této skupiny spojovalo s expanzí Bantuů. Zda tato expanze probíhala násilně, nebo spíš postupným míšením, není zcela jasné, ale Khoisané a Pygmejové byli postupně vytlačováni. Tato expanze začala zřejmě během prvního tisíciletí před naším letopočtem (Adler a Pouwels, 2007). Postup



Obrázek 4-6 Migrace mtDNA haploskupin po kontinentech (Lucioni Maristany, 2010a)

a šíření skupiny L2 je však zřejmě z dřívější doby (Silva a kol., 2015). Získaná data ukazují, že linie haploskupiny L2 se v jižní Africe v nedávné době shlukuje se západní a středoafričskou linií (L2), ale východní linie se zdají být podstatně starší. S linií haploskupiny L2 jsou spojeny tři expanze ze střední Afriky: (1) migrace před 70 000–50 000 lety do východní a možná i jižní Afriky, (2) postglaciální posun (před 15–10 tisíciletími) do východní Afriky a konečně (3) jižní expanze Bantuů probíhající posledních 5 tisíc let. Analýzy populací L0 přitom neposkytují žádný silný důkaz pro tok genů mtDNA mezi východními a jižními populacemi během pozdější doby, což naznačuje nízký stupeň míšení populací východní Afriky a migrantů kmenů Bantuů. To znamená, že alespoň v raných stádiích měla expanze Bantuů převážně charakter demické difúze¹⁰ s malým začleňováním místních populací (Silva a kol., 2015).

Haploskupina L3 je klíčová pro expanzi nazývanou „ven z Afriky“. Své předky má mezi původními nositeli této haploskupiny značná část Evropanů a Asiátů. Stáří této skupiny předpokládají Soares a kol. (2012) zhruba na 60 000–70 000 let. Data odchodu z východní Afriky do Eurasie je poněkud problematická. Soares a kol. (2012) uvádí, že k němu došlo před zhruba 65 000–55 000 lety. L3 je rozdělena do několika skupin, z nichž dvě vytvořily makrohaploskupiny M a N, které nese většina lidí z Afriky (Soares a kol., 2012; Vai a kol., 2019). Haploskupina L3 je častá v severovýchodní Africe a některých dalších částech východní Afriky (Kujanová a kol., 2009). Linie L3 a její podskupiny jsou časté také na Arabském poloostrově (Abu-Amro a kol., 2008). Není zcela jasné, jak probíhala migrace této skupiny z Afriky, zda také docházelo k silné zpětné migraci, nebo byly návraty jen zanedbatelné. Na základě vztahů ve skupině L3 a jejich potomků, skupin M a N, navrhli Cabrera a kol. (2018) možnost původu L3 v Asii. Na druhou stranu Vai a kol. (2019) díky svým analýzám aDNA, které identifikovaly haploskupinu N, naznačují, že haploskupina L3 vznikla ve východní Africe před 70 000 až 60 000 lety, přičemž haploskupina N se od ní brzy odštěpila, asi před 65 000–50 000 lety, ať už na Arabském poloostrově, nebo v severní Africe (Vai a kol. 2019). Tím se dostáváme k důležitým skupinám N a M, které pochází z L3. Haploskupinu N, podobně jako M a jejich dceřiné haploskupiny, lze najít na mnoha kontinentech a tyto haploskupiny naznačují, že došlo k minimálně jedné velké migraci lidí moderního typu z Afriky do dalších kontinentů. **Je možné, že se skupiny N a M vyvinuly až později mimo africký kontinent** (Olivieri a kol., 2006). I když už zmíněná novější práce prezentuje, že minimálně skupina N se mohla vyvinout i přímo v Africe (Vai a kol., 2019), a je také možné, že větších migrací z Afriky bylo víc. Nicméně řada důkazů svědčí spíš pro jednu migraci z Afriky. Předpokládá

¹⁰ Demická difúze, od demos – lid, znamená šíření inovací a myšlenek prostřednictvím šíření lidí do nových lokalit.

se, že haploskupina N opustila Afriku severní cestou spolu s M, nebo skupina M přešla do Eurasie samostatně přes africký roh. Mezi argumenty zastánců teorie o vzniku haploskupin M a N až v Asii patří zejména fakt, že haploskupina N se sice nachází ve všech částech světa, je to makrohaploskupina, ale má nízkou frekvenci v subsaharské Africe. Pak by přítomnost haploskupiny N v Africe byla s největší pravděpodobností výsledkem zpětné migrace z Eurasie (Gonder a kol., 2007). Nejstarší podskupiny haploskupiny N se nalézají v Asii a Austrálii. Je také pravděpodobné, že když se haploskupina N šířila až do Austrálie, tak se také mohla šířit zpět do Afriky. Existence jakýchsi „reliktních“ populací v jihovýchodní Asii podporuje teorii, že došlo pouze k jednomu velkému odchodu z Afriky, a to jižní cestou přes Indii a dále na jihovýchod Asie a Australasie (MacAulay a kol., 2005). Pro jižní trasu a asijský vznik by také mělo svědčit, že výskyt nejstarších podskupin haploskupin N, M a také R (dceřiná haploskupina od N) zahrnuje oblast Eurasie a vede až do Oceánie (Palanichamy a kol., 2004). Při těchto popisech se zdůrazňuje role Indie, přes kterou tato expanze podle všeho vedla (Maji a kol., 2008). Dá se předpokládat, že migranti moderních lidí z Afriky se nejdříve šířili víceméně podél jižního pobřeží Asie přes Indii dále na východ. Haploskupina M je v řadě aspektů podobná N. Je rozšířená po celém světě, označuje se za makrohaploskupinu. Vyznačuje se velkým množstvím dceřiných skupin, ale proti africkým skupinám je poměrně mladá a spekuluje se stejně jako u N, zda vznikla už v Africe, nebo až v Asii. Argumenty pro vznik jsou podobné jako u haploskupiny N. Na hypotéze o asijském původu je největším kamenem úrazu otázka, proč se mateřská skupina L3 nevyskytuje mimo Afriku. Zastánci této teorie tvrdí, že haploskupina L3 v Asii zmizela genetickým driftem, a proto se mimo Afriku nalézá ojediněle. To je samozřejmě možné, ale předpokládá to poměrně malou výchozí populaci. Nicméně zastánci afrického původu haploskupiny M považují neexistenci mateřské skupiny L3 mimo Afriku za hlavní důkaz pro svou hypotézu (Quintana-Murci a kol., 1999). V současnosti se dá doložit, že největší zastoupení haploskupiny M je v Asii, zejména v Indii, Číně, Bangladéši, Tibetu, Nepálu, Japonsku a Koreji (Rajkumar a kol., 2005; Thangaraj a kol., 2006). V těchto zemích se frekvence pohybují od 60 % do 80 %, ale existují malé lokální populace, kde je frekvence ještě vyšší. Dalším argumentem pro vznik M už v Africe je poměrně dávny vznik dceřiných haploskupin. Je dobře zdokumentována hlavně Indie, kde existují haploskupiny patřící k makroskupině M, vzniklé před více než 50 tisíci lety, i když zde lze najít také mladší dceřiné haploskupiny staré přibližně 25 tisíc let, např. M3, M30, M37 (Chandrasekar a kol., 2009). Dalším argumentem pro původ v Asii je, že v Africe se vyskytuje pouze dceřiná haploskupina M1. González a kol. (2007) na základě svých výsledků také argumentují, že africká M1 je mladší než jiné asijské linie M (González a kol., 2007). Existence afrických haploskupin

bezprostředně odvozených od M je velmi omezená, je to především skupina M1 v Etiopii, která se navíc jeví jako relativně mladá (Rajkumar a kol., 2005).

Stručně se zaměříme na některé haploskupiny, které se odštěpily z M a N. Haploskupina O je (podobně jako P a S) odvozená od N a je hodně rozšířená v Oceánii (Palanichamy a kol., 2004). Od N pochází také haploskupina A, která byla nalezena mezi původními Američany a její vznik je odhadován na dobu před 30–50 tisíci lety. Přesný čas a způsob kolonizace Nového světa stále není zcela jasný. Domorodé americké populace vykazují téměř výhradně jen pět haploskupin mtDNA. Kromě právě probírané A jsou to B, C, D a X. Haploskupiny A až D jsou časté také v Asii, což naznačuje severovýchodní asijský původ těchto linií. Rozdílný model distribuce a frekvence haploskupiny X však podle některých autorů naznačuje, že se může jednat o další nezávislou migraci do Ameriky (Fagundes a kol., 2008). Haploskupina S se hodně vyskytuje u původních obyvatel Austrálie – Aboridžinců, je u nich druhá nejčastější ve frekvenci, která odpovídá 23% (Nagle a kol., 2017). Další dceřinou haploskupinou pocházející od N je široce rozšířená skupina H. Tato haploskupina a její dceřiné větve jsou rozšířeny zejména v Eurasii, kde vznikla asi před 70 tisíci lety, a nalezneme ji v současnosti i na dalších kontinentech. Právě u skupiny H je třeba zmínit severní cestu šíření moderních lidí. Tato trasa by měla vést přes střední Asii (Larruga a kol., 2017). Jednou z prvních odštěpených linií od makroskupiny H je haploskupina U. K odštěpení došlo zřejmě někde v západní Asii před 50 tisíci lety. Hlavní větve skupiny U se postupně šířily v době před posledním ledovcovým maximem ve vlnách napříč západní, střední a jižní Asií. Všechny tyto migrační události se spíše překrývaly a asi nebyly striktně odděleny. Některé z pozdějších větví skupiny U, zejména U6 a U3, se obrátily zpět a dosáhly severní Afriky. Na druhém konci Asie, v oblasti nazývané Wallacea,¹¹ se další dceřiná větev makrohaploskupiny R, haploskupina P, samostatně rozšířila asi v době před 52 tisíci lety. Šlo o šíření s dalšími větvemi do oblastí, jako jsou Austrálie, Nová Guinea a Filipíny (Larruga a kol., 2017).

V Evropě se zastavme u poměrně vzácné podskupiny U8a, která se vykytuje hodně u Basků, u kterých se často předpokládá starobylý původ. Tato linie se odštěpila někdy v mladším paleolitu a její zakladatelé zřejmě pochází ze západní Asie. Její malá frekvence v Africe ukazuje spíše na pronikání z Evropy než z Asie. Fylogeografická¹² analýza naznačuje, že U8a měla v Evropě dvě expanzní období, první z období před 30 000 lety z jihozápadní oblasti včetně Pyrenejské-

¹¹ Wallacea je oblast (asi 347 000 km²), která obsahuje Sulawesi s okolními menšími ostrovy, Moluky, Sangihe, a většinu Malých Sund. V současnosti jsou zde Indonésie a Východní Timor. Jedná se o přechodnou zónu mezi indomalajskou a australasijskou oblastí, vyskytují se zde živočichové a rostliny z obou oblastí a množství endemitů.

¹² Fylogeografie se zabývá směry a cestami, kterými se v dané oblasti a v určitém čase šířily živé organismy.

ho poloostrova a části dnešní Francie a druhá ze střední Evropy z období před 15 000–10 000 lety (González a kol., 2006). Evropská fylogeografie U8 je ve shodě s předpokladem, že by se předkové Basků mohli podílet na znovuosídlení střední Evropy v posledních interglaciálních (meziledových) obdobích (González a kol., 2006).

Další významnou haploskupinou, která se oddělila od makroskupiny H, je skupina K, která pochází od U, tedy konkrétně od podskupiny U8b (González a kol., 2006). Tato haploskupina je poměrně široce rozšířená ve střední, severní a jižní Evropě, jižní a západní Asii, severní Africe a Africkém rohu (Richards a kol., 2000; Simoni, 2000; Sykes, 2001; Behar a kol., 2004). Frekvence kolísá mezi 6–10 % u populace v Evropě, ale místy dosahuje 16 % u Drúzů (nábožensko-etnická komunita žijící v Libanonu, Izraeli a Sýrii) nebo 17 % u Kurdů. Zajímavá situace je u aškenázských Židů, kde tvoří tato skupina 32 % (Simoni, 2000; Sykes 2001; Behar a kol., 2004; Costa a kol., 2013). Původ těchto Židů je poněkud nejasný. Podle historických pramenů jde o Židy, kteří se v raném středověku usazovali v Evropě. Dnešní Německo pojmenovali po zemi Aškenaz, protože Aškenaz byl synem Gomeru, kterého ztotožnili s Germánem.¹³ Dalšími evropskými Židy, kteří patří mezi sefardské, se nyní zabývat nebudeme.¹⁴ Proč je ale haploskupina K u Aškenázů tak zastoupena? To neodpovídá zastoupení u ostatních Židů. Costa a kol. (2013) poukazuje, že mtDNA od aškenázských Židů spíše ukazuje na původ v pravěké Evropě a nepochází z Předního východu. Mohli se však ve středověku natolik smísit s evropskou populací? Opravdu si Židé brali tolik evropských žen, které do jejich populace vnesly takové množství evropské mtDNA? Může to být i jinak. Na základě historických pramenů se zdá, že v helénistickém období zažíval judaismus expanzi po celém Středomoří a řada žen podlehla proselytismu¹⁵ (Sand, 2009). Proč je ale potom u sefardských Židů zastoupení haploskupiny K nižší? Je možné, že to souvisí s malou zakládající populací aškenázských Židů, kde populace prošla tzv. efektem hrdla lahve.¹⁶ Židovské populace sefardských a severoafric-

¹³ Jedná se o další z historických omylů, Gomer v Bibli není pravděpodobně žádný Germán, ale zkomolenina od Kimmer, jde tedy o Kimmery, kočovníky indoevropského původu, kteří porazili říši Urartu (dnes území Arménie), utkali se s Asyřany a na přelomu 8. a 7. stol. př. n. l. vtrhli do fryžského království a vypálili město Gordion – jeho král Midas spáchal sebevraždu (jméno Midas mělo zřejmě více fryžských králů, kteří dali podnět ke vzniku několika řeckých pověstí – oslí uši, dotek měnící vše ve zlato). I jižnější Judea jistě o Kimmerech věděla, a tak se pravděpodobně dostali do Bible. Po Kimmerech zůstal název Krymu a můžeme zde připomenout fiktivního barbara Conana, který měl být Kimmerem.

¹⁴ Sefardové či Sefardé – jedná se o Židy, kteří žili až do roku 1492 na Pyrenejském poloostrově a poté, když byli vypovězeni, se přesunuli do Středomoří, Balkánu, Orientu, ale také do některých evropských zemí.

¹⁵ Proselytismus je cílené získávání nových věřících pro nějakou náboženskou společnost změnou jejich původního náboženského přesvědčení.

¹⁶ Efekt hrdla lahve (bottleneck efekt, nebo též efekt zakladatele) nastává při výrazném snížení počtu jedinců v populaci. Při takovém zmenšení populace nastává pokles genetické diverzity, protože menší

kých židovských populací jsou stejně mladé jako populace aškenázských Židů, ale možná prošly různými událostmi a různými „hrdly lahve“ (Feder a kol., 2008). **Ale haploskupinu K se podařilo identifikovat i na úrovni historické mtDNA. Například v moravských Vedrovicích byly odebrány vzorky z kostí z obyvatel kultury s lineární keramikou (LBK)¹⁷ a bylo možno určit mtDNA u šesti jedinců** (testovalo se víc koster, ale u všech se určení nezdařilo). Haploskupina K byla nalezena u dvou jedinců (Bramanti, 2008). **Mumie muže z eneolitu Ötziho (viz dále) byla z hlediska mtDNA zařazena také do haploskupiny K.** Nepatří však do žádné ze současných větví (K1a, K1b nebo K1c) a **má jinak zatím neznámou haploskupinu pojmenovanou Klö** (Ermini a kol., 2008). Haploskupinu K (konkrétně K1c) se podařilo najít také ve dvou jedincích z neolitické kultury v Řecku z jeskyně Theopetra v Thessalii. Celkově bylo analyzováno 6 neolitických jedinců, ale další nebyli z území Řecka (Hofmanová a kol., 2016). Práce je velmi zajímavá z hlediska řešení otázky, kdo byli první zemědělci v Evropě. Otázka přechodu na zemědělství byla řešena také v západní části Afriky (Maghrebu), kde se testovalo, zda neolitici byli potomci předchozího obyvatelstva, nebo migranti. Výsledky nejsou zcela jasné. První fáze neolitu zřejmě souvisí více s kulturním přejímáním nových technologií, a pak se více uplatňují i migrace. Haploskupina K je více rozšířena v pozdějším neolitu, tedy snad svědčí pro migrace, ale u lokality bližší Gibraltarů byla nalezena také v raném neolitu, což napovídá migracím přes úžinu už v poměrně dávných dobách (Fregel a kol., 2018). Tyto migrace přes Gibraltar však nemusí souviset s neolitickými inovacemi. Historická mtDNA byla studována na poměrně rozsáhlém souboru 90 vzorků z Egypta. Práce poukazuje na rozdíly mezi současnými a staroegyptskými genomy z období asi od roku 1300 př. n. l. do římské epochy. Prokázalo se, že staří Egypťané si byli geneticky blíže s lidmi z Blízkého východu než se současnými obyvateli Egypta. Nicméně právě haploskupina K byla nalezena pouze u dvou jedinců (Schuenemann a kol., 2017).

Jako dalšího jedince s aDNA pro haploskupinu K můžeme uvést ženu z období 2650–2450 př. n. l. z údolí ze středního Eufratu. Byla pohřbena společně s robustním mužem, snad válečníkem, ale u něho se izolovat DNA nepodařilo (Tomczyk a kol., 2011). Z této doby a historicky důležité oblasti by bylo vhodné shromáždit větší soubor vzorků, ale zatím to bohužel možné není.

K potomkům haploskupiny H patří také haploskupina pre-JT, která je rozšířena na arabském poloostrově ve frekvenci kolem 22 %, i když zde se uvažuje

množství potomků nemůže obsáhnout původní genetickou variabilitu. Tak stoupá podíl genetického driftu. Tento jev je nevratný, i když se počet jedinců zase zvětší, ztracená variabilita se neobnoví, zmizelé alely jsou pryč a variabilita se může znovu zvýšit až po dlouhém čase, novými mutacemi.

¹⁷ Kultura s lineární keramikou (označení LBK z německého Linearbandkeramik) – neolitická kultura ve střední Evropě v období přibližně 5600–5000/4950 př. n. l. Keramika byla nazývána podle charakteristické výzdoby nádob rovnými či zavinutými čarami. Jedná se o první zemědělce na našem území.

o silném efektu zakladatele (Richards a kol., 2000). Od ní je odvozená haploskupina JT, která byla v evropské populaci zaznamenána u aDNA v populaci starých Etrusků (Vernesi a kol., 2004). **Už od starověku byl diskutován původ Etrusků.** Podle Hérodota pochází z Lydie, části dnešního západního Turecka, nebo podle Dionysia z Halikarnasu šlo o původní populaci. První výsledky analýzy mtDNA na současných vzorcích svědčily spíše pro Hérodota, ale později se ukázalo, že genetické vazby mezi současnými lidmi Toskánska a Malé Asie sice existují, ale datují se do vzdálené fáze pravěku, která nemusí souviset s migracemi během neolitu, případně pozdějšími. Není zde zřejmě souvislost s nějakou migrační vlnou z východu a nástupem etruské kultury v Itálii (Tassi a kol., 2013). Etruská kultura se vztahuje přibližně na období od osmého do prvního století př. n. l. Z aDNA bylo také zjištěno, že staří Etruskové se odlišují od současných obyvatel Toskánska, takže je nelze považovat za stejnou populaci (Vernesi a kol., 2004).

Potomkem haploskupiny JT jsou T a J, které se oddělily přibližně před 50 000 př. n. l. Jako jedno z možných míst vzniku se považuje Blízký východ, zatímco přítomnost těchto haploskupin v Evropě je mladšího data. Skupina J dosahuje nejvyšších frekvencí v Arábii (25 % u beduínů a u obyvatel Jemenu). Je možné, že populace Jemenců a beduínů z Arábie má společný původ (Richards a kol., 2000). Haploskupina J se také vyskytuje u původních evropských populací v rozmezí 8–12 % (Sykes, 2001; Bermisheva a kol., 2002). Haploskupina T se podobně jako J odštěpila na Blízkém východě (Pala a kol., 2012). Základní skupina pro T byla nalezena mezi současnými populacemi v Alžíru ve frekvenci 1,67 %, kde se také v podobně nízkých frekvencích vyskytují i další dceřiné haploskupiny: T1a, T2, T2b, T2c, T2h (Bekada a kol., 2013). **Většina mtDNA haploskupin J a T (včetně jejich dceřiných) může souviset s expanzí „zemědělců“ z Blízkého východu do Evropy** (Soares a kol., 2010). Haploskupina T je přítomna v nízkých frekvencích v celé západní a střední Asii a Evropě s různou mírou prevalence a patrně je přítomna v jiných skupinách z okolních oblastí. T se vyskytuje v přibližně 8–10 % původních Evropanů (Sykes, 2001; Bermisheva a kol., 2002). Tato haploskupina může souviset i s další expanzí do Evropy. Nejdřív se podíváme, kde se vyskytuje. Specifický podtyp T1 je běžný ve středoasijských a moderních turkických¹⁸ populacích (Lalueza-Fox a kol., 2004), které obývají území významně se kryjící s oblastmi, kde žili starověcí Sakové nebo Sarmati. Případně zde byla ještě

¹⁸ Turkické národy (Turkiti, turecké národy, Turkotataři, Turkové, Turci a Tataři, turkotatarské národy) jsou značné množství etnických a jazykových skupin od jihovýchodní Evropy až po severovýchodní oblasti Sibiře. Jejich jazyk je možno zařadit do rodiny altajských jazyků a většina mluvčích představuje směs mongoloidních a europoidních rysů. Abecedně bychom tam mohli zařadit tyto současné a vymřelé národy a skupiny: Ázerbájdžánci, Baškirové, Čuvaši, Gagauzové, Gökturci, Hunové, Chazaři, Karačajové, Karakalpakové, Kašakové, Kazaši, Kipčakové, Krymčáci, Krymští Karaiti, Kumáni, Kyrgyzové, Mamlúkové, Nogajové, Osmanští Turci, Protobulhaři, Tataři, Timúridi, Turkméni, Turkoavaři, Turgeši, Ujgurové, Uzbeki, Sacha/Jakuti, Seldžučí Turci, Siungnuové.

dříve lokalizována andronovská kultura (nejspíš to byli lidé europoidního typu, mluvící indoíránskými jazyky) a další pravděpodobně íránské národy v době mezi druhým a prvním tisíciletím př.n.l. Lalueza-Fox a kol. (2004) také identifikovali několik T a T1 sekvencí ve starověkých pohřbech, včetně kurganů,¹⁹ v kazašské stepi z 14.–10. století př.n.l., což se do určité míry kryje s poslední fází andronovské kultury a s obdobím Saků v tomto regionu (Bennett a Kaestle, 2010).

Jednou z často zmiňovaných otázek, řešených v souvislosti s mtDNA haploskupinami – a to v archeologii i antropologii – je, zda zemědělci, kteří v neolitu přicházeli z jihu a jihovýchodu do Evropy, nahradili místní populace lovců a sběračů, nebo naopak místní obyvatelé přešli na zemědělství sami pod vlivem šířících se nových technologií. Je velmi pravděpodobné, že se situace vyvíjela různě v jednotlivých lokalitách, ale obecné trendy by mělo být možno určit. Bylo dokázáno, že na rozdíl od obvyklého stabilního růstu populace po zavedení zemědělství v Evropě (mezi 6 000 a 2 000 př.n.l.) došlo k rozmachu regionálních populací (Shennan a kol., 2013). Vztah růstu populací a případných změn v podnebí však nalezen nebyl (Shennan a kol., 2013). Podobná situace je i na východě. Zheng a kol. (2011) přišli s vysvětlením, že růst populace ve východní Asii v době před 13.–4. tisíciletím urychlilo zavedení zemědělství a přispělo k dalšímu rozvoji v počtu obyvatel. Kromě toho bylo zjištěno, že hlavní linie mtDNA testované v Číně a Japonsku prošly expanzí, z nichž všechny (především D4, D4b2b, D4a, D4j, D5a2a, A, N9a, F1a1'4, F2, B4, B4a, G2a1 a M7b1'2'4) se v oblasti vyskytovaly už před 10 tisíci lety (Zheng a kol., 2011). Zemědělství přineslo větší koncentrace obyvatel a zřejmě i kontakt s domácími zvířaty. To pravděpodobně vyvolalo i první větší šíření infekčních onemocnění. Mor (bakterie *Yersinia pestis*) byl identifikován při sekvenaci DNA ze zubů z různých lokalit v Eurasii z doby před 2 800 až 5 000 lety, tedy z dřívější doby, než se původně očekávalo (Rasmussen a kol., 2015). Jsou to sice pozdější data než neolitická, nicméně souvislost s rozvojem zemědělství a zvýšenou koncentrací obyvatel je očividná.

Zaměříme se však více na Evropu. **Zemědělství vzniklo podle současných znalostí před více než 10 tisíci lety na Předním východě.** Nejdříve se v Evropě objevilo ve Středomoří, zhruba před 9 tisíci lety, ve střední Evropě to bylo před asi 7,5 tisíci lety a na severu Evropy před pěti tisíciletími. První zemědělci ve střední Evropě byli nositeli hlavně haploskupiny N1a, ale také H, HV, J, K (Bramanti a kol., 2009). Většina moderních evropských linií mtDNA může být přiřazena do jedné z následujících haploskupin: H, V, U (včetně K), J nebo T, všechny pocházející z makroskupiny R, nebo I, W, případně X, což je potomek skupiny N. Ačkoli ně-

¹⁹ Kurgan je druh mohyly nad hrobem. Většinou obsahuje jen jedno tělo s bohatou výbavou (zbraně, loď, koně). Nejčasnější známé kurgany se datují do 4. tisíciletí př.n.l. a jsou často spojovány s původním indoevropským etnikem. Později jsou různé typy kurganů nalézány i u dalších kultur včetně Hunů a středověkých Kumánů (Polovců, Kypčáků).

kteřé podskupiny, například U5, jsou pro Evropu docela specifické, většinu z nich Evropa sdílí se sousedními oblastmi Asie a severní Afriky. Minulost Evropy ale vypadala jinak. Byla prozkoumána mtDNA 22 lovců-sběračů, převážně z dnešního Německa a Pobaltí (i když dva vzorky byly z lokality v Rusku blízko Samary), a sekvence se porovnávaly se sekvencemi raných zemědělců a moderních Evropanů (Bramanti a kol., 2009). Rozdíly jsou poměrně značné. 82 % z těchto 22 lovců-sběračů neslo haploskupinu U (14 lidí mělo haploskupinu U5, 2 haploskupinu U4 a 2 jedinci patřili do nespecifikovaného typu U). Nalezené frekvence haploskupiny U jsou překvapivě mimořádně vysoké. Evropané dnes mají různé typy U5, v rozsahu asi od 1 do 5 %, ovšem lokálně se liší. Podél pobřeží Středozemního moře je to 5 až 7 %, někde frekvence stoupá, zejména ve většině klíčových evropských oblastí, a největší zastoupení 10 až 20 % je v severovýchodní části Evropy, poblíž Uralu. Maximum 40 % lze nalézt ve Skandinávii u etnika Sámů (Sámi, dříve Lapenci, sámské jazyky patří do rodiny uralských jazyků). Na základě svých výsledků Bramanti a kol. (2009) soudí, že přechod na zemědělství ve střední Evropě byl doprovázený podstatným přílivem lidí z další oblasti mimo region. Nově přichází se, alespoň zpočátku, nevýznamně mísili s místními ženami od lovců a sběračů. Autoři tak zřejmě vysvětlují podíl různých haploskupin U v evropských populacích. Podle zastoupení haploskupin U lze také usuzovat na stupeň promíšení s původními lovecko-sběračskými populacemi, které se v Evropě šířily po poslední době ledové a v mezolitu. Zdá se, že mnohdy byli původní mezolitickí lovci a sběrači nahrazeni prakticky zcela, ale ne vždy a všude. Zvláště na severovýchodě Evropy a ve Skandinávii je doložené delší soužití obou kultur. Analýzou DNA extrahované ze starých skandinávských lidských ostatků bylo prokázáno, že lidé v kultuře Pitted Ware (lovecko-sběračská kultura v jižní Skandinávii v době asi 3500 př. n. l. až 2300 př. n. l.) nebyli přímými předky moderních Skandinávců (ani obyvatel Sámů v severní Skandinávii), ale jsou více příbuzní současným populacím východní pobaltské oblasti, jako jsou Lotyšů a Litevců (Malmström a kol., 2009). Zda to jsou potomci původních lovců-sběračů z mezolitu nebo uprchlíků ze Skandinávie se říci zatím nedá. Autoři předpokládají, že Pobaltí bylo útočiště původních mezolitiků. Jejich potomci tam tedy existují stále. Je pravděpodobné, že vyhubení a poněmčení staří Prusové, kteří patřili k Litevcům a Lotyšům, byli také ze značné míry potomci mezolitiků, ale na to zatím nejsou důkazy. Zabíhání do psychických dispozic jednotlivých národů se dnes nepovažuje za vědecké a příliš korektní, ale můžeme si připomenout specifika místních obyvatel, zejména dlouhodobý zuřivý odpor proti křesťanství ve středověku. Dokonce i naši králové Přemysl Otakar II. a Jan Lucemburský vyjeli do Pobaltí na křížové výpravy. Můžeme připomenout také silné snahy o nezávislost a partyzánskou válku 1945–53 proti Sovětskému svazu. Určitá svěbytnost a udržování vlastních tradic tam má zřejmě hluboké kořeny.

Soužití lovců-sběračů a zemědělců je známo i ze současné doby z Nové Guineje, kde existuje z důvodů specifických přírodních podmínek (Diamond, 2000). Takže i vztahy obou komunit si nyní dokážeme aspoň rámcově představit. Ale vraťme se do hlubší minulosti Evropy. Z evropského neolitu jsou doklady o podobném soužití. Bollongino a kol. (2013) zkoumali vztah mezi lovci-sběrači a zemědělci a analyzovali vzorky z mezolitu a neolitu z jeskyně Blätterhöhle u města Hagen v západní části Německa. Jeskyně sloužila jako pohřebiště pro mezolitiky i neolitiky. Byly určeny mezolitické mitochondriální sekvence DNA, které byly typické pro evropské lovce-sběrače (haploskupiny U), a naproti tomu neolitické vzorky souvisely s dalšími liniemi, spojenými s ranými zemědělci (haploskupiny H a J). Současně byly provedeny analýzy izotopů, pomocí kterých bylo zjištěno, že stravu tehdejší populace lze rozdělit na dvě hlavní skupiny. Jedna s dietou pro zemědělce a druhá pro stravu založenou hlavně na sladkovodních rybách. Byly analyzovány izotopy síry, dusíku a uhlíku z kostí a zubů 29 jedinců. Data odrážejí jen ženskou historii, nicméně podle potravy je zřejmé, že ženy přecházely od lovců-sběračů k zemědělcům. Tato skutečnost však nemusí platit všude a závisí na konkrétních okolnostech, jak naznačuje výzkum v Blätterhöhle (Bollongino a kol., 2013). Spekuluje se, že na severu Evropy to bylo i obráceně. Obecně je lovec-sběrač více závislý na okolní přírodě a naučit se takto žít je náročnější. Získání nutných návyků k přežití je dlouhodobý proces. Zvládnout zemědělské techniky je snazší. Množství nutných znalostí a dovedností je u zemědělců omezenější. Souhrnně asi platí, že v Evropě neolitici většinou nahradili předchozí populace, nešlo tedy o to, že by mezolitičtí lovci a sběrači pod vlivem kulturního přejímání sami masově přecházeli na zemědělství. Nicméně někde lokálně docházelo i k soužití a mísení. **Mezolitici zanechali do současnosti větší podíl potomků pouze na severu Evropy.** Zůstávají mnohé nejasnosti, například právě na severu, zejména jaký je původ převážně pasteveckých Sámů. Jak již bylo uvedeno výše, tito pastevci nepocházejí od původních skandinávských mezolitických lovců a sběračů, přestože hodně Sámů jsou nositelé haploskupiny U. Snad se přesouvali po severním okraji Evropy z východu, ale doklady zatím chybí.

Na tomto místě by bylo vhodné na chvíli opustit problematiku mtDNA a podívat se na proces neolitizace Evropy také z modernějšího pohledu, kdy jsou současné i staré genomy analyzovány dalšími metodami, například mapováním SNP ad. V současnosti se předpokládá, že zemědělství se rozšířilo do Evropy podél střeďomořských i střeďoevropských tras, ale rozsah a konkrétní cesty se diskutují, zejména trasa šíření z oblasti vzniku zemědělství přes Egejskou oblast (Hofmanová a kol., 2016). Proto se déle zastavíme u práce, která tento problém řeší poměrně podrobně. Pomocí vícerozměrné statistiky (metody PCA²⁰) se podařilo prokázat,

²⁰ PCA – principal component analysis (česky analýza hlavních komponent) je transformace sloužící k dekorelaci dat. Často se používá ke snížení dimenze dat s co nejmenší ztrátou informace, ale ukázalo

že genomy ze severní Egejské oblasti prošly shodným genetickým driftem s dalšími evropskými neolitickými genomy (ze severního Španělska, Maďarska a střední Evropy). To svědčí o společném původu, je proto pravděpodobné, že raní neolitici postupovali z oblasti severního Egejského moře napříč Evropou (Mathieson a kol., 2015; Hofmanová a kol., 2016). **Není však možné odvodit oblast, odkud zemědělci vyšli, protože jak řecké, tak anatolské genomy se navzájem v podobném rozsahu kopírují.** Původ evropských zemědělců může být stejně dobře zastoupený genomy raného neolitu z Řecka i ze severozápadní Anatolie (Malé Asie), jak uvádí Hofmanová a kol. (2016). Z dalších vzorků aDNA lze odvodit tok genů přes oblasti kolem Egejského moře i v pozdější době, zhruba před 6 700 lety (Hofmanová a kol., 2016; Omrak a kol., 2016). V souladu s analýzou PCA, kde lze vidět typy shlukování dat (a tedy související data v těchto shlucích), sdílejí severní egejské genomy vysoké úrovně genetického driftu mezi sebou navzájem i se všemi ostatními dříve charakterizovanými evropskými neolitickými genomy, včetně raně neolitických ze severního Španělska, Maďarska a střední Evropy. Vzhledem k archeologickému kontextu různých vzorků je nejšetnějším vysvětlením tohoto sdíleného driftu migrace raných evropských zemědělců z oblastí severního Egejského moře napříč Evropou (Mathieson a kol., 2015; Hofmanová a kol., 2016).

Situace je však složitější. Například nálezy z Anatolie (Kumtepe) vykazují příměsi kavkazských lovců a sběračů, zatímco jiné genomy z blízké lokality Barcin (obě lokality jsou nedaleko od Bosporu) nic takového nemají. Genomy z Kumtepe mají také stejnou strukturu vzniklou genetickým driftem jako pozdně neolitické genomy z Řecka, ale tyto genomy se odlišují od genomů z Barcinu. Snad se jedná o pozdější neolitický tok genů z východu (Hofmanová a kol., 2016; Omrak a kol., 2016). Všechny dostupné neolitické genomy v Evropě si jsou podobné úrovní genetického driftu, ale genomy ze Španělska a Řecka jsou si bližší a odlišují se od genomů ze Střední Evropy. To jednak naznačuje, že **populace v egejském neolitu mohou být považovány za kořen všech raných evropských farmářů**, ale také že existovaly alespoň dvě nezávislé kolonizační cesty, kterými se první zemědělci ubírali. Alternativním scénářem je velmi rychlá kolonizace jednou cestou s následným tokem genů zpět do Řecka ze Španělska (Hofmanová a kol., 2016). Je otázka, nakolik je tento scénář reálný. Muž z alpského ledovce, tyrolský **Ötzi**, **vykazuje také jedinečný genetický drift shodný s Egejskou oblastí** a odlišný od neolitických genomů z dnešního Maďarska i od pozdně neolitických evropských genomů. Zřejmě v Alpách existovala reliktní populace původem z časného neolitu i v pozdější době (Ötzi žil až v eneolitu) (Hofmanová a kol., 2016).

se, že je také užitečným nástrojem pro analýzu genetických dat, zejména při studiích lidské migrace. A tak údajné velké historické migrace mohou ve skutečnosti mít i jiné interpretace (Reich a kol., 2008).

Další otázkou je, zda nepřerušená stopa předků podél migrační trasy zasahuje až do jihovýchodní Anatolie a úrodného pŕlměsíce, kde se nacházejí nejstarší neolitické lokality na světě. To se zatím nedá určit. Srovnávání genomů s kavkazskými genomy naznačují, že před přechodem na zemědělství došlo v jihozápadní Asii k výraznému strukturování populací sběračů. Existují mezi nimi rozdíly a genomy nevykazují kontinuitu. Díky chybějící kontinuitě dat o místních lidských populacích existuje stále řada nejasností týkajících se vzniku zemědělství. Analýzy také naznačily malé, ale významné množství příměsí lovců a sběračů do španělských a maďarských genomů raných zemědělců (3–9%), ale i do raného neolitu v řeckém genomu (zde ovšem méně, 0–6%). To zřejmě znamená, že k míšení mezi migrujícími zemědělci a místními lovci a sběrači došlo sporadicky na nízké úrovni po celém kontinentu, a to i v nejranějších stádiích neolitu. Většina moderních anatolských a egejských populací se nejeví jako přímí potomci neolitických národů ze stejné oblasti. Podobně srovnání alel mezi starými a moderními genomy naznačuje neolitickou až moderní diskontinuitu v Řecku a západní Anatolii, pokud populace předků nebyly nerealisticky malé. Směšovací analýza však ukazuje, že každý egejský neolitický genom odpovídá modernímu Středomoří, zejména obyvatelům Sardinie (Hofmanová a kol. 2016). Z analýz také vyplývá, že moderní vzorky z Evropy a okolních oblastí jsou relativně geneticky příbuznější s neolitickými genomy z oblastí kolem Egejského moře než s neolitickými genomy z Německa a Maďarska. To naznačuje efekt zakladatele ze zdroje geneticky podobného egejským vzorkům (Hofmanová a kol., 2016). Co se ale dělo v oblasti dnešního Řecka dál? Existují již data z analýzy vzorků z doby bronzové. Pomocí autozomálních SNP mtDNA (byla použita metoda Illumina) a chromozomu Y byl na aDNA testován původ obyvatel krétské minojské kultury a pevninské mykénské kultury, která byla už řeckého jazyka. Ostatně vztah těchto kultur z doby bronzové se diskutuje už od objevení velkolepé minojské kultury. Byly shromážděny údaje o celém genomu od devatenácti jedinců, Mínojců z Kréty, Mykéňanů z pevninského Řecka a jejich východních sousedů z jihozápadní Anatolie. Zjistilo se, že **Mínojci a Mykéňané si byli geneticky podobní**, protože pocházeli nejméně ze tří čtvrtin od prvních neolitických zemědělců ze západní Anatolie a Egejského moře a měli také příměsi od obyvatel Kavkazu a z Íránu. Mykéňané se však od Mínojců lišili tím, že měli další předky mezi lovci-sběrači východní Evropy a Sibiře. Jejich původ je však také možno hledat mezi obyvateli euroasijské stepi nebo Arménie (Lazaridis a kol., 2017). To možná naznačuje, jaký byl původ a migrační pochod indoevropských protořecky mluvících příchozích, než se smísili se staršími obyvateli Peloponésu. Podle výsledků se moderní Řekové podobají Mykéňanům, ale s nějakým dalším genetickým zředěním. Samotní staří Mykéňané se podobali více původním neolitikům než moderní Řekové. Výsledky tedy podporují myšlenku

kontinuity obyvatel Égeidy do současnosti, ale nikoli izolaci obyvatel v oblasti Egejského moře během historie, a to před i po době jejich nejranějších civilizací (Lazaridis a kol., 2017). Můžeme připomenout, že historicky jsou na území Řecka známé invaze Keltů a Germánů a usazování Albánců a Slovanů. Avšak v první řadě byli staří Mykéňané překryti mohutnou invazí Dóřů, kteří mykénskou civilizaci do značné míry zničili a převrstvili. Dórové sice také mluvili řecky, ale jejich původ je zatím neprozkoumaný.

Vraťme se však ještě do mtDNA problematiky a staršího období. Stručně zmíníme některé další haploskupiny. Například z haploskupiny R se kromě jiných také vyštěpila skupina P, která se nejvíc nachází v Oceánii, obzvláště u Papuánců, Melanésanů a domorodých Australanů (Friedlaender a kol., 2005). Spolu se skupinou P se vyskytuje také haploskupina Q, která je však potomek haploskupiny M. Fylogeografie P a Q naznačuje téměř úplnou (ženskou) izolaci starověké Nové Guineje, která možná trvala už od prvního osídlení. I když se na Nové Guinei skupina Q rozdělna na množství podskupin, v Austrálii se nenašla. Jedinou sdílenou haploskupinou mtDNA mezi Austrálií a Novou Guineou, která byla dosud identifikována, zůstává jedna vedlejší větev haploskupiny P (Friedlaender a kol., 2005). To napovídá, že se lidské populace v Austrálii a na Nové Guinei stýkaly velmi omezeně, alespoň z hlediska žen.

Haploskupina F je potomkem haploskupiny R, konkrétně podskupiny R9. Tato skupina je nejběžnější ve východní a jihovýchodní Asii (Wen a kol., 2004a; Starikovskaya a kol., 2005; Wen a kol., 2005; Hill a kol., 2007; Tabbada a kol., 2010; Derenko a kol., 2012). Vyskytuje se v různé intenzitě (v některých malých regionech i kolem 50 %, v jiných jen 2 %), ale nejvíce je ji možno nalézt v severní části východní a střední Asie, zejména u Mongolů, Kazachů, Ujgurů a Japonců. V Číně je nejrozšířenější na jihu v provincii Jün-nan. Na severu provincie je to 15 % a na jihu 30 % (Wen a kol., 2004b). Rozdílný výskyt je v různých oblastech Malajska (Hill a kol., 2006). Haploskupina má zřejmě asijský původ a souvisí s migracemi ve východní Asii. Z evropského hlediska je zajímavý její výskyt na ostrově Hvar v Chorvatsku, kde se vyskytuje v poměrně vysoké frekvenci 8,3 % jako podskupina F1b (Tolk a kol., 2001). Haploskupina F se vyskytuje v Evropě poměrně sporadicky, proč je tedy ve frekvenci 8,3 % na ostrově Hvar? Autoři spekulují s efektem zakladatele, tzn., že se rozšířila od jednotlivce nebo malé skupiny, která se na ostrově postupně rozrůstala. Tolk a kol. (2001) také spekulují o vlivu Hunů, Avarů nebo Mongolů a poukazují na blízkou Panonii, tedy převážně současné Maďarsko. Jenže se jedná o mtDNA, tedy o ženskou linii, musíme proto předpokládat, že se na ostrově Hvar usadila skupina Hunů, Avarů či Mongolů se ženami z původní vlasti. Což hlavně u Mongolů, kde je invaze poměrně dobře historicky známa, nezní příliš věrohodně. Jako další možnost zvažují autoři i **vliv**

Hedvábné stezky z Číny (Tolk a kol., 2001). Podél Hedvábné stezky je skutečně možno vystopovat migrace žen, ale to by patrně měla být haploskupina F i jinde, kde by kopírovala stezku, i třeba ostrůvkovitě, na východě Evropy.

Další mtDNA haploskupina odvozená od N, kterou je nutno zmínit, je haploskupina A, která je široce rozšířená v severní a východní Asii a skládá se ze dvou hlavních (A4 a A5) a několika menších (A3, A6 a A7) podskupin (Metspalu a kol., 2006). Ve střední Asii představuje haploskupina A méně než 10 % mtDNA a zřejmě je východoasijského původu (Comas a kol., 2004). V severní Asii je přítomna pouze jedna podskupina A, a to A4, a je tam vzácná, přestože byla nalezena u většiny sledovaných populací (Schurr a kol., 1999; Derenko a kol., 2003). Podhaploskupina A4 zahrnuje nižší podskupinu (subklastr) A2, který se objevuje s nejvyššími frekvencemi (> 68 %) v severovýchodních sibiřských populacích Čukčů a Inuitů (Eskymáků) (Schurr a kol., 1999; Derenko a kol., 2003). Toto rozdělení podporuje hypotézu, že **Inuité, kteří obývají oblasti Sibiře, Aljašky, severní Kanady a Grónska, pocházejí z Čukotky**, kde jako současní původní obyvatelé žijí převážně Čukčové. Na rozdíl od A4 se další podskupiny A vyskytují převážně v Koreji a Japonsku (Metspalu a kol., 2006). Hodně pozornosti bylo věnováno původním obyvatelům Ameriky a potvrdilo se, že pochází z Asie, ze Sibiře. Výsledky odhalily, že zbytky původní starověké sibiřské genové skupiny jsou stále patrné v sibiřských populacích, což naznačuje, že zakládající haplotypy domorodých amerických haploskupin (kromě A se tam řadí B, C, D) pochází z různých částí Sibiře (Starikovskaya a kol., 2005). Je vhodné poznamenat, že u původních obyvatel je také haploskupina X, u které je její výskyt v Americe poněkud nejasný. Haploskupina A přišla, možná už podruhé, v jiné migrační vlně, její podskupina – haploskupina A2a, se ve velké míře vyskytuje u Inuitů, Aleutů a také u jazykové skupiny Na Dené (Achilli a kol., 2013). Na Dené je zřejmě poslední vlna, která přišla před Inuity asi před 8 000 lety. Její nositelé se liší od ostatních kmenů etnicky i jazykově. Dodnes se vyskytují hlavně na Aljašce a v západní Kanadě, ale část pronikla i na jih dnešních Spojených států. Patří mezi ně například známí Navaové a Apači (vymyšlený Vinnetou by tak vlastně nebyl úplně pravým Indiánem).

Fagundes a kol. (2008) uvádí, že všechny **domorodé americké haploskupiny, včetně haploskupiny X, byly součástí jediné zakládající populace**, čímž jsou podle autorů vyvráceny multiplikační modely. Autoři využili pro analýzu historie mtDNA haploskupin bayesovskou koalescentní metodu.²¹ Výsledky podporují **přechod asijské populace přes tehdy pevninskou Beringii, přibližně před 19 000 až 23 000 lety**. Nicméně rozdílný model distribuce a frekvence haploskupiny X naznačuje, že může představovat i nezávislou migraci na americký kontinent

²¹ Bayesovská statistika pracuje s podmíněnými pravděpodobnostmi a dovoluje zpřesňovat pravděpodobnost výchozí hypotézy postupně, jak se objevují další data. Metoda se využívá tam, kde se pracuje s nejistými fakty, např. v kriminalistice, financích nebo v lékařství.

(Fagundes a kol., 2008). U haploskupiny X (člení se na podskupiny X1 a X2, které se dále rozdělují na X2a a podobně) se liší větve ze Starého světa X2b–f a větve z Nového světa X2a a X2g ze Severní Ameriky. U původních obyvatel Jižní Ameriky tomu tak není (Perego a kol., 2009). Haploskupina X se vyskytuje v přibližně 7% u rodilých Evropanů (Sykes, 2001) a ve 3% u všech původních Severoameričanů (Malhi a kol., 2002). Haploskupina X se vyskytuje hlavně v Evropě. Jak se tedy dostala do Severní Ameriky? Nejpravděpodobnější vysvětlení je, že ze západu. Jedna teorie tvrdí, že se lidé z jihozápadní Evropy mohli do Ameriky dostat během posledního zalednění severní cestou. Osadníci Ameriky by měli pocházet ze solutreanské kultury²² (Bradley a Stanford, 2004). Proti tomu stojí jiné práce, které tvrdí, že i když haploskupina X není na severu a Čukotce, vyskytuje se na Altaji a právě odtud její nositelé přišli do Ameriky. Severní i jižní Altajci vykazují všechny čtyři asijské a americké indiánské specifické haploskupiny (A–D) s frekvencí 57,2% (Sukernik a kol., 1996), případně podle jiných autorů 46,8% (Derenko a kol., 2000), těmito frekvencemi překračují údaje pro Mongoly, Číňany a Tibeťany. Proto mohou představovat populace, které jsou nejpríbuznější se skupinami Nového světa. A na Altaji se vyskytuje také haploskupina X (Derenko a kol., 2001). Tato hypotéza tak vysvětluje složení mtDNA původních obyvatel Ameriky migrací z Altaje. Také když se podíváme na jednotlivé podskupiny, linie X2a a X2g Nového světa nejsou odvozeny od linií X2b, X2c, X2d, X2e a X2f ze Starého světa. Tyto výsledky poukazují na časný původ linií Nového světa a jejich možnou návaznost na expanzi na Blízkém východu (šíření linií na sebe navazuje) (Reidla a kol., 2003). Nicméně z Altaje na Čukotku je daleko a je zvláštní, že po celé trase se haploskupina X téměř nevyskytuje.

Další asijsko-americkou haploskupinou je B. Předpokládá se, že haploskupina B vznikla v Asii přibližně před 50 000 lety. Pochází z haploskupiny R. Jedná se o jednu z nejčastějších haploskupin v severní a východní Asii, obvykle se nachází ve formě podskupin B4 a B5. Většina linií B v severní Asii spadá do haploskupiny B4, zatímco haploskupina B5 je častější mezi Korejci a Mongoly (Derenko a kol., 2007), ale v menších frekvencích je haploskupinu B možno najít ve většině asijských zemí. Haploskupina B byla zjištěna také u 40 000 let starého, anatomicky moderního člověka z jeskyně Tianyuan v Číně (Fu a kol., 2013). Zde je třeba zmínit také jaderné sekvence u tohoto jedince, které naznačují, že pocházel z populace, která byla předkem mnoha současných Asiatů a domorodých Američanů (Fu a kol., 2013). Do amerických haploskupin řadíme také haploskupinu C, která je potomkem M a vznikla někde ve Střední Asii. V současnosti je ve velké frekvenci přítomna u Evenků na Sibiři. Haploskupina C se dělí na čtyři různé linie

²² Solutréen je mladopaleolitická archeologická kultura, existující asi před 22 až 18 tis. lety. Pojmenování pochází z názvu lokality Solutré v departementu Saône-et-Loire ve Francii.

(C1–C4) s dalšími podskupinami. C2a a C2b jsou běžné na Sibiři, zatímco C2c byla nalezena pouze omezeně u indiánského kmene Ijka v Kolumbii (Volodko a kol., 2008). Ohledně C3 bylo na Sibiři identifikováno několik odlišných linií, ale žádná v Americe. U Evenků u Ochotského moře byla nalezena vzácná podskupina C4 (Volodko a kol., 2008).

U Evenků se také často vyskytuje podskupina C5d1, stejně jako u Jukagiritů (Fedorova a kol., 2015). Jukagirité jsou zanikající jazyková skupina dříve zřejmě poměrně rozšířená na severní Čukotce. Haploskupina D je potomek haploskupiny M a je poměrně rozšířená mezi původními obyvateli Ameriky. Její podskupiny D4b1, D4e1 a D4h se nacházejí jak v Asii, tak v Americe, podskupina D3 se nachází hlavně u některých sibiřských populací a u Inuitů v Kanadě a Grónsku (Helgason a kol., 2006).

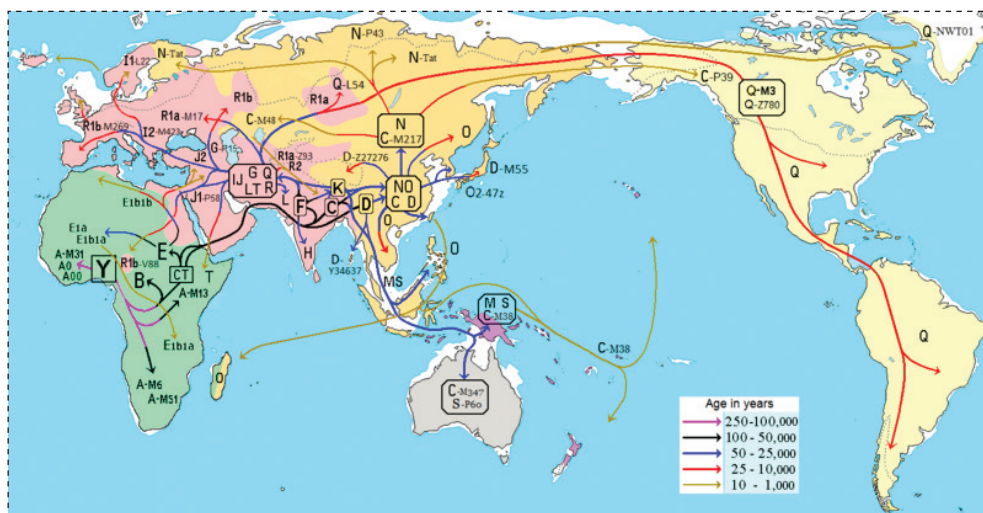
Shrnutí současných představ osídlení Ameriky poskytuje například studie Achilli a kol. (2013). Studie vychází z migračních modelů, do kterých bylo zahrnuto několik klíčových zjištění. Např. z molekulární a fylogeografické analýzy **haploskupiny B2a, která chybí u Inuitů, Aleutů a severních obyvatel Na Dené, plyne, že tato haploskupina vznikla až v Severní Americe před asi 11–13 tisíci lety z B2**. Dále, že haploskupina A2a, která je typická pro Inuity, Aleuty a Na Dené, ale je přítomná také v nejvýchodnějších sibiřských skupinách, vznikla na Aljašce před pouze 4–7 tisíci lety a souvisí s prvním osídlením u Paleo-Eskymáků v severní Kanadě a Grónsku, a přispěla i k vytvoření genofondu Na Dené. Analýza mtDNA poukazuje, že původní Američané ze severu Severní Ameriky (skupiny Na Dené i ne-Na Dené) byli silně ovlivněni dodatečným a genetickým vstupem přes Beringii.²³ Souhrnně je možno říci, že **většina variant mtDNA v Americe pochází z první vlny osadníků z Beringie, která postupovala tichomořskou pobřežní cestou**. Současně s ní nebo po ní následovala druhá migrace s haploskupinami X2a a C4c, které se rozšířily do celé oblasti severu Severní Ameriky. Mnohem později se z Aljašky rozšířili předkové nositelů haploskupiny A2a, kteří pronikli jak na západ do Asie, tak na východ do cirkumpolárních oblastí Kanady. První američtí zakladatelé tak zanechali největší genetický podíl, ale původní složení severoamerických domorodců bylo následně přetvořeno dalšími genovými toky

²³ Paleo-Eskymáci (také Thule, pre-Thule, nebo pre-Inuité) byli lidé, kteří obývali Arktidu na dnešní Čukotce, v Severní Americe a v Grónsku, ale definitivně zmizeli ještě před Kolumbem. Datují se přibližně 3000 př. n. l. až 1300 n. l. Analýzy jejich genomů naznačují, že Arktida byla kolonizována před 6000 lety migrací oddělenou od migrace, která vedla ke vzniku dalších indiánských populací. Kromě toho se zdá, že původní paleo-obyvatelé Arktidy byli zcela nahrazeni přibližně před 700 lety. Paleo-Eskymáci představují migrační impuls do Ameriky nezávislý na expanzi původních Američanů i Inuitů. Genetická kontinuita charakterizující období Paleo-Eskymáků byla přerušena příchodem nové populace představující předky dnešních Inuitů, ale existuje i důkaz, že tok mezi těmito populacemi byl už předtím (Raghavan a kol., 2014).

a dynamikou místní populace, takže vnímat populační události jen jako třífázové změny by bylo příliš zjednodušené (Achilli a kol., 2013).

4.2.2 Mužská linie: chromozom Y

Mužská linie má také své specifické markery a lze stopovat „dějiny podle muže“ (obrázek 4-7). Z otce na syna se přenáší Y-chromozom, kde se sledují jednonukleotidové polymorfismy SNP. Chromozom Y, podobně jako mtDNA, nepodléhá rekombinacím jako jiné chromozomy a přenáší ho pouze muži z otce na syna. Když migrační události popsané v ženských liniích porovnáme s těmi mužskými, očekávali bychom shody. Někdy tam jsou, ale obvykle sledujeme dost odlišnou historii. Většinou mladší. Proč tomu tak je? Při vysvětlení si pomůžeme citací jedné události z Bible: „Vytáhli tedy do boje proti Midiánu, jak Hospodin přikázal Mojžíšovi, a pobili je do posledního muže. Zabili také midiánské krále: Eviho, Rekema, Cura, Chura a Rebu – pět midiánských králů. Také Balaáma, syna Beorova, zabili mečem. Midiánské ženy i jejich děti ale Izraelci zajali. Ukořistili také všechnen jejich dobytek, stáda a veškeré bohatství. Všechna jejich města, v nichž sídlili, i všechny jejich osady vypálili. Zmocnili se veškeré kořisti včetně lidí a dobytka. Všechnu kořist, jíž se zmocnili, i všechny zajatce pak přivedli k Mojžíšovi, ke knězi Eleazarovi a k izraelské obci do tábora na moábských pláních při Jordánu naproti Jerichu. Mojžíš, kněz Eleazar a všichni vůdce obce jim vyšli z tábora naproti. Mojžíš se však na velitele vojska, na vůdce tisíců a stovek, kteří se vraceli z válečného tažení, rozhněval: „Vy jste nechali všechny ty ženy naživu? Vždyť právě



Obrázek 4-7 Mapa světa migrací moderních lidí podle patrilineální genetické historie na základě distribuce a odhadovaného stáří haploskupin chromozomu Y (Lucioni Maristany, 2010b).

ony na Balaámovu radu svedly syny Izraele od Hospodina k Peorovi. Kvůli tomu přišla na Hospodinovu obec ta rána! Pobijte tedy všechny chlapce. Pobijte i každou ženu, která už spala s mužem. Všechny dívky, které ještě nepoznaly muže, si nechte živé“ (Numeri, čtvrtá kniha Starého zákona, kap. 31).“ Midianitské panny si tedy Izraelité vzali jako součást válečné kořisti a ty jediné přežily. Vraždění samozřejmě nebylo vždy takto rozsáhlé, ale co z tohoto příběhu plyne po genetické stránce? Mladé panny byly prodány do otroctví, nebo ušetřeny jako milenky pro vítěze, ale množily se dál a jejich mtDNA pokračovala, zatímco midiánští muži i s jejich chromozomy Y už do dalších generací nešli. Jejich genetická stopa končí. Proto máme šanci zachytit spíš jen chromozomy Y vítězů, ale mtDNA i od poražených. Poražení muži nemusí být nutně pozabijeni, stačí, pokud vítězové nějak vyloučí jejich vklad do další generace, nebo se jejich účast na rozmnožování aspoň výrazně omezí. Uvedme ještě alespoň jeden příklad, aby důkazy nestály na nespolehlivých citátech z Bible, která není psána jako historické dílo. **Byl nalezen masový pohřeb z raného neolitu z období lineární keramiky** (lokalita Schöneck-Kilianstädten), kde se našlo asi 26 jedinců. U nich bylo zjištěno množství zlomenin perimortem, což jasně naznačuje mučení a/nebo zmrzačení obětí. Nebyly tam ale nalezeny pozůstatky mladých žen (Meyer a kol., 2015). Dalším faktorem je poměrně častá situace, kdy má muž několik manželek. Už v lovecko-sběračské společnosti mají **výborní lovci dvě manželky a špatní žádnou**, vzácně vynikající lovci tři či dokonce čtyři, ale pět manželek už nikdo. S kumulací majetku a moci může být efekt ještě výraznější. Polygynie umožňuje většině žen předávat svoji mtDNA do dalších generací. Takže přetrvává méně mužských linií ve srovnání s ženskými a jsou citlivější na genetický drift.

Pro mapování haploskupin chromozomu Y je důležitá rychlost mutací. Bylo zjištěno, že rychlost odpovídala původním odhadům a byla ověřena na mužích, kteří měli před 200 lety společného předka. Dochází k jedné mutaci na generaci na každých 30 milionů párů bází, což je 100–200 nových mutací na jeden Y chromozom při přechodu z jedné generace na druhou (Dolgin, 2009). Byly zmapovány a vytvořeny haploskupiny pro chromozom Y. I zde je na počátku společný předek (Y-MRCA), nazývaný chromozomální Adam. Navzdory vyšší rychlosti mutace mtDNA nabízí mnohem větší délka chromozomu Y nejvyšší genealogické rozlišení ze všech nerekombinujících lokusů v lidském genomu.

Pomocí kalibračních metod byl časově **nejbližší společný předek (MRCA) z hlediska Y chromozomu datován na dobu asi před 254 tisíci lety v Africe** (ovšem na 95 % jde spíše o široké rozmezí před 192–307 tisíci lety). Shluk hlavních Y chromozomálních haploskupin související s kolonizací Eurasie a Oceánie byl datován na poměrně úzký časový interval před 47–52 tisíci lety (Karmin a kol., 2015). **Y chromozomální Adam nemohl žít ve stejné době jako mitochondriální**

Eva. Ale to není samozřejmě nutné, jde jen o to, ze které doby pochází některé části našeho genomu, a biblické pojmenování je jen kvůli popularizaci.

Na rozdíl od demografických rekonstrukcí založených na mtDNA se u linií chromozomu Y našla některá prudká snížení efektivní velikosti populace, která se datují do průběhu posledních 10 000 let. Byl vysloven předpoklad, že toto snížení je způsobeno kulturními změnami ovlivňujícími rozdíly v reprodukčním úspěchu u mužů (Karmin a kol., 2015). Pokles mužské efektivní velikosti populace během středního holocénu odpovídá archeologickému záznamu, kdy je zaznamenáno šíření neolitických kultur, demografické změny a posuny v sociálním chování (Barker, 2006). V zásadě to souhlasí i s archeologickými důkazy pro šíření zemědělství na Blízkém východě, po jihovýchodní a jižní Asii (Bellwood, 2005). Takže paradoxně se lidská populace zvětšuje, ale mužská část jakoby se zmenšovala. Asi se nezmenšovala početně, ale snižovala se variabilita chromozomu Y, takže v praxi to znamená, že někteří muži nechávali hodně potomků a jiní žádné. Heyer a kol. (2005) popisují, že pro lidskou populační genetiku musíme kromě klasických faktorů, jako je mutace, migrace, selekce a drift, počítat ještě s další hybnou silou, a to je kulturní přenos způsobilosti (angl. cultural transmission of fitness, CTF), což je negenetický přenos jakéhokoliv chování, které ovlivňuje reprodukční úspěch (Heyer a kol., 2005). Příkladů je možno i v současnosti najít řadu. Na jedné straně se může jednat o bohaté a populární muže, kteří mají více dětí. Na straně druhé existují muži, kteří se z náboženských důvodů nerozmnožují vůbec, bez ohledu na jejich existenční situaci. Ovšem snížení efektivní velikosti mužské populace, i když fakticky populace roste, lze do určité míry z neolitu rozšířit i na eneolit a dobu bronzovou. Například bylo testováno 334 současných živých mužů, kteří zahrnovali 17 evropských a středovýchodních populací. Data ze tří hlavních linií (I1, R1a a R1b), které tvořily 64 % testovaného vzorku, mají velmi nedávné koalescenční časy,²⁴ které se pohybují v době před 3,5 až 7,3 tisíci lety. Tyto populace sdílí podobnou historii. Výsledky kontrastují s údaji o mitochondriální DNA, což naznačuje rozšířená specifika pro muže, která souvisí se sociální strukturou Evropy v době bronzové (Batini a kol., 2015). Podobné údaje zahrnující některé populace (Afrika, Evropa, Asie) z období před 5–7 tisíci lety vypovídají o zúžení populace, ale jen specificky pro muže. Autoři rovněž navrhuji sociokulturní hypotézu o vytváření patrilineálních rodových skupin a jejich meziskupinové konkurenci (Zeng a kol., 2018), což v překladu do standardního

²⁴ Koalescenční teorie vysvětluje, jak různé genové varianty (alely) v populaci mohly pocházet od společného předka. V nejjednodušším případě koalescenční teorie nepředpokládá žádnou rekombinaci, selekci ani tok genů a pracuje s variantou, že každá alela měla stejnou pravděpodobnost dostat se do další generace. Model zobrazuje situaci v minulosti a slučuje alely do jedné původní, která je předkem mladších. Pracuje také s koalescenčním časem, který umožňuje vysledovat zpětně v čase splynutí alel, a s rozptylem, který zahrnuje náhodný přenos alel z jedné generace na druhou a náhodný vznik mutací.

jazyka znamená tlupy, lépe družiny příbuzných, kteří se vyvražďují s dalšími podobnými družinami a uzurpují si po vítězství ženy na sex. Určitě se muži takto nebavili stále, nicméně natolik často, že se to odrazilo v našich genomech. Ale pro konkrétní představu o době bronzové nemusíme čerpat jen z Bible. V pozdní době bronzové se odehrála Trójská válka. Tedy myslíme tu druhou, ne když Tróju napadl s vojskem Hérakles a co později trvalo Agamemnónovi deset let, zvládl za pár dnů. V *Íliadě* se probírá spor Achillea a Agamemnóna o Bríseovnu, která byla válečnou kořistí, a nikdo se jí na názor neptal. Po skončení války vidíme většinu známých mužských postav z Tróje jako mrtvé (kromě např. Aenea), zatímco ženy jsou Acháji odvezeny. Na rozdíl od Abraháмова rodu ale Achájové nebyli tak vybíraví a nevzali jen panny, ale všechny ženy mladšího věku. Co se týká historie migrací, je u mužů nutno začít od Adama, toho Y chromozomového. Ani on podobně jako mitochondriální Eva nebyl jediný muž ve své době, ale jen jeho chromozom Y pokračoval v průběhu generací do současnosti.

Je asi vhodné připomenout, že stanovení jeho věku souhlasí s odhady doby vzniku moderního typu člověka. V souladu s paleoantropologií je Y chromozomální Adam lokalizován do Afriky. Jedná se o haploskupinu A (A-VI48, A-CTS2809/L991).²⁵ Analýza 2204 afrických vzorků DNA ukázala, že nejhlubší subtypy, což se právě týká haploskupiny A (pozor na záměnu s podobně pojmenovanými haploskupinami mtDNA), se v současné době nacházejí ve střední a severozápadní Africe (Cruciani a kol., 2011). Scozzari a kol. (2012) tyto údaje potvrzují a uvádí jako místo původu severozápadní kvadrant afrického kontinentu. V haploskupině asi nejvíce zaujme linie A00, hlavně pro svůj extrémní věk stanovený na 338 tisíc let, což překračuje věk ostatních linií i anatomicky moderního člověka. Dokonce překračuje i věk společného předka ostatních linií – Y chromozomálního Adama. Tato linie je velmi vzácná. Zřejmě je nutno uvažovat o složitějších modelech chromozomové diverzity. Situaci totiž moc neodpovídá, že jedna dosud existující linie je starší než vypočítaný zakladatel všech linií. Linie A00 byla objevena ve velké databázi zákaznických (soukromých) vzorků Afroameričanů a nebyla identifikována v tradičních populacích lovců a sběračů ze subsaharské Afriky. Později byla v Africe nalezena u lidu Mbo z Kamerunu, ale v malé frekvenci (Mendez a kol., 2013). To je překvapivé – Mbo patří mezi Bantu a nejstarší linie se čekaly mezi Khoisany (Khoikhoiové, Hotentoti) a Sany (!Kungové,²⁶ Křováci). Právě mezi nimi se běžně vyskytují haploskupiny A. Například se u nich nachází podskupina A1b1b2, která byla navíc nalezena u lidských fosilií asi 2000 let sta-

²⁵ Pojmenování haploskupin Y chromozomu se během času měnilo, někdy může mít stejná haploskupina starší i novější název. V současnosti se nejvíc používá nomenklatura Konsorcia Y chromozomu – Y Chromosome Consortium: <https://haplogroup.org/encyclopedia-of-y-dna-origins-2/>

²⁶ !Kungové – vykřičník je tam proto, že je to náš neobratný způsob, jak zapsat hlásky (mlaskavky), které v evropských jazycích nemáme. Mlaskavky se tvoří v ústech jazykem, lícemi či hrtanem.

rých z oblasti Balito Bay v KwaZulu-Natal v Jižní Africe (Schlebusch a kol., 2017). To samozřejmě nejsou příliš staré vzorky, ale je třeba si uvědomit, že pochází z doby, kdy oblast nebyla ještě zasažena lidmi Bantu ani Euroasiaty. Haploskupina A zřejmě nepochází z jižní Afriky, kde se dnes nachází zbytky Khoisanů a Sanů. Výsledky rozsáhlé studie opatrně naznačují její původ ve východní nebo střední části afrického kontinentu a následné migrace do dalších oblastí (Batini a kol., 2011). Haploskupina A je poměrně silně zastoupena nejen mezi Khoisany, ale např. i v dnešním Súdánu. Stojí za připomenutí, že také nejstarší mtDNA haploskupina se vyskytuje ve velké míře hlavně mezi Khoisany. Zde se sbíhají obě nejstarší linie, mužská i ženská. Na afrických populacích byly prováděny statistické testy a z nich vyplývá, že u chromozomu Y existuje korelace mezi vzdálenostmi na genetické a jazykové úrovni, ale žádná korelace mezi vzdálenostmi genetickými a geografickými. Naproti tomu u ženské mtDNA slabá korelace mezi vzdálenostmi geografickými a genetickými existuje. Toky genů se u mužů a žen v Africe lišily (Wood a kol., 2005; Hassan a kol., 2008). A jak je popsáno výše, nebylo to jen v Africe.

Haploskupina B (B-M60) je další typickou africkou haploskupinou. Chromozomy haploskupiny B jsou nejčastěji pozorovány u Pygmejů (48,9 %). Jsou to hlavně podskupiny B2a a podskupina B2b, která je téměř exkluzivní pro pygmejské populace (Wood a kol., 2005). Vysoká frekvence je zvláště u populace Baka – Kamerun a Gabon (Berniell-Lee a kol., 2009). Hodně je haploskupina B zastoupena i v Súdánu (Hassan a kol., 2008), ale nalézt ji je možno vzácně i jinde, například v Íránu u Afroíránců (Gheshmi 8,2 %, Bandari 2,3 %), jak uvádí Grugni a kol. (2012). **Jedná se o potomky otroků z Afriky**, kteří byli v průběhu staletí do Íránu (Persie) dováženi. Podobného původu jsou zřejmě nálezy haploskupiny B z Afghánistánu u národa Hazárů v centrální části země, kde se uvažuje o efektu zakladatele z východní Afriky (Haber a kol., 2012).

V případě chromozomu Y je podobně jako u mtDNA řešena otázka „ven z Afriky“. I zde se podařilo najít haploskupiny, které jsou předky všech ne-Afričanů. Dnešní lidé mimo Afriku **pocházejí hlavně z jediné expanze před asi 50 000–70 000 lety** (dříve jsme uvedli údaj 47–52 tis. let podle jiného autora (Karmin a kol., 2015)). Mnoho podrobností o této expanzi však zůstává nejasných, včetně historie mužského specifického chromozomu Y v této době (Haber a kol., 2019b). Muži, kteří kolonizovali Eurasii, nesli zřejmě haploskupinu CT nebo její přímé potomky. Haploskupina CT však nebyla zatím nalezena, i když musela existovat. Její nositel je někdy označován jako MRCT-CT. Málokterá jiná skupina vyvolává tak rozporuplné názory ohledně původu a migrace. Stručně si představíme spory ve vědeckých pracích na toto téma. Potomky CT je několik linií, které představují prakticky všechny linie mimoafrických mužů. Je to jednak méně rozšířená skupina DE a její potomci. V Africe zůstávají skupiny D0, stará a vzácná podskupi-

na D a skupina E, zatímco tři linie C, D a FT a jejich potomci představují drtivou většinu neafrických chromozomů Y (Haber a kol., 2019b). Naproti tomu starší práce vidí původ haploskupiny D až v Asii (Karafet a kol., 2001, 2008). To by ale podle současných znalostí muselo zahrnovat zpětnou migraci do Afriky. Rodové linie D se nejčastěji vyskytují ve střední Asii (Tibet) a v Japonsku a existují také nízké frekvence v jihovýchodní Asii a mezi Andamanskými ostrovy (Karafet a kol., 2001, 2008). Haploskupina E možná pochází z východní Afriky, nebo se tam dostala zpětnou migrací z Asie během posledních 25 tisíc let (Cruciani a kol., 2004). Výskyt chromozomů E (M8), potomka haploskupiny DE, v Africe úzce odpovídá současné oblasti distribuce berbersky mluvících populací na kontinentu, což naznačuje těsný vztah této haploskupiny a etnické skupiny. Chromozomy E (ale odlišné podskupiny M34) se dostaly do Etiopie z Blízkého východu (Cruciani a kol., 2004). Je možné, že berberský původ je také nutno hledat v Asii. Ostatně severní Afrika u pobřeží Středozemního moře měla v lidské historii vždy blíže k Evropě než k subsaharské Africe.

Poznik a kol. (2015) tuto teorii potvrzují a argumentují, že haploskupina E vznikla mimo Afriku. Svůj model dokládají v rámci rozdělení linií v haploskupině CT tím, že toto řešení vyžaduje pouze jednu kontinentální výměnu haploskupiny (E přichází do Afriky), nikoli tři haploskupiny (D, C, F), které by měly opustit Afriku (Poznik a kol., 2015). Autoři samozřejmě předpokládají, že E vznikla v Asii jako potomek CT. Dále argumentují, že podle dalších haploskupin v předpokládané době asi před 50–80 tisíci lety byl mezi Afrikou a Arábií poměrně značný tok genů. Nicméně to je argument pro obě hypotézy. Trombetta a kol. (2015) v práci propagují africký původ skupiny E hlavně na základě velkého rozšíření této haploskupiny a jejich podskupin v Africe.

Cabrera a kol. (2017) obhajuje asijský původ a snaží se dokládat, že muži haploskupiny E chromozomu Y přišli do Afriky s ženami L3 mtDNA a nahradili původní předchozí místní linie. Co se týká Evropy, zde otázku vzniku tím spíš nevyřešíme. Evropské rozložení haploskupiny E (M78) nepodporuje hypotézu o jednotném šíření lidí z jedné rodičovské populace na Blízkém východě (Cruciani a kol., 2004). Zřejmě se haploskupina E do Evropy nedostala jednorázově, ale s různými vlnami migrantů. Zaměříme se raději už na čistě mimoafrické haploskupiny, kde se zdá vše přehlednější. Začneme u CF, která zahrnuje většinu neafrických linií. CF je potomek CT. S žijícími nositeli CF je problém v tom, že už zřejmě neexistují, i když Brunelli a kol. (2017) uvádí pět procent u mužů jazykové skupiny Shan (Thajsko, Barma, Laos, sousední oblasti Číny).²⁷ Ovšem jednalo se vlastně jen o jeden případ z dvaceti, tedy o jednoho jediného muže, a kritiky na-

²⁷ Jazyková skupina Shan patří do tajska-kadajské jazykové skupiny a vznikla asi v jihovýchodní Číně na ostrově Chaj-nan. Brunelli a kol. (2017) také uvádí, že šlo asi o poměrně nedávnou migraci.

padá, zda byla analýza provedena správně. Mnohem zajímavější je potomek CF, haploskupina C (M 130), která je označována za ideální pro poznání starověkých migrací (Zhong a kol., 2010). Distribuční vzorec pro skupinu C podporuje cestu z Afriky přes indický subkontinent a osídlení východní Asie asi před 40 tisíci lety. Na Sibiř se dostala asi před 15 tisíci lety a potom se její nositelé dostali i do Ameriky. I když jsou jedinci haploskupiny C rozptýleni po celé Eurasii, zdá se, že síť podskupin je různě geograficky rozmístěná a tyto podskupiny byly dlouho poměrně izolované (a celkově je haploskupina C v Evropě méně častá), jak vyplývá z práce Zhonga a kol. (2010).

V Austrálii u původních obyvatel je haploskupina C a její dceřiné skupiny rozšířena ve velkém měřítku. Izolace původních obyvatel trvala asi 30 tisíc let, což potvrzují také údaje z mtDNA (Nagle a kol., 2015). Nagle a kol. (2015) prezentují data, která podporují hypotézu o více než jedné migrační cestě do australské oblasti, někdy nazývané Sahul,²⁸ přes Novou Guineu asi před 50 000 lety a nepodporují kolonizační události během holocénu, ať už z Indie nebo z jiné oblasti.

Velmi významným potomkem haploskupiny CF je haploskupina F (M89), která je mateřskou skupinou mnoha dalších skupin a společně představují více než 90 % světové mimoafričské populace. Haploskupina F byla už v původní migraci z Afriky, nebo vznikla brzo potom. Ostatně její haploskupiny se v subsaharské Africe vyskytují velmi málo. **Zakladatel skupiny F žil asi před 60 000 až 80 000 lety, přibližně v době migrace z Afriky**, i když není vyloučeno, že skupina vznikla až v dnešní Indii (Sengupta a kol., 2006; Karafet a kol., 2008). Existují určité důkazy o pozdně glaciálních disperzích ze Středního východu na íránskou plošinu, což potvrzuje právě haploskupina F a také haploskupina IJ (M429) (Grugni a kol., 2012). I když dnes je v Íránu skupina F vzácná, je to jeden z důkazů směrů paleolitického šíření jejích nositelů. Na základě rozmístění F a také dalších haploskupin se považuje Střední východ za oblast, odkud vycházely pozdní glaciální expanze a pozdější neolitické expanze na jih a na západ do jihovýchodní Evropy (Grugni a kol., 2012). Střední východ je zřejmě místo, kam se během poslední doby ledové stáhli lidé z dalších oblastí, pravděpodobně kvůli příznivějšímu klimatu. Nositelé haploskupiny F se asi do Evropy dostali hlavně s neolitickou expanzí. Haploskupina F je však v dnešní Evropě vzácná (Szécsényi-Nagy a kol., 2015). Analýza DNA ze dvou lidí starých 37 000–42 000 let z Peštera cu Oase v Rumunsku potvrdila v jednom případě na chromozomu Y haploskupinu F, typ, který je běžný i pro dnešní muže v Eurasii (Fu a kol., 2015). Pro nás je zajímavé, **že tuto haploskupinu nesl i muž z Věstonic (před asi 30 tisíci lety, kultura gravettien)** (Fu a kol., 2016). Zda to byl Kopčem, Veverčák, nebo Mamutík se bohužel nepodařilo zjistit.

²⁸ Sahul je technický název pro pevninskou Austrálii, Tasmánii, Novou Guineu, Seram a sousední ostrovy.

Bazální skupina GHIJK se zatím nenalezla u žijících lidí ani u fosilních nálezů, avšak je předkem dalších důležitých linií, mezi které řadíme zejména haploskupinu G (M201). Ta je společně s kmeny J2 spojována s šířením zemědělství, zejména v evropském kontextu. Dnes je rozšířena po celé Eurasii a s osadníky ze Starého světa přišla také do Ameriky. Odhaduje se, že vlast této haploskupiny je někde poblíž východní Anatolie, Arménie nebo západního Íránu, což jsou jediné oblasti, které jsou charakterizované souběžnou přítomností hlubokých bazálních větví této skupiny (Rootsi a kol., 2012). Poslední výsledky mluví pro Anadolii. Byly analyzovány celé genomy, jednak lovce a sběrače starého 15 tisíc let a pak také sedmi raných anatolských a levantských zemědělců. Byla zjištěna vysoká genetická kontinuita (asi 80–90 %) mezi lovci a sběrači a prvními zemědělci z Anatolie. Byly u nich také detekovány dvě příměsi, které zřejmě pocházely od příchozích předků: raný íránský/kavkazský a druhý související se starou Levantou²⁹. Konkrétně 10 % genů prvních zemědělců souvisí s neolitickým Íránem/Kavkazem, zatímco pozdější obyvatelé z období keramického neolitu odvozují asi 20 % svých genů z jiného odlišného genofondu, který souvisí s neolitickou Levantou (Feldman a kol., 2019). Ovšem bližší podrobnosti tohoto míšení během neolitu jsou zatím neznámé. Existují velké časové mezery mezi dostupnými genomy, a tak nelze určit, jak k těmto změnám v genofondech došlo (Feldman a kol., 2019). Jako poslední byla zjištěna genetická souvislost mezi jižní Evropou a Blízkým východem z doby před 15 000 lety. Byly nalezeny Y haploskupiny Cl2, které jsou známé u některých prvních evropských lovců a sběračů, ale také haploskupiny C a G2a u místních prvních zemědělců. Výsledky studie naznačují omezenou roli lidské migrace při vzniku zemědělství ve střední Anadolii (Feldman a kol., 2019). Je možno říci, že Anatolie nebyla jen odrazovým můstkem v pohybu raných zemědělců z úrodného púlměsíce do Evropy, ale spíše místem, kde místní lovci a sběrači začali efektivně využívat rostliny a technologie, což vedlo ke vzniku zemědělského způsobu života (Feldman a kol., 2019). Stručně, zemědělství vytvořili lovci a sběrači v Anadolii a pak ho začali sami roznášet dál po Eurasii. Z pozdější doby přibližně před 7 tisíci lety byly v neolitu dnešního Španělska nalezeny Y haploskupiny G2a a Elb1b1a1b, podobně jako v pozdně neolitickém období z Francie (Lacan a kol., 2011). V současné době je haploskupina G v Evropě přítomna v poměrně malých frekvencích. Ojedinele se nachází populační ostrovy, kde se jí vyskytuje více, a mohou to být zároveň i skutečné ostrovy, jako je Sardinie (Zei a kol., 2003), nebo se jedná o pohoří. Na pomezí Evropy a Asie je Kavkaz, kde je haploskupina G třetí nejběžnější u některých zdejších populací (Nasidze a kol., 2003). Proč ale tato skupina, během neolitu tak rozšířená, ve většině Evropy zmizela, je otázka,

²⁹ Levanta je označení pro oblast východního Středomoří. Dříve byl používán v užším termínu pro oblast dnešní Sýrie, Libanonu, Jordánska, Izraele, Palestiny a části Turecka. V širším pojetí je to rozsáhlá oblast mezi pohořím Taurus na severu, Arabskou pouští na jihu a na východě pohořím Zagros.

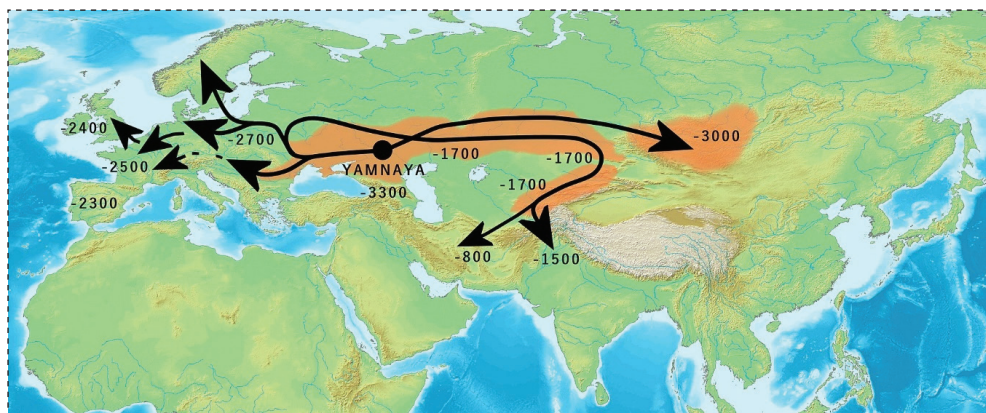
na kterou se pokoušíme odpovědět na začátku kapitoly. Zřejmě ji vlny agresivních migrantů, ať už v době bronzové, nebo jindy, vyhladily, nebo neumožnily přechod do dalších generací.

Přímým potomkem haploskupiny GHIJK je skupina HIJK, která je zatím známa pouze z aDNA staré asi 15 tisíc let. Ta byla nalezena v paleolitické Evropě (magdalénien), v jeskyni Goyet v Belgii (Fu a kol., 2016). Dceřiná skupina IJK je předkem řady dalších skupin, ale mezi žijícími muži se vyskytuje jen ve formě svých potomků. Byl ale nalezen jeden případ původní formy, a ten byl objeven v našich Dolních Věstonicích (před asi 30 tisíci lety, kultura gravettien) (Fu a kol., 2016). Mezi potomky haploskupiny IJK řadíme haploskupinu IJ (M429), která se dnes vyskytuje vzácně a byla nalezena na íránské náhorní plošině spolu s další bazální dříve zmíněnou haploskupinou F (Grugni a kol., 2012). Mezi dosud existující potomky řadíme zejména haploskupinu J (především podskupiny J1-M267 a J2-M172), které jsou široce rozšířeny mezi současnými Araby na Arabském poloostrově, s nejvyšší frekvencí v Jemenu, přes 80 %, v menších frekvencích, řádově 1–5 %, v Evropě, kde však frekvence dost kolísají podle lokalit (El-Sibai a kol., 2009). Tuto haploskupinu lze najít i na východě. Rodové linie J2 (M172) pravděpodobně vstoupily do Číny během migrace Středoasijských na východ. Ovšem vliv ze západní Eurasie prostřednictvím toků genů na existující etnické skupiny v severozápadní Číně byl relativně slabý (Shou a kol., 2010). Četnost a distribuce rozptylu haploskupin J a I naznačují původ na Blízkém východě v mezolitu a tato oblast se jeví jako genetický rezervoár pro pozdní glaciální expanze a následné neolitické disperze na jih a na západ do jihovýchodní Evropy (Grugni a kol., 2012). Takže na konci poslední doby ledové končící asi před 10 tis. lety (würmský glaciál) **začíná pochod mužů s touto skupinou do okolí a nabývá na intenzitě s neolitickou expanzí.** Dá se předpokládat, že v Evropě dosahovala v neolitu vyšších frekvencí než v současnosti, podobně jako v případě G. Původ zmiňované haploskupiny I je více nejasný. Podle jiných autorů se zdá, že haploskupina I vznikla v Evropě, vyskytuje se v paleolitických lokalitách Evropy (Fu a kol., 2016), ale ne mimo ni. Někde se musela oddělit od společného předka IJ (asi před 43 000 lety) (Karafet, 2008). Její raná sesterská haploskupina J byla nalezena na Kavkaze a v Íránu (Jones, 2015; Fu a kol., 2016). Dalo by se tedy očekávat, že tam bude také původ I. Na Středním východě se přece dodnes vzácně vyskytuje její předek – IJ. Ovšem zatím se haploskupina I jeví jako převážně evropská a je možné, že skutečně vznikla až v Evropě, a to někdy v průběhu paleolitu. Navíc byla nalezena u muže z období gravetienu před 33 tisíci lety v dnešní Itálii, u dalšího z období před 15 tisíci lety v období magdalénien v Německu a u mladopaleolitického muže z období před asi 13 tisíci lety z Francie (Fu a kol., 2016). Je třeba připomenout, že kromě Evropy je v současnosti silně zastoupena také na Kavkaze, avšak nesou ji ve vysokých

frekvencích v této oblasti pouze některé národy. Její distribuce je dost nerovnoměrná (Dargové /Dargwa/ 58 %, Abcházové 33 %, Severní Osetinci 32 %), ale jinde na Kavkaze je jen ve frekvenci 13 % a menší (Nasidze a kol., 2004a, 2004b). Velké frekvence haploskupiny I můžeme v současnosti najít na Balkáně (Pericić a kol., 2005). Naopak nízké frekvence jsou zaznamenány na pyrenejském poloostrově (Adams a kol., 2008). Poměrně vysoké jsou zase ve Skandinávii (Rootsi a kol., 2004). Bude užitečné blíže diskutovat příslušné podskupiny. Podskupina I1a tvoří většinu haploskupiny I ve Skandinávii, ale frekvence rychle klesá směrem jak k východoevropské nížině, tak k atlantickému oceánu. Rozmanitost v mikrosatelitech však ukazuje, že zdrojovou oblastí časného šíření jak I1a, tak I1b2 a méně časté skupiny I1c by mohla být Francie. Podskupina I1b se vyskytuje od východního Jadranu k východní Evropě, ale znatelně klesá směrem k jižnímu Balkánu s periferií v severní Itálii. I1b se pravděpodobně rozptýlila po posledním glaciálním maximu z vlasti ve východní Evropě nebo na Balkáně (Rootsi a kol., 2004). Podstatné je, že tyto migrace se odehrály někdy před 9 tisíci lety. Pokud je ale v Evropě haploskupina I už předneolitická, proč je stále v tak vysokých frekvencích? Jak to, že muži s touto haploskupinou nebyli více nahrazeni? Nebo byla také silně zastoupena v některých vlnách migrantů a útočníků v pozdějších dobách? Je to možné, i když zatím spekulativní. Většina migrací po období neolitu probíhala do Evropy z východu. Další známá velká migrace je indoevropská, která začala asi někdy v době před rokem 3000 př.n.l., tedy asi před 5 tisíci lety. Expanze zřejmě souvisí s ovládnutím jízdy na koni a vznikem válečné jízdy, ať už přímo, nebo na vozech. Jak se stal kůň z jatečného zvířete dopravním prostředkem a kdy byl osedlán a proč byly někdy používány válečné vozy, je problematika, která poněkud přesahuje náplň kapitoly. Expanze Indoevropanů má více hypotéz. První je, že jde vlastně o neolitickou migraci z Anatolie. Druhá hypotéza navrhuje, že Indoevropané jsou původní Evropané. Ale nejvíce důkazů se hromadí pro stepní hypotézu. Zopakujme, že expanze zřejmě souvisí s válečnou jízdou, která je pro kočovné pastevce poměrně přirozená. Nicméně v důsledku této expanze se objevují národy, které už mnohdy známe jménem. Ve stepích, o které nám nyní jde, jsou to Sarmaté, Skythové, Alani, Kimerijci, Sakové, Massagetové atd. Ti jsou údajně íránského původu, což se traduje zřejmě na základě jejich jazyka. Jazyková příbuznost je asi v pořádku, ale o původu těchto kočovníků v samotném Íránu lze z genetického hlediska úspěšně pochybovat. Mnozí vidí jejich původ spíše ve Střední Asii. Avšak s Íránem lze najít četné, a to i genetické provázanosti. Část jejich předků asi skutečně z dnešního Íránu přišla. Všechny tyto známé kmeny kočovníků z pozdější historické doby jsou možná v zásadě Indoevropané s původním stylem života. Právě takoví se po zvládnutí techniky jízdy a boje na koni rozjeli do všech stran. Na východě jsou známí jen Tochaři a Skythové na Altaji,

ale dá se očekávat, že takových národů bylo poblíž dnešní Číny víc. Na jihu se do Indie dostali Árijové, do Íránu Médové a Peršané, do Malé Asie Luvijci a Chetitě a vzhledem k tomu, že většina Evropy mluví indoevropskými jazyky, vyjma starších Basků a pozdějších Ugrofinů (Maďaři, Finové, Estonci), se dá předpokládat, že nájezdy Indoevropanů na Evropu byly úspěšné. Je vhodné zdůraznit, že se asi jednalo o řady expanzí ze stepí během staletí. Některé jsou historicky zaznamenané, ale o starších nemusí být nic známo. S Indoevropany se však spojuje haploskupina R1b a R1a, nikoliv I. Podívejme se na obě tyto haploskupiny, i když genealogicky bychom si nejdříve měli všimnout jejich předků, haploskupin K a P. Indoevropané se zřejmě šíří z jámové kultury (angl. Yamnaya, ukr. ямна, rus. Ямная), která se nacházela mezi Černým a Kaspickým mořem (**obrázek 4-8**) (Narasimhan a kol., 2019).

Jak se dostala haploskupina I do těchto oblastí? Asi tam doputovala ze západu, hlavně z Balkánu, ještě před expanzí Indoevropanů. Například v Bělorusku se haploskupina I skládá z mnoha genetických vstupů, zejména ze severozápadního Balkánu (I2a (P37)) a v menší míře ze západní a severozápadní Evropy (I1 (M253), I2b (M223)) (Kushniarevich a kol., 2013). Ale jak je to s muži přímo v jámové kultuře? Podle očekávání tam výrazně převažuje haploskupina R1b, která se nejčastěji nachází jak v jámové kultuře, tak i mezi současnými západoevropany (Haak a kol., 2015). Haak a kol. (2015) se stručně dotýkají i námi probíraného nahrazování. Uvádí, že například haploskupina mitochondriální DNA N1a (v případě Y chromozomu haploskupina G2a), která byla běžná u raných středoevropských zemědělců, téměř zmizí během eneolitu a doby bronzové. Tyto haploskupiny jsou do značné míry nahrazeny jinými haploskupinami Y, zejména R1a a R1b a haploskupinami mtDNA – I, T1, U2, U4, U5a, W a podtypy, jako je H (Haak a kol., 2015).



Obrázek 4-8 Šíření pastevců ze stepí z jámové kultury v době bronzové (podíl předků jámové kultury vychází z dat aDNA v každé oblasti; pro předky obyvatel severní Indie a jižní Indie zatím neexistuje žádná aDNA, takže v těchto případech je rozsah odvozen statisticky /Jonathan, 2020/).

Haploskupinou I se studie nezabývá, přestože je mezi současnými Evropany zastoupena hodně. Nicméně je pravděpodobné, že pokud byla součástí indoevropských expanzí, není to ze vzorků příliš poznat. Ostatně vzorků z jámové kultury není zmapován statisticky významný počet a nejsou testy ze všech dostupných lokalit této kultury, takže je možné, že frekvence haploskupiny I je podceněna. Nicméně přesto tam detekována byla. Z dvanácti analyzovaných jedinců jámové kultury bylo jedenáct haploskupiny R1b, konkrétně podskupiny R1b-L23, a jeden jedinec byl zařazen do haploskupiny I2a2a1b1b (Mathieson a kol., 2015). V jiné práci Mathiesona a kol. (2018) nesl jeden muž z jámové kultury z Bulharska také haploskupinu I2a2a1b1b. V další studii byly analyzovány pozůstatky čtyř jedinců jámové kultury z Kavkazu. Zde se daly očekávat odlišnosti, protože kavkazské populace se i dnes mnohdy geneticky odlišují mezi sebou i od okolních oblastí. A tam pouze jeden muž nesl nejvíce očekávanou haploskupinu R1b (podskupina R1b1a1a2) a pokud jde o mtDNA, byly nalezeny skupiny U5a1 a T2a1 (Wang a kol., 2019). V těchto posledních uvedených studiích jsou však už haploskupiny Y nebo mtDNA jen dva ze sledovaných znaků. Analyzují se celé genomy a rozložení SNP a jedinci se tak dají porovnávat mnohem komplexněji. Vytváří se klastry podle rozložení SNP za účelem seskupení jednotlivců do populací a zkoumání vztahů mezi nimi. Jednotlivci se řadí do datových souborů z hlediska jejich genetické příbuznosti s hypotetickou sadou populací předků, kterou je vyznačen jejich genetický původ (Mathieson a kol., 2018).

Pokud shrneme původ současných Evropanů, můžeme definovat **tři hlavní zdroje**. Za prvé **lovci a sběrači**, spjatí hlavně s původními mezolitickými evropskými lovci a sběrači, ti se dělí na „východní“ (EHG, east hunter-gatherer) a „západní“ (WHG, west hunter-gatherer). Za druhé jsou to **zemědělci ze severozápadní Anatólie**. A třetí zdroj je „stepní“, který zasáhl Evropu během přechodu eneolitu³⁰ do doby bronzové a vychází z populací, které jsou odvozené **od stepních pastevců jámové kultury** (Mathieson a kol., 2018). Odkud se vzali obyvatelé jámové kultury? Podle současných údajů komplexní analýzy SNP vychází z použitých modelů, že se jedná o směs. Jedna část předků pochází z východních lovců a sběračů (EHG), druhá část předků je z paleolitických lovců a sběračů Kavkazu a třetí ze zemědělců, kteří dorazili ze severního Íránu (Mathieson a kol., 2018). Jako přímého pokračovatele jámové kultury se obvykle chápe katakombní kultura. Ve studii založené na mtDNA sekvenace odhalila, že lidé z jámové a katakombní kultury nebyli geneticky smíšení. Při analýzách mtDNA nebyly brány v potaz jen klasické haploskupiny, ale uplatnila se analýza SNP. Zástupci katakombní kultury nesli hlavně mtDNA linie H a U haploskupiny. U je typická pro evropské

³⁰ Období, kterému se u nás říká eneolit, má v různých zemích odlišné pojmenování – Chalcolithic, Eneolithic, Aeneolithic, Copper Age, Late Neolithic (např. ve Velké Británii).

předzemědělské lovce a sběrače. Geny katakombní kultury nejsou příliš významně zastoupeny v moderních evropských populacích. Jámová kultura nese větší rozmanitost linií mtDNA typických pro příliv zemědělců z Anatolie (již zmíněný dříve). Tato rozmanitost je charakteristická pro anatolský demický příliv genů (Pashnick, 2014). Je možné, že data jsou příliš omezená, nebo skutečně katakombní kultura příliš geneticky nenavazuje na jámovou. Také je třeba poznamenat, že data z mtDNA jsou sice stále přínosná, ale zajímavé by byly také komplexní analýzy SNP z celého genomu. Nicméně Wang a kol. (2019) identifikovali v jednom ze tří jedinců katakombní kultury na chromozomu Y podskupinu R1b1a2 typickou pro jámovou kulturu a Indoevropany. Obě kultury se částečně časově překrývají. Katakombní kultura je v porovnání s jámovou kulturou mladší a pokračuje dále na území Ukrajiny. Nicméně jámová kultura nechala na území dnešní Ukrajiny více potomků. Takováto zjištění nezní příliš logicky, proto asi bude dobré na řešení nepříliš přehledné situace počkat na další data.

Studováno je pokračování jámové kultury v Evropě, a to nejen kulturně, ale i geneticky. Je možné, že se jedná o genetickou příbuznost k jedincům kultury se šňůrovou keramikou, ale tuto spojitost je třeba v budoucnu prokázat podrobnějším výzkumem. Jistá souvislost je vidět na mtDNA úrovni. To naznačuje, že na migraci ze stepi se podílely také ženy. Se zvyšující se geografickou vzdáleností od stepní oblasti se však zvyšuje zastoupení mtDNA od neolitických zemědělců (Juras a kol., 2018). To je další potvrzení teze o likvidaci původní mužské populace. **Hlouběji na západ se pravděpodobně více vrhaly oddíly mladých mužů, aby získaly vlastní území a místní ženy. Zatímco do blízkce podrobených zemí šly i ženy z původní kultury.** Hypotéza, že výskyt haploskupin R1a a R1b souvisí s expanzí během pozdního neolitu (eneolitu) a rané doby bronzové, je potvrzena také dalšími údaji. Před obdobím pozdního neolitu byl zatím mimo dnešní oblasti Ruska nalezen na západě pouze jediný jedinec R1b (rané neolitické Španělsko) (Haak a kol., 2015). Později se našel i druhý – haploskupina R1b byla identifikována u 14 000 let starého jedince z Villabruny v Itálii (Fu a kol., 2016). Naproti tomu haploskupiny R1a a R1b byly nalezeny u 60 % Evropanů z eneolitu/doby bronzové, a to i mimo dnešní Rusko. Poznamenejme, že většina vzorků z oblasti dnešního Ruska (období 7 500–2 700 př. n. l.) obsahuje právě tyto haploskupiny. Dnes jsou haploskupiny R1a a R1b nejběžnější v mnoha evropských populacích (Haak a kol., 2015). 75 % předků obyvatel šňůrové kultury z eneolitu z dnešního Německa má původ v jámové kultuře, což dokumentuje masivní migraci do srdce Evropy z její východní periferie (Haak a kol., 2015). Haak a kol. (2015) genetickými argumenty podporují představu šíření indoevropských jazyků z východních stepí. Při analýzách genomu se dá samozřejmě zjistit o tehdejších lidech mnohem více než jen polymorfismy SNP. Jak vlastně tehdejší Evropané převážně vypadali? Spíše vyšší,

častěji **hnědé oči, tmavší vlasy a měli světlou kůži**, ale o něco tmavší, než je dnes v Evropě běžné (Wilde a kol., 2014). Pokud se u obyvatel v eneolitu objevovaly modré oči, tak pocházely zřejmě od mezolitických lovců a sběračů (Mathieson a kol., 2015). Světlá barva očí se u Evropanů objevuje téměř současně ve vzorcích z Itálie a Kavkazu před asi 14 000–13 000 lety (Fu a kol., 2016).

Nezmínili jsme se ještě o předcích haploskupiny R a o některých dalších širěji rozšířených haploskupinách chromozomu Y. Potomkem IJK je kromě už probíraných I a J také K, což je haploskupina definovaná složitěji než jednou mutací. Existuje pět mutací, které určují čtyři různé linie K. Haploskupina K1 je dosud v nízké frekvenci v Indii a Pákistánu. Rodové linie K2, K3 a K4 se nacházejí v Oceánii, Indonésii a v Austrálii. K2 byla přejmenována na novou haploskupinu a dále se označuje T (Karafet a kol., 2008). Diferenciace podskupiny K2 se odhaduje na 50 tisíc let (Poznik a kol., 2016). K2a byly nalezeny v paleolitu na západní Sibiři (Ust'-Ishim) a v Rumunsku (Oase 1), stáří 37–42 tisíc let (Fu a kol., 2015; Poznik a kol., 2016). Podtřída K2b je největší a zahrnuje dvě skupiny K2b1 a K2b2. Z K2b1 se vydělují haploskupiny M a S (K-P60 a K-P79). Z K2b2 vychází haploskupiny P a její podskupiny Q a zmiňovaná R. R a Q tvoří většinu otcovských linií v Evropě, Střední Asii a Americe. Odhady časových intervalů, kdy došlo k větvení mezi K (M9) a P (P295), tedy k oddělení haploskupiny P, ukazují na počáteční rychlý proces, kterým se rozdělovala původní haploskupina K (M526). Oddělování pravděpodobně nastalo v jihovýchodní Asii, s následnými expanzemi předků haploskupin R a Q na západ (Karafet a kol., 2015). Mluvíme nyní stále o migracích lovců a sběračů v paleolitu v době před 40–50 tisíci lety. Samotná R vzniká až později. V současnosti je K2b1 omezena hlavně na východní Indonésii, Oceánii, Austrálii a Filipíny, nalézá se u populace Aeta, tedy původních obyvatel, a má velmi nízký výskyt v jihovýchodní Asii a západní Indonésii (Karafet a kol., 2015). Další haploskupina, která sice nyní není příliš rozšířená, ale měla v minulosti významné potomky, je haploskupina P (P295, M45, K2b2). Tato haploskupina pravděpodobně vznikla někde ve Střední Asii a šířila se na jižní Sibiř, kde je dnes v některých populacích ve vysokých frekvencích zvláště u Tuvinců (Sojoti, Urjanchajci, Тывалар), kde je 22–35 %. Podobně některé nepočetné populace jižního Altaje (Altaians-Kizhi) nesou frekvence 28,3 %. Jedná se o Šory (Shors, Shorians, шор-кижи), Teleuty a Tofalary (Karagasové, Тофалары, Тофа) (Derenko a kol., 2006). V Evropě se objevuje v relativně vysoké frekvenci 14 % jen na jednom místě na ostrově Hvar. Připomínáme, že tam se také nalézá výše zmíněná „asijská“ mtDNA haploskupina F. Autoři uvažují o vlivu Avarů (Barac a kol., 2003), což vzhledem k dlouhému pobytu Avarů v Panonii je jistě pravděpodobnější, než že se jedná o potomky Mongolů. Příímým potomkem je haploskupina P1 (M45 + M124), která vykazuje podobný výskyt jako P, například opět

na jižním Altaji (Derenko a kol., 2006), maximum lze najít ve Střední Asii a nízké frekvence v Evropě, na Středním východě a ve východní Asii (Wells a kol., 2001; Derenko a kol., 2006). P1 byla nalezena také u dvou obyvatel severovýchodní části Sibiře asi 31 tisíc let starých. Tato populace z naleziště u řeky Jany byla z velké části nahrazena národy pocházejícími z dnešních východních Asiatů, kteří patří také k předkům původních domorodých Američanů (Sikora a kol., 2019). Je to příklad, že i paleolitické populace lovců a sběračů nahrazovaly jedna druhou, není to tedy fenomén až z neolitu. Potomkem P je haploskupina Q, která je dnes velmi rozšířena hlavně v Asii a u původních domorodých Američanů. Je značně rozšířená u některých národů na Altaji (Dulik a kol., 2012). Haploskupina Q pravděpodobně přišla do Severní a Jižní Ameriky z Altaje, vyplývá to z rozdílů mezi obyvateli Altaje a jinými lidmi severní Asie, na základě srovnání SNP chromozomu Y. V této starší studii vychází oddělení amerických linií na dobu před 10 100–17 200 lety. Tato haploskupina je přítomna v Americe dodnes ve vysoké frekvenci 76,4 % (Zegura a kol., 2004). Naskytá se otázka, proč se tak často objevuje v pátrání po dějinách lidstva právě Altaj. Není to náhoda. Stačí se jen podívat na přírodní podmínky na Altaji a například na zdejší druhy savců. Byla zjištěna výrazná podobnost v ekologické struktuře mezi nedávnými východními altajsko-sajanskými savčími skupinami a srovnatelnými pleistocénními faunami. Zdá se, že fauna doby ledové přetrvává až do současnosti v oblastech, kde lesní pás neodděluje alpskou vegetaci od stepí a pouští (Pavelková a kol., 2014). Samozřejmě tam už nenajdeme mamuta a nosorožce srstnatého, ale menší druhy, včetně měkkýšů, odpovídají Evropě v době ledové. Navíc step a poušť se poměrně často během několika staletí mění jedna v druhou, a pokud kočovníkům krajina vyschne, stahují se do refugií (z lat. refugium – útočiště), kde se dá pást dobytek a přežít. Jakmile se step obnoví, opět ji zaplňují a vznikají kočovnické říše. Dobře je to vidět třeba právě na indoevropských Skythech, kteří mizí ze stepí, stahují se na Altaj, a pak v osmém století př. n. l. vyráží opět do stepí (Geel a kol., 2004; Panyushkina, 2012), vytlačují od Černého moře Kimmerijce a dostávají se až do Evropy, překračují Kavkaz a napadají Médy a Asyřany a jejich další větev se dostává až do Indie. Tento jev migrací kočovníků, který souvisí s vysycháním a obnovou stepí, se cyklicky opakuje a zřejmě se týkal i lovců a sběračů. Jedno z nejvýznamnějších refugií Asie je právě Altaj (Pavelka, nepublikováno). Kolikrát a jak se podobné kočovnické expanze konaly v předhistorické době mezi 3000–1000 př. n. l., by bylo dobré podrobněji prozkoumat, nejen jako v případě kultury se šňůrovou keramikou. Vraťme se ještě k haploskupině Q, ta se vyskytuje v Číně, Kazachstánu, v Mongolsku, v Koreji, u Ujgurů, v jihozápadní Asii i v Iránu atd. obvykle v poměrně malých frekvencích přibližně od 2–6 %, vzácněji někde i více (Wen a kol., 2004a; Yan a kol., 2011; Well a kol., 2001; Di Cristofaro a kol., 2013; Kim

a kol., 2011; Regueiro a kol., 2006). Posledním významným potomkem haploskupiny P1 je R, o jedné z podskupin R jsme se zmínili v souvislosti s Indoevropany. Původní zakládající R se už nevyskytuje, kromě jednoho sporného případu z Afghánistánu. Byl také nalezen jeden příklad bazální R haploskupiny, a to u 24 tisíc let starých pozůstatků, nalezených v kultuře Malta a Bureť poblíž jezera Bajkal na Sibiři (Raghavan a kol., 2013). O to víc jsou důležité podskupiny – zmiňovaná haploskupina R1b1b2 (R-M269) je nejběžnější evropská Y-chromozomální linie, jejíž frekvence se zvyšuje z východu na západ a nese ji 110 milionů evropských mužů (Balaesque a kol., 2010). Jedná se o nejčastěji se vyskytující otcovskou linii v západní Evropě, stejně jako v některých částech Ruska (např. baškirská menšina), našla se také ve střední Africe (např. Čad a Kamerun). Haploskupina je také v nižších frekvencích po celé východní Evropě, můžeme ji nalézt v západní Asii a také v částech severní Afriky a střední Asie.

Stručně zmiňme ještě několik důležitých haploskupin. Šíření zemědělství v Indii je spojeno s drávidy, kteří jsou převážně v jižní části země a v minulosti byli zřejmě i na severu do vpádu vlny indoevropských kočovníků a dalších etnických skupin. V současnosti je v Indii haploskupina L chromozomu Y ve frekvenci 7–15 %, ale existuje ve frekvenci asi 28 % v západním Pákistánu a Balúčistánu, odkud zřejmě pochází indiští zemědělci (McElreavey a Quintana-Murci, 2005; Qamar a kol., 2002; Mahal a Matsoukas, 2018). Počátky této haploskupiny lze vysledovat ke značce M11 na chromozomu a geograficky do hornaté oblasti pamírskeho uzlu v Tádžikistánu (Wells, 2007), kde byl také identifikován archeologický komplex Bactria-Margiana. Jedná se o civilizaci Oxus, existující kolem 4000 př. n. l. (Lamberg-Karlovsky, 2002; Mahal a Matsoukas, 2018). Studium Indie, dnes rozdělené na Indii a Pákistán, je velmi zajímavé a ukazuje spletené dějiny v mnoha obdobích. Například data z chromozomu Y podporují tradovaný původ Párů³¹ z Íránu, původ Hazárů³² od Mongolů a původ černochů v oblasti Makránu³³ z Afriky, ale nepotvrdily se tradice, které tvrdí, že některá etnika mají původ tibetský, syrský, řecký nebo židovský (Qamar a kol., 2002).

Od haploskupiny K2a je odvozena haploskupina NO. Žijící jedinci příslušející k NO jsou poněkud sporní, a pokud opravdu existují, nebude jich mnoho. Z fosilních nálezů se dá k této haploskupině přiřadit už zmíněný asi 45 000 let

³¹ Párové jsou skupina dnes asi 100 tisíc lidí, kteří podle tradice uprchli do Indie během muslimského dobytí Persie (636–651), ale možná až později mezi 8. a 10. stol. n. l., aby se vyhnuli perzekuci po dobytí Persie muslimy.

³² Hazárové jsou persky mluvící etnikum v Afghánistánu a Pákistánu. Jejich původ je nejasný, údajně jde o potomky směsi mongolských, turkitských a íránských vojáků po invazi Mongolů a následném vzniku Ilchanátu, což byl jeden ze čtyř chanátů Mongolské říše.

³³ Makrán je oblast u Arabského moře, patří k Íránu a pákistánskému Balúčistánu. Vyskytuje se zde etnikum Siddi (Sidi, Siddhi, Sheedi nebo Habshi), které existuje i v Indii. Pochází z východoafrických Bantuů. Do oblasti se dostali jako námořníci, obchodníci, otroci, žoldnéři apod.

starý člověk moderního typu nalezený na břehu řeky Irtyš poblíž osady Ust'-Ishim na západní Sibiři (Omská oblast, Ruská federace), kterého je možná lepší přiřadit k mateřské skupině K2a. Je navíc zajímavý tím, že pochází z populace, která žila před – nebo současně s – oddělením populací v západní a východní Eurasii. Má podobné množství genomu neandrtálského původu jako lidé v současnosti. Nicméně nese genomické segmenty neandrtálského původu podstatně delší než segmenty pozorované u současných jedinců, což naznačuje, že tok neandrtálského genu do předků tohoto jedince nastal 7 000–13 000 let před tím, než žil. Nemá ale nic z Denisovanů (Fu a kol., 2014). Jeho genom je spjatý se současnými Asiaty a s 8 000 až 24 000 let starými jedinci ze západní Eurasie, ale ne se současnými Evropany. Podporuje tedy hypotézu, že Evropané odvozují část svého původu z populace, která se neúčastnila počátečních migrací moderních lidí do Evropy a Asie (Fu a kol., 2014). Podíváme se nyní na potomky haploskupiny NO – na sesterské podtypy N (M231) a O (M175). O skupina je relativně stará (asi 30 tisíc let) a zahrnuje drtivou většinu východních a jihovýchodních asijských mužských linií, stejně jako významnou část mužů Oceánie. Na druhou stranu analýza haploskupiny N naznačuje, že její vysoká frekvence ve východní Evropě je způsobena novější expanzí na západ, a to severní cestou z nitra Asie, nebo z jižní Sibiře, přibližně před 12–14 tisíci lety (Rootsi a kol., 2006). V současnosti je skupina N rozšířena na Sibiři, ale nevyskytuje se u domorodých Američanů. To zřejmě znamená, že k šíření skupiny N došlo až po migraci do Ameriky. Nejčastěji se vyskytuje podtřída N3, která vznikla pravděpodobně v oblasti dnešní Číny a následně se šířila i na Sibiř a později i do východní Evropy. Další větev je skupina N2, kterou tvoří dvě podskupiny haplotypů, asijský (N2-A) a evropský (N2-E). Druhý z nich je nyní většinou distribuován v ugrofinských a příbuzných populacích. Tyto migrace jsou zřejmě ze značné části ještě paleolitické, vychází z východního asijského zdroje a míří k severozápadní Evropě (Rootsi a kol., 2006). Haplotypy N a O byly nalezeny na archeologických nalezištích v údolí řeky Západní Liao v Číně v širokém časovém rozpětí před 6500 až 2700 lety (Cui a kol., 2013). Údolí řeky Západní Liao má dlouhou historii lidského osídlení od paleolitu. Výzkumníky zajímalo, zda se tam postupně nahrazovaly jednotlivé populace. A zdá se, že ano. V lokalitě existují značné genetické rozdíly mezi jednotlivými populacemi v prehistorickém období. Tyto prehistorické populace nesou sice podobné haplotypy jako dnešní severovýchodní Asiaté, ale ve výrazně odlišných frekvencích (Cui a kol., 2013). Výsledky naznačují, že prehistorické kulturní přechody byly spojeny s imigrací z údolí Žluté řeky a severní stepi do údolí Západní řeky Liao. Je poznat nárůst rozmanitosti linií způsobený přílivem přistěhovalců z jiných populací (Cui a kol., 2013). Haploskupina Y chromozomu O (M134) je jednou z nejhojnějších otcovských linií ve východoasijských populacích, která zahrnuje asi 13 % čínských mužů Chan a je

také běžná v kazašské, korejské, japonské, thajské atd. (Ning a kol., 2016). Jiné literární zdroje uvádí vyšší čísla. Tvrdí, že haploskupina O včetně jejích podskupin je u 20–35 % čínských chanských mužů (Yan a kol., 2011). Haploskupina N má širokou geografickou distribuci po celé severní Eurasii a občas ji je možno najít i v jiných oblastech, včetně Střední Asie a Balkánu (Karafet a kol., 2001; Xue a kol., 2006). Existuje mnoho dalších podrobností, které nebylo možno v rámci této knihy uvést, např. jak jsou zmapovány migrace do Japonska. Ale jako základní přehled současných závěrů a směrů výzkumů čtenáři snad postačí.

Existuje řada firem, které poznatky o lidských migracích využívají ke komerčním testům pro zájemce o genealogii (např. „Family tree DNA“, „MyHeritage“). Je to velmi výhodné, protože mnoho žijících lidí je takto zmapováno a ještě za to sami zaplatí. V současnosti jsou k dispozici testy pro mtDNA a chromozom Y. Je pravda, že obojí je pro poznání historie dobré mapovat v populacích, ale o konkrétním člověku nemusí tyto malé kousky genomu podat dostatečné množství informací. V případě, že má člověk k dispozici surová data, je možné je nahrát na server GEDmatch, což umožňuje získat další informace o haploskupině sledovaného jedince.

4.3 Lidská DNA

4.3.1 Muž z ledovce, Ötzi

Několik jedinců z minulosti bylo kompletně sekvenováno. Mezi nejznámější patří genom Ötziho, což je přezdívka pro mumii nalezenou v Ötztalských Alpách. Jedná se o člověka z eneolitu z období 3400 až 3100 př.n.l. (Bonani a kol., 1994). Průzkum mumie přinesl velké množství cenných informací o oblekání, zbraních, potravě v eneolitických Alpách a také množství informací o jeho zdravotním stavu. Zde bychom se měli zastavit u informací vyčtených z jeho DNA. Nejkomplexnější výsledky přineslo sekvenování nové generace (viz výše). Byla využita jedna z těchto metod, nazvaná Solid, která využívá emulzní PCR a reakce probíhající na 1 µm velkých paramagnetických kuličkách. Na těchto kuličkách jsou přichyceny fragmenty DNA tak, aby každá kulička nesla jeden fragment. Každá kulička je zapouzdřená v oleji a v kapce vody kolem ní probíhá právě jedna PCR reakce. Kuliček je velké množství, a tak lze sekvenovat v jednom běhu až přes miliardu bází. Každá báze je pak čtena dvakrát. Je to relativně přesná metoda (Valouev a kol., 2008). Keller a kol. (2012) uvádí, že ledový muž patřil ke skupině G chromozomu Y, která je sice málo četná v současné Evropě, ale velmi častá u západoevropských neolitiků (Lacan a kol., 2011). Podtřída G2a4-L91 ho řadí nejbližší k dnešním obyvatelům Sardinie a Korsiky (Keller a kol., 2012). **Ötzi měl**

pravděpodobně hnědé oči, patřil do krevní skupiny 0 a zřejmě nemohl trávit laktózu. Sekvenování odhalilo Ötziho predispozici k ischemické chorobě srdeční (CHD). Také byla ve vzorku z pánevní kosti nalezena sekvence spirochety odpovídající ze 60 % *Borrelia burgdorferi* (Keller a kol., 2012). To je jedna z bakterií způsobujících lymskou boreliózu. I když existují zpochybnění, že u Ötziho nejde o *B. burgdorferi*, ale o jiný druh borelií, nelze pro tyto názory dohledat seriózní ověřitelné informace. Shoda 60 % není obecně dostačující pro spolehlivé určení druhu. Borelie ale nejsou jedinými nebezpečnými bakteriemi v těle Ötziho, které se podařilo identifikovat. V jeho žaludku se našla rovněž bakterie *Helicobacter pylori* způsobující žaludeční vředy a různé gastritidy. Nalezený kmen se liší od současných evropských kmenů, které jsou hybridy mezi asijskými a africkými bakteriemi. Existují různé hypotézy o tom, kdy a kde k hybridizaci došlo, což odráží komplexní demografickou historii Evropanů (Maixner a kol., 2016). U Ötziho je *H. pylori* téměř čistým zástupcem bakteriální populace asijského původu, která existovala v Evropě před hybridizací, což naznačuje, že africká populace dorazila do Evropy během několika posledních tisíc let (Maixner a kol., 2016). Pravděpodobnou příčinou úmrtí Ötziho byl hrot šípů, který pronikl mezi hrudní koš a levou lopatku (Murphy, 2003). Nicméně pozdější ohledání ukazuje na možný silný úder do hlavy. **Na výbavě Ötziho se našly stopy DNA dalších osob.** Jedna byla nalezena na noži, dvě na jednom (stejném) hrotu šípů (Ötzi měl několik vlastních šípů) a čtvrtá na oblečení. Nález se dá interpretovat tak, že Ötzi hrotem jednoho šípů dva lidi zabil. Jde o hypotézu pravděpodobnější, než že mu zranění dali hrot šípů zpět. Krev na oblečení patří zřejmě zraněné osobě, kterou Ötzi nesl na zádech (Loy, 1998; Fagan a Durrani, 2015). U nože se nedá odhadnout, zda DNA patří nepříteli, nebo jím např. odstraňoval hrot šípů z těla zraněnému příteli. Jde však skutečně jen o hypotézu a skutečný příběh Ötziho se zřejmě nikdy nedozvíme.

4.3.2 Neandrtálci

Předpokládá se, že neandrtálci z území Evropy zmizeli před asi 39 000–41 000 lety. Neandrtálská DNA vždy přitahovala pozornost vědců. Byla osekvenována kompletní mtDNA a bylo prokázáno, že mtDNA neandrtálců se liší od současné moderní lidské mtDNA. Vzájemné **rozdělení fylogenetických linií bylo stanoveno na dobu 660 000 ± 140 000 let** (Green a kol., 2008). Výzkumníky velmi zajímala varianta možného křížení neandrtálců s našimi předky. Práce z roku 2004 uváděla, že sekvenovaná mtDNA neandrtálců byla vzájemně příbuzná a přitom vzdálená současným lidem (Serre a kol., 2004). Práce navíc upozorňovala, že pokud se některé neandrtálské linie mtDNA podobají moderním lidem, mohou být taková data považována za kontaminace současnou lidskou DNA. Novinové články té doby si často výsledky přeložily po svém a tvrdily, že ke křížení vůbec nedocháze-

lo. Další výzkum ale křížení potvrdil – **neafričané zdědili 1 až 3 % svého genomu po neandrtálských předcích**. V rámci studie bylo získáno velké množství introgresních sekvencí s neandrtálským původem (Vernot a Akey, 2014). Jako introgrese označujeme inkorporaci alel z jedné entity, myšleno obvykle druhu, do genové skupiny odlišného druhu (obvykle hybridizací a zpětným křížením). Východní Asiaté mají v průměru vyšší úroveň neandrtálských genů než Evropané, což může být způsobeno rozdíly v reprezentativnosti vzorků, nebo také větší mírou introgrese u východních Asiátů, případně tato situace vznikla dalším dosud neznámým způsobem (Vernot a Akey, 2015). Autoři na základě modelování vyvozují, že reálné jsou v zásadě dva demografické modely. První zahrnuje další vlnu neandrtálského genového toku do genetické informace předků východních Asiátů a druhý uvažuje ředění neandrtálských linií u Evropanů nějakou další populací předků (Vernot a Akey 2015). Model představený Kimem a Lohmuellerem (2015) rovněž preferuje více genových toků z neandrtálských populací u východních Asiátů.

Nabízí se rovněž otázka, jaký druh genetické výbavy jsme od neandrtálců vlastně získali. Řada sekvencí od neandrtálců kóduje proteiny a funkční oblasti DNA, takže zřejmě ovlivňují fenotyp současných lidí (Sankararaman a kol., 2014). Oblasti genomu, které mají vysokou frekvenci neandrtálských alel, jsou například obohaceny o geny, které ovlivňují keratinová vlákna. To by naznačovalo, že **neandrtálské alely mohly pomáhat moderním lidem přizpůsobit se jiným prostředí než africkým** (Sankararaman a kol., 2014). Opak představují geny, které jsou více exprimovány ve varlatech. Jejich projev je v organismech současných mužů redukován, což by mohlo souviset se snižováním plodnosti u moderní populace (Sankararaman a kol., 2014). V oblasti neandrtálských genů pro varlata, ale i pro mozek, dochází k down-regulaci, což je regulace směrem dolů, v těchto tkáních se tedy snižuje exprese genů ve srovnání s jinými tkáněmi. Celkově se však ukazuje, že zděděné neandrtálské sekvence nejsou nefunkčními zbytky DNA z dávného křížení, ale mají měřitelné dopady na expresi genů v moderních lidských fenotypech (McCoy a kol., 2017). Byl analyzován příspěvek neandrtálských genů u více než 1000 fenotypů u přibližně 28 000 Evropanů a zjistilo se, že neandrtálské alely jsou spojeny s variabilitou v řadě znaků včetně takových, jako jsou sklony k depresím, riziko kožních lézí způsobených slunečním zářením (aktinická keratóza), hyperkoagulace a sklony k užívání tabáku (Simonti a kol., 2016). Dalo se vcelku očekávat, že staří Evropané měli větší podíl neandrtálských genů než 3 %, jako mají lidé současní, a to se potvrdilo. Sekvence aDNA z 37 000–42 000 let starých vzorků z moderních lidí z Peštera cu Oase v Rumunsku potvrdilo 6–9 %. Tři chromozomální segmenty neandrtálských předků jsou větší než 50 centimorganů, což naznačuje, že tento jedinec měl neandrtálského předka teprve před čtyřmi až šesti generacemi. Nicméně není zde alelická shoda s pozdějšími Evropany, takže tato populace zřejmě nepřispěla ke genomu současných Evropanů (Fu a kol., 2015).

4.3.3 Denisované

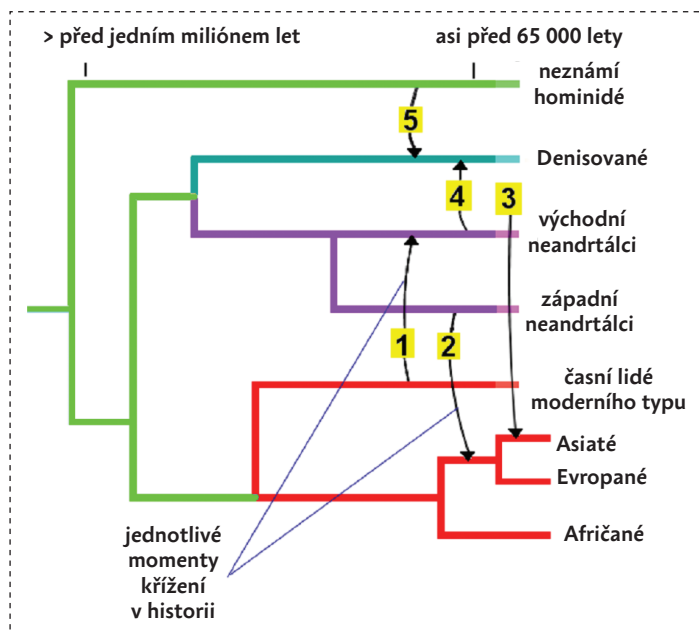
Jak je uvedeno výše, sekvenování neandrtálského genomu prokázalo, že většina lidského genofondu ukazuje na africký původ; přibližně 1–3 % z genomu všech lidí pak pochází z oblastí mimo subsaharskou Afriku a je neandrtálského původu (Pääbo, 2015). Kromě toho až 5 % genetické informace původních obyvatel Oceánie pochází od denisovanů, což jsou vzdálení příbuzní neandrtálců, kteří byli poprvé identifikováni sekvenováním na základě historické mtDNA z kostí jednoho prstu nalezeného v Denisově jeskyni na Altaji (Krause a kol., 2010). Jméno „denisované“ není zatím oficiálně taxonomicky určené. Používají se provizorně názvy *Homo denisova*, *Homo altaiensis* nebo *Homo sapiens denisova*.

Analýza celých genomů neandrtálského, denisovanského a současného člověka poskytla **důkaz nejméně o třech dalších genových tocích**: první probíhal od neandrtálců k předkům mnoha současných skupin v Asii, další pak od neandrtálců k denisovanům a třetí k denisovanům od zatím neznámého hominida, který se oddělil od ostatních linií alespoň před miliónem let (Pääbo, 2015). Samozřejmě se dá očekávat, že sekvenováním dalších vzorků se mohou zjistit další či upřesňující informace. Stejně jako v jiných případech zabývajících se aDNA je zatím k dispozici poměrně málo dat. Křížení mezi lidmi moderního typu, neandrtálci, denisovany a dosud neznámými hominidy ukazuje **obrázek 4-9**.

Celý genom neandrtálce byl získán z nálezu neandrtálské ženy na Sibiři. Výsledky přinesly zajímavé odhalení o tamější populaci. Rodiče této ženy byli ne-

Obrázek 4-9

Historie křížení mezi lidmi moderního typu, neandrtálci, denisovany a dosud neznámými hominidy v průběhu posledních 100 000 let (upraveno dle Callaway, 2016; typy křížení: 1. časní lidé moderního typu a neandrtálci, 2. lidé a neandrtálci, 3. lidé a denisované, 4. neandrtálci a denisované, 5. denisované a zatím neznámí hominidé.



vlastními sourozenci a i mezi jejími předky docházelo k příbuzenskému křížení (Prüfer a kol., 2014). Vedle toho byl sekvenován i genom neandrtálců z Kavkazu (Prüfer a kol., 2014). Vzorky více jedinců pak byly využity pro analýzu mtDNA. Porovnáním bylo určeno příbuzenství všech neandrtálců oproti skupině současných lidí a bylo také zjištěno, že denisované stojí geneticky mimo obě skupiny. Naproti tomu porovnávání některých autozomálních transverzí došlo k jiným závěrům. Podle nich jsou neandrtálci a denisované více příbuzní navzájem a odlišnější od současných lidí (Prüfer a kol., 2014). Jako transverze označujeme bodové mutace, kdy se mění jeden nukleotid za jiný. U transverze jde konkrétně o záměnu purinové báze za pyrimidinovou nebo pyrimidinové za purinovou.

Situace je však zřejmě ještě složitější. Podařilo se sekvenovat mtDNA ze španělské jeskyně Sima de los Huesos a tato mtDNA má blíže ke vzorkům denisovanů než k neandrtálcům. Toto zjištění je poměrně překvapivé, protože jako místo původu denisovanů bývá označována východní Asie. Řada expertů v souvislosti s tímto faktem navrhovala nejrůznější teorie (Callaway, 2013). Později se navíc ukázalo, že naopak jaderná DNA z kostí v jeskyni patří neandrtálcům (Meyer a kol., 2016). Kostí jsou datovány do doby před 430 000 lety. Z toho vznikla úvaha, že rozdělení denisovanů a neandrtálců předchází dobu před 430 000 lety a fond mtDNA u neandrtálců se změnil později (Meyer a kol., 2016). Nejvyšší podíl denisovanské DNA v DNA současných lidí byl prozatím nalezen u 33 populací z Asie a Oceánie. Patří mezi ně například domorodci Australané, lidé z Oceánie, Polynésané, Fidžijci, východní Indonésané a Mamanwa (skupina „Negrito“ z Filipín), obyvatelé Nové Guineje a původní obyvatelé ostrova Bougainville, který leží blízko Papui-Nové Guineje. Nepatří však mezi ně všichni obyvatelé východní Asie (např. západní Indonésané, populace Jahai z Malajsie nebo populace lidí Onge, patřící mezi tzv. Negrito z Andamanských ostrovů). Tok genů denisovanů tedy nebyl rovnoměrný do celé východní Asie, nicméně je jasné, že archaičtí denisované museli žít v mimořádně širokém zeměpisném a ekologickém rozsahu, od Sibíře po tropickou Asii (Reich a kol., 2011).

4.4 Archeogenetika zvířat

Nedílnou součástí archeogenetiky je také studium zvířat. Starší práce vycházely převážně z porovnávání mtDNA, která je v aDNA nejvíce zachována. Historická aDNA byla použita ve fylogenetických pracích, které se zabývaly studiem příbuzenských vztahů vymřelých a dosud existujících druhů. Podařila se například přečíst sekvence mtDNA u druhů jako jeskynní medvěd (Hänni a kol., 1994), vakovlk (Krajewski a kol., 1997), novozélandský moa (Cooper a kol., 2001), tygr

kaspický (Driscoll a kol., 2009), vymřelá středomořská koza (Ramírez a kol., 2009) a několika dalších.

Mezi druhy zvířat, které se ocitly v centru pozornosti výzkumníků, zaujímá přední místo skot. První práce se datuje již do roku 1996 (Bailey a kol., 1996). Ze studií vyplynulo, že současný domácí skot je spíše blízkovýchodního než místního evropského původu (Troy a kol., 2001). Zjistilo se, že původní evropští praturři se geneticky lišili od moderního skotu. Byly vytvořeny dva klady, jeden nazvaný „T“, který představuje moderní skot, a druhý „P“ podle původních praturů. Oba klady se dále dělí na podskupiny označené čísly. Proces domestikace byl však pravděpodobně složitější než představa, že neolitici prostě přivedli předovýchodní skot do Evropy a ten tu přežil do současnosti a pouze podléhá šlechtění. Situaci komplikuje i rozložení evropských praturů, které zřejmě nebylo jednotné. Srovnávání jejich genomů s předovýchodními může být tedy zavádějící. Většina italských předneolitických praturů spadá do mtDNA skupiny „T“ (Beja-Pereira a kol., 2006), tedy podobně jako u předovýchodního skotu. V severní a střední Evropě byla u praturů nalezena pouze skupina „P“ a žádná „T“, i když v jednom případě neolitu dnešního Německa (lokalita Eilsleben, stáří vzorku bylo pomocí radiokarbonového datování určeno na 5830 ± 29 let) byl nalezen jeden zcela odlišný haplotyp, označený jako „E“ (Edward a kol., 2007). Vzhledem k výskytu mtDNA a haplotypů „P“ a žádných domestikovaných „T“ u praturů v severní a střední Evropě se zdá, že domácí dobytek byl držen odděleně od divokých praturů a introgrese byla extrémně vzácná (Edward a kol., 2007). I další práce potvrzuje, že evropské krávy praturů se do domestikovaných předovýchodních zvířat zřejmě vůbec nedostávaly (Scheu a kol., 2015). Tento výsledek však může být ovlivněn tím, že se studovala jen samičí linie. V dobách prvních zemědělců i v pozdějších fázích se dobytek pásł poměrně volně, nikoliv v uzavřených ohradách, a je tedy na místě otázka, zda je skutečně vyloučeno páření domestikovaných krav s volně žijícími pratury. Práce Götherströma a kol. (2005) naznačuje, že problém by mohly rozhodnout sekvence Y chromozomu (SNP na chromozomu Y). Skutečně byly nalezeny chromozomové haplotypy severoevropských plemen skotu, které jsou podobnější haplotypům ze starých exemplářů evropských praturů než současným plemenům skotu z jižní Evropy a Blízkého východu. **To předpokládá místní hybridizace s býky pratura,** které zanechaly otcovský otisk v genetickém složení moderních středoevropských a severoevropských plemen (Götherström a kol., 2005). Další studie však tuto práci zpochybnily, protože výsledky se při testování dalších zvířat nepotvrdily, snad to bylo z toho důvodu, že byly testovány vzorky aDNA ze široké geografické oblasti, zatímco většina historických vzorků ve studii Götherström a kol. (2005) pocházela z malého regionu ve východním Německu (Bollongino a kol., 2008; Svensson a Götherström, 2008), a tak je otázka vlivu evropských, zvláště

severních praturů na genetickou výbavu současného evropského skotu nejasná. Byl dokonce nalezen důkaz o začlenění divokých zvířat do stáda domácího skotu. Jednalo se o zvířata z neolitického období na území dnešního Švýcarska na břehu jezera v oblasti Circum-Alpine (Schibler a kol., 2014). Není však jasné, nakolik šlo o ojedinělou událost, nebo častější praxi.

Situace je složitější i na úrovni mtDNA. Na Balkáně, tedy na místě, kudy zřejmě do Evropy proudil domestikovaný předovýchodní skot, byla objevena nová podskupina kladu „T“, označená T6. Tato haploskupina představuje 75 % populace starověkého a 20 % současného bulharského brachycerního (krátkorohého) skotu (Hristov a kol., 2016). Jinde než na Balkáně se nevyskytuje, nebo zatím nebyla nalezena. Na opačném konci Evropy, v jeskyni Portalón v lokalitě Atapuerca v severním Španělsku, byl sice mezi vzorky skotu z doby bronzové nalezen haplotyp T, podskupiny T3, která dnes mezi evropskými plemeny dominuje, ale byla tam objevena i haploskupina T1 ze vzorku datovaného do roku 1800 př. n. l. Tento haplotyp je africký. Výsledek naznačuje prehistorické africko-pyrenejské kontakty a podporuje interpretace některých archeologických nálezů, které spojují rané africké a pyrenejské kultury (Anderung a kol., 2005). Domestikace a migrace zdomácnělého skotu proto zřejmě nebyla přímočará.

Novější práce více využívají i jiných oblastí genomu než jen mtDNA nebo SNP (single nukleotide polymorphism) na chromozomu Y. Využívá se zejména SNP na jiných částech genomu, kterých bylo využito například **pro studium dvou typů vodních buvolů**. První typ je charakterizován jako bažinný, druhý jako říční. Zde nejde o analýzu aDNA, ale o analýzu současné DNA za účelem studia dějů v minulosti. Studované typy buvolů mají odlišné morfologické a behaviorální rysy, různé karyotypy a geografický výskyt. Dosažené výsledky se do značné míry shodují s předchozími archeologickými, historickými a molekulárními daty, která předpokládají existenci dvou nezávislých domestikačních událostí (jednu pro říční a druhou pro bažinné buvoly) v indicko-pákistánském regionu a v blízkosti hranic s Čínou nebo Indočínou. Výsledky geografické a distribuční analýzy naznačují, že se vodní buvol šířil dvěma směry. Říční buvoli migrovali na západ od indického subkontinentu, zatímco buvoli bažinní migrovali ze severní Indočíny cestou na východ, či jihovýchod. Tato data naznačují, že současné rozdělení diverzity vodních buvolů bylo formováno více faktory a jednalo se o více migračních událostí, ke kterým došlo v různých fázích postdomestikační historie druhu (Colli a kol., 2018).

Pomocí SNP byla porovnávána i **současná plemena francouzských koz** a i přesto, že se jedná o analýzy současných zvířat, jsou získané výsledky důležité i s ohledem na minulost. V této studii byl využit datový soubor složený z 54 000 SNP (Illumina, kozí DNA čip), který byl použit k analýze genetické

rozmanitosti 223 jedinců patřících do osmi francouzských plemen (Alpine, Angora, Corse, Fossés, Poitevine, Provençale, Pyrénées a Saanen). Výsledky analýz odhalily, že francouzská plemena jsou jasně diferencovaná, zejména plemeno Angora, které pochází z jihozápadní Asie. Provensálské plemeno vykazuje velmi originální genetický původ, který by mohl být výsledkem příměsí ze starověku (Oget a kol., 2019).

Domestikace byla zkoumána také u prasat (*Sus scrofa*) – jedná se hlavně o práci Larsona a kol. (2005, 2007). Práce vychází z informací získaných z historických sekvencí mtDNA divokých i domácích prasat z různých časů a lokalit. Zahrnuje linie domestikace v Evropě, Asii a Oceánii. Hlavní závěr práce pro Evropu je, že **prasata z Blízkého východu byla do Evropy přivedena dvěma cestami**: první sledovala oblast podél Dunaje a druhá severní pobřeží Středozemního moře (Larson a kol., 2007). Následně byla domestikována původní evropská prasata, která rychle dominovala nad příchozími. Jedná se tedy o odlišný scénář než u skotu. V Evropě možná nešlo o skutečně nezávislou událost, ale spíše o přímý důsledek zavedení domácích prasat na Blízkém východě časnými farmáři (Larson a kol., 2005, 2007). Jednalo by se pak o transport myšlenky na domestikaci, resp. domestikáčnického postupu, tedy že by bylo dobré zkusit zvířata chovat a ne jen lovit, nikoliv o transport zvířat.

Pro naše území byla také uskutečněna menší studie, ze které plyne, že u prasat převládala jedna mtDNA linie nazvaná „HT06“ (případně „GL222“, „EH29“ – viz GenBank, databáze NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/55233202>). Ta byla nalezena u všech sledovaných vzorků – testováno bylo 17 vzorků, z toho 10 úspěšně; 8 bylo neolitických a dva středověké (jeden z nich z Moravy z Přerova a druhý z 12. století z Kladruhu u Plzně). Jediná linie u všech vzorků napovídá jejímu výraznému rozšíření na našem území a zřejmě svědčí pro určitou separaci od jiných regionů a možná i existenci místního domestikáčnického centra (Pavelka, 2007). Toto zjištění odpovídá představě o několika evropských domestikáčnických centrech (Larson a kol., 2005, 2007) a je také ve shodě se studiemi Larsona a kol. (2005, 2007), kde vysvětluje domestikaci evropských divokých prasat, ať už nahrazením příchozích, nebo převzetím myšlenky na domestikaci.

Velké množství prací se zabývá domestikací kura domácího. Starší z nich mapovaly spíše původ domestikovaného kura, novější se zabývají změnami genomu během domestikace. **Původ kura domácího lze hledat v jižní a jihovýchodní Asii.** Jako výchozí druh byl identifikován kur bankivský (*Gallus gallus*), jak panovala dlouholetá představa, ale v současných chovech se nachází také příměs kura Sonneratova (*G. sonneratii*) (Eriksson a kol., 2008). Postupné poznání genomové sekvence urychluje poznání klíčových mutací, které určují morfologické rozdíly mezi divokými plemeny rodu *Gallus* a domácími plemeny (Tixier-Boichard a kol., 2011). Novější práce se zaměřují na objasnění příčiny biologických rozdílů mezi

divokými zástupci kurů a jejich domestikovanými příbuznými. Kromě nukleotidových mutací jsou při vývoji ptáků důležité další typy variability v genomu. Jedná se zejména o sekvence pro ribozomální RNA, telomery, satelitní DNA a další, kde docházelo během domestikace ke změnám (Piégu a kol., 2019).

Při studiích o domestikaci koně byly zjištěny zajímavé informace. I když mají koně největší počet mateřských linií (mtDNA) ze všech domácích druhů, jsou jejich otcovské linie na chromozomu Y extrémně homogenní. V zásadě se tak jedná pouze o jedinou linii. Další linie chromozomu Y se pak objevuje u koně Převalského. Bylo analyzováno 1961 sekvencí mtDNA, z toho 207 aDNA a 1754 mtDNA moderních koní. Vzorky byly shromážděny v oblastech od Aljašky a severovýchodní Sibiře po Pyrenejský poloostrov; z časového hlediska se jedná o období od pozdního pleistocénu po moderní dobu (Cieslak a kol., 2010). Během pozdního pleistocénu se vyskytovala tzv. panmiktická populace. Výskyt byl geograficky poměrně rozsáhlý – od Aljašky až po Pyreneje. Později, během raného holocénu a eneolitu, se pro euroasijské stepi a Pyrenejský poloostrov dají rozlišit více či méně oddělené subpopulace. Data naznačují domestikace na více místech a introgresi klisen, zejména v době železné. Zřejmě všechny euroasijské regiony přispěly ke genetickému původu moderních plemen, ale většina haplotypů má své kořeny ve východní Evropě a na Sibiři (Cieslak a kol., 2010). Bylo nalezeno 87 historických haplotypů (od pleistocénu do středověku); 56 z těchto haplotypů bylo pozorováno také u domácích koní, i když dosud bylo u moderních plemen potvrzeno přežití pouze 39 haplotypů. Během posledních 5 500 let tak zaniklo nejméně sedmáct haplotypů raných domácích koní. Autoři dospěli k závěru, že velká rozmanitost linií mtDNA není produktem šlechtění zvířat, ale ve skutečnosti představuje variabilitu předků (Cieslak a kol., 2010).

Z dalších mnoha archeogenetických či paleogenetických prací se zastavme alespoň u ikonického **mamuta** (*Mammuthus primigenius*). Mamutí genom je dnes osekvenovaný a mamutům jsou věnovány četné práce. Například byly porovnávány genomy zvířat z doby před 44 800 lety z pozdního pleistocénu ze severovýchodní Sibiře a jednoho z posledních mamutů starého asi 4 300 let z Wrangelova ostrova. Oba genomy jsou podobné. Avšak mamut z Wrangelova ostrova má míru heterozygotnosti redukovanou o 20 % a také dvacetiosminásobné zvýšení četnosti homozygotních genů (Palkopoulou a kol., 2015). Populace na ostrově nemusela vymřít z důvodů příbuzenského křížení (inbreedingu), možná v tom hrály roli jiné faktory, nicméně zvýšená míra homozygotity a snížená genetická rozmanitost³⁴

³⁴ Homozygot je jedinec, jehož genotyp je ve sledovaném znaku tvořen jediným typem alel. Heterozygot je jedinec, jehož genotyp je v daném lokusu tvořen odlišnými alelami umístěnými na homologních chromozomech. Tento stav se označuje jako heterozygotnost (heterozygocie). Během příbuzenských křížení klesá počet heterozygotů, tím klesá genová variabilita a snižují se adaptační schopnosti celé populace. Může se to projevovat celkově sníženou životaschopností těchto jedinců nebo jejich menším vzrůstem.

je typická pro řadu ostrovních populací větších zvířat. Jak také autoři uvádí, pro pochopení genetického pozadí vymírání by bylo potřeba podrobně rekonstruovat demografickou historii druhu, která zatím není vypracovaná. Genetický vliv na vymírání na Wrangelově ostrově zůstává ještě nejasný. Vymření mamutů na kontinentech je samozřejmě jiná otázka, která ale zatím do archeogenetiky nepatří. Uveďme ale jednu z hlavních otázek – proč mamuti přežili všechny doby meziledové a vymřeli až v té poslední? Byl to vliv člověka nebo změn v prostředí, které v předchozích dobách meziledových neprobíhaly, případně obojí? Na tyto otázky snad odpoví další výzkum v této oblasti.

4.5 Paleomikrobiologie

Evropou se přehnalo mnoho různých epidemií, často označovaných jako mor. Zjistit, jaké to skutečně byly infekce a zda mohou být stále nebezpečné i v současnosti, je také jedním z úkolů archeogenetiky. Jednou z historických otázek byl mor v Athénách v Periklově době. V minulosti vědomí o této události vycházelo pouze z psaného pramene, kterým je svědectví Thukydidovo. Ale masový hrob na antickém hřbitově Kerameikos v Athénách, datovaném do doby epidemie (kolem roku 430 př.n.l.), poskytl potřebný kosterní materiál pro zkoumání historické mikrobiální DNA (Papagrigorakis a kol., 2006). **Pomocí PCR byly testovány tyto podezřelé infekce: mor (*Yersinia pestis*), tyfus (*Rickettsia prowazekii*), antrax (*Bacillus anthracis*), tuberkulóza (*Mycobacterium tuberculosis*) a kravské neštovice (virus cowpox).** Po několika pokusech byla identifikována sekvence *Salmonella enterica serovar Typhi* (Papagrigorakis a kol., 2006), takže „morem“, který napadl Athény a kterému podlehl i Perikles, byla infekce břišního tyfu. Tyfus a břišní tyfus jsou přes obdobný název způsobené pokaždé jiným druhem bakterie. Břišní tyfus je způsoben bakterií *Salmonella enterica serovar Typhi*, avšak tyfus má na svědomí bakterie *Rickettsia prowazekii*, jak již bylo uvedeno dříve. Břišní tyfus se přenáší stravou nebo kontaminovanou vodou, takže v obleženém městě byla tato infekce pravděpodobně snadno šířena a díky hladovění došlo možná k více smrtelným případům, než by se stalo za normálních podmínek. Starší práce Papagrigorakise a kol. (2006) využívala metodu PCR a v tomto případě bylo cíleno na konkrétní druhy, se kterými dopředu počítáme. Poměrně nadějně se jeví sekvenování nové generace, např. technikou Illumina se podařilo určit všechny bakterie ve vzorcích z dvě stě let starých vnitřků zubů (v jednom vzorku je možno současně identifikovat 1000–2000 druhů bakterií), a to jak půdních, tak i původně lidských bakterií (Pavelka, v přípravě).

Mnoho studií na aDNA se zabývá tuberkulózou a leprou. Tuberkulóza je stále jedna z hlavních příčin úmrtí na světě. Paleopatologické a paleomikrobiolo-

gické studie ukazují na dlouhodobé spojení původce *Mycobacterium tuberculosis* a jeho lidského hostitele. Protože se výskyt a epidemické šíření tohoto patogenu zdají být úzce spojeny se sociálními a biologickými faktory, je zvláště zajímavé lépe porozumět úloze TBC v období sociálních a nutričních změn, jako je neolit (Nicklisch a kol., 2012). Na nalezišti v Sasku-Anhaltsku (Německo) bylo prozkoumáno 118 jedinců z kultury lineární keramiky. Na některých kostech byly prokázány kostní léze související s TBC. U dvou jedinců byla detekována Pottova nemoc, což je chronická epidurální tuberkulózní infekce se zánětem obratlů, která patří mezi nejčastější formu kostní tuberkulózy. Na úrovni aDNA byla prokázána přítomnost patogenů patřících do komplexu *Mycobacterium tuberculosis* u jedinců ze všech zkoumaných lokalit. Prezentované údaje poskytují důležité informace o zdravotním stavu raně neolitických populací ve středním Německu (Nicklisch a kol., 2012). Výskyt infekce TBC není dosud zmapován s ohledem na paleolit, ale je pravděpodobné, že *Mycobacterium tuberculosis* už lidské hostitele napadalo. Bylo by zajímavé zjistit, zda více či méně než v neolitu. Je možné, že za nárůst TBC mohou neolitické změny životního stylu a stravy. *Mycobacterium tuberculosis* lze najít i v odlišných obdobích a v různých geografických oblastech, např. v předkolumbovské Jižní Americe, v Peru, v lokalitě Huari, kde byla aDNA *M. tuberculosis* identifikována v lidských obratlích z období 1000–1400 n. l. (Nelson a kol., 2020). Podobně v ženské kostře z avarského hrobu v Maďarsku z přelomu 7. a 8. stol. n. l. byly nalezeny kostní léze typické pro TBC, což potvrdila analýza aDNA (Pálfi a kol., 2015). Zřejmě se **tuberkulóza nevyhýbala ani raně středověkým kočovníkům**. Někdy je možné určit příslušnost k různým genetickým skupinám *M. tuberculosis*, jak bylo prokázáno na vzorcích aDNA z 19. století (Müller a kol., 2014). Bylo by samozřejmě dobré mít podobná data i od starších vzorků a sledovat stupeň přizpůsobení a evoluci *M. tuberculosis* za dobu koexistence s člověkem, ale v minulosti bylo pokládáno za úspěch, pokud se aDNA z tisíce let starých vzorků vůbec podařilo sekvenovat a určit. Nicméně tuberkulóza je z hlubší minulosti známa, byla nalezena u bizona v severní Americe (datován pomocí radiokarbonové metody na dobu před $17\,870 \pm 230$ lety, Rothschild a kol. (2001)).

Další zkoumanou bakterií, která zanechala stopy své DNA na organických zbytcích, je *Mycobacterium leprae*. **Lepra má dvě základní formy – nervovou a kožní**. Ve většině fází není příliš nakažlivá, ale výjimkou je kožní forma s vředy, která je naopak vysoce infekční. Lepra infikuje hlavně Schwannovy buňky a makrofágy především v periferní nervové soustavě, v průběhu infekce je ničen imunitní systém a na těle se vytváří znetvořeniny, části kůže zůstávají bez citu a na kůži se vytváří léze. Z genetického hlediska je zajímavé, že bakterie *M. leprae* prošla procesem redukční evoluce genomu v důsledku parazitického způsobu života a díky určitému specifickému přizpůsobení různým prostředím. Některé ztracené geny u *M. leprae* jsou homologní s geny hostitelských buněk. *M. leprae*

tak snížily svou velikost genomu na 3,3 megabází, což přispělo k získání nejnižšího obsahu guaninu a cytozinu (přibližně 58%) mezi mykobakteriemi. Srovnávací analýzy s různými mikroorganismy ukázaly, že *M. leprae* má nejvyšší obsah pseudogenů mezi patogenními a nepatogenními bakteriemi a archaea. Adaptace patogenu do hostitelských buněk jako Schwannových buněk způsobila redukci genomu a indukovala inaktivaci vícenásobných genů (Chavarro-Portillo a kol., 2019). Můžeme u nich proto vidět genetické odlišnosti od dalších podobně parazitických bakterií.

Ze starších dob detekce *M. leprae* na úrovni aDNA nejsou zatím známy. **Lepra byla v Evropě během římského období vzácná, ale její zastoupení v evropské populaci se ve středověku dramaticky zvýšilo.** Byly prozkoumány lidské pozůstatky s paleopatologickými lézemi svědčícími o malomocenství, datované do 6. až 11. století našeho letopočtu, ze střední a východní Evropy a byzantské Anatolie. Konkrétně se podařilo najít molekulární pozůstatky nejen *M. leprae* na úrovni aDNA, ale i na úrovni lipidových markerů v kosterních zbytcích z 6.–8. stol. v severní Itálii, ze 7.–11. stol. n. l. z (dnešního) Maďarska, z 8.–9. stol. n. l. z (dnešního) Rakouska, z 9.–10. stol. n. l. z naší Velké Moravy a z 8.–10. stol. n. l. z Byzance ze severní Anatolie. Přes omezenost získaných dat se zdá, že *M. leprae* z byzantské Anatolie a východní a střední Evropy připomíná moderní kmeny z Malé Asie spíše než nedávno charakterizované historické kmeny ze severozápadní Evropy. Snad to souvisí s migrací národů ze střední Asie na západ v prvním tisíciletí. Tak byly možná zavlečeny do středověké Evropy různé kmeny *M. leprae* (Donoghue a kol., 2015). U historických kmenů ze severozápadní Evropy uvádí Schuenemann a kol. (2013) na základě aDNA uzavřenost evropských populací *M. leprae* za posledních 1000 let, nicméně vychází ve své studii pouze z pěti koster s příznaky lepry ze Spojeného království, Švédska a Dánska (Schuenemann a kol., 2013). Také dokazuje evropský původ pro malomocenství v Americe (Schuenemann a kol., 2013). O migracích a přenosech infekce *M. leprae* je stále mnoho nejasného. Např. někteří autoři na základě aDNA *M. leprae* u dvou jedinců skandinávského původu (10.–11. stol. n. l.) podezřívají ze zavlečení lepry do Irska vikings (Taylor a kol., 2018). Následný pokles infikovaných *M. leprae* v Evropě může být způsoben zvýšenou rezistencí hostitelů. Molekulární důkazy o současné infekci malomocenstvím a tuberkulózou však naznačují, že úmrtí na tuberkulózu u pacientů s malomocenstvím mohlo také sehrát svou úlohu (Donoghue a kol., 2015). Ve starší práci Donoghue a kol. (2005) se objevuje názor, že docházelo k určitým společným infekcím *Mycobacterium leprae* a *Mycobacterium tuberculosis*, avšak *M. tuberculosis* převládla. Podle všeho to nebylo tím, že jeden druh vytlačuje přímo druhý, někteří jedinci měli oba patogeny, ale tyto jedinci spíše rychleji umírali a celkově se projevil pokles jedinců postižených leprou (Donoghue a kol., 2005). Dal by

se také uvažovat snadnější přenos infekce tuberkulózy, který přispěl k lepšímu uchycení a přežívání patogenu v lidské populaci. Lidská lepra zřejmě infikuje i jiné primáty. Byly sekvenovány kompletní genomy *M. leprae* ze tří přirozeně infikovaných nehumánních primátů (šimpanz ze Sierry Leone, kočkodan mangabej ze západní Afriky a makak jávský z Filipín). Fylogenetické analýzy ukázaly, že kmen *M. leprae* makaka jávského nejvíce souvisí s lidským kmenem *M. leprae* z Nové Kaledonie, zatímco kmeny *M. leprae* šimpanze a mangabeje patří k lidské linii *M. leprae*, běžně se vyskytující v západní Africe (Honap a kol., 2018).

4.6 Geny pro trávení laktózy u dávných populací a mutace 13910*T

Významnou kapitolou ve studiu historie lidstva je **pochopení stravovacích návyků starověkých populací**. Zajímavý je potom vývoj jejich **schopnosti používat mléko**. Ten je potom výzvou i pro genetiku. Důkazy o uchovávání mléka byly nalezeny již v keramice datované do období neolitu. Řada výsledků potvrzuje přítomnost mléčných lipidů nebo proteinů (Copley a kol., 2003; Cramp a kol., 2014; Pavelka a kol., 2016). Avšak na základě genetických důkazů se zdá pravděpodobné, že mléko bylo pro tehdejší první zemědělce nestravitelné. Procento lidí, u nichž v dospělém věku funguje enzym laktáza, která v tenkém střevě štěpí mléčný cukr laktózu, je v různých populacích různě vysoké. U kojenců je produkce tohoto enzymu normální u všech savců, protože získávají potravu a energii z mateřského mléka. V pozdějším věku však schopnost trávit laktózu postupně mizí. Je otázkou, jak tomu v minulosti bylo u lidí a zda došlo k nějakým změnám na počátku zemědělství v evropském neolitu (Burger a kol., 2007). Zatím se zdá evidentní, že neolitičtí zemědělci neměli alely pro trávení laktózy v dospělosti, i když v mladších obdobích je schopnost trávit laktózu běžná, samozřejmě ne u všech populací a ne ve všech regionech. Není zatím jasné, jakým způsobem se schopnost trávit laktózu v Evropě rozšířila (Witas a kol., 2015). V Evropě se nachází jen jedna mutace s názvem 13910*T, což navozuje hypotézu o šíření z jednoho centra. V Africe naopak existují 4 varianty (možná i další), přičemž jedna z nich je i výše zmíněná evropská. Proto se uvažuje o samostatném a nezávislém vzniku této mutace u různých zemědělských společností (Itan a kol., 2009). Ze sekvenování aDNA plyne, že lidé v neolitu laktózu trávit nemohli. Potvrdila to řada analýz aDNA, např. sekvenování vzorku kostní tkáně z mezolitu Polska a osmi vzorků z neolitu ze severovýchodního Polska, Litvy, Maďarska a východního Německa (Burger a kol., 2007). Dále bylo sekvenováno 23 vzorků odebraných 13 jedincům nalezeným na východě Maďarska; jejich stáří se pohybuje v rozmezí od neolitu

po dobu bronzovou. I zde se prokázalo, že místní populace nemohly laktózu trávit (Gamba a kol., 2014). Na druhou stranu se mutace pro trávení laktózy v Evropě vyskytuje již poměrně dlouho, její výskyt byl však v minulosti nejspíše nerovnoměrný. Z doby našeho eneolitu, kdy ve Skandinávii ještě přežívaly lovecko-sběračské společnosti, se podařilo sekvenovat 10 vzorků z původně 14 jedinců a v jednom případě tuto mutaci nalézt, i když jen v heterozygotním stavu. To znamená, že v době jejich života byla frekvence výskytu mutace 13910*T asi 5 %, zatímco aktuální hodnota ve Švédsku činí 74 % (Malmström a kol., 2010), podle některých studií pak až 90 % (Witas a kol., 2015). Podobně v Británii je mutace rozšířená ve frekvenci přes 90 %. Platí, že na severu Evropy se mutace objevuje ve vysokých frekvencích (70–80 %), zatímco na jihu Evropy jen v 5–10 %. Podobný severojižní gradient platí i v rámci Britských ostrovů (Smith a kol., 2009). Alelu pro syntézu enzymu laktázy se zatím nepodařilo najít u kosterního materiálu, který souvisí s postupem neolitu Evropou přes Podunají (kultura s lineární keramikou) a kultury s kardiovou keramikou na pobřeží Středozemního moře. Witas a kol. (2015) testoval kostry z polských Kujav. Jednalo se o 131 jedinců, kteří představovali průřez od neolitu (9 jedinců), přes dobu bronzovou a železnou (8 jedinců), římskou éru (34 jedinců) a středověk (80 jedinců). Je možno obecně říci, že frekvence alely stoupá v čase. **Neolitické vzorky příslušnou mutaci neměly**, ale u vzorků halštatských (asi 1200–450 př. n. l.) se u dvou jedinců z osmi příslušná alela našla (u jednoho dokonce v homozygotním stavu). V době římské a ve středověku frekvence alely stoupá, ovšem liší se mezi lokalitami v rozmezí 46–86 %. Podobně i v jiných částech střední Evropy frekvence příslušné alely v této době stoupá. Na druhou stranu – mutace na toleranci laktózy byla v relativně vysoké frekvenci (27 %) nalezena po roce 3000 př. n. l. v Baskicku na severu dnešního Španělska, v místním závěru neolitu. Je však celkově nepravděpodobné, že by se alela šířila s příchozími obyvateli s neolitickou kulturou. Nelze tak vyloučit její cestu do Evropy z Afriky přes Gibraltar a pak dál severozápadní Evropou (Witas a kol., 2015). Proč tedy v nádobách počínaje neolitem nacházíme stopy mléka či mléčných výrobků? Mléko se našlo i v keramice neolitu západních Čech (Pavelka, nepublikováno). Zřejmě sloužilo jako potravina a muselo být zpracováno, aby se odstranil nebo snížil obsah mléčného cukru – laktózy. Snad bylo kysáno, kvašeno, nebo možná i sýřeno, ale zatím nejsou k dispozici techniky, které by tyto předpoklady mohly potvrdit či vyvrátit. Nabízí se testovat v keramice stopy po kvasinkách, laktobacilech, bifidobakteriích a podobně. Reliktní (nízký) obsah laktózy v upravených potravinách zřejmě postupně pomohl k rozšíření alely 13910*T v Evropě. **Mutace se nejspíše šířila jako výhodná a poskytovala svým nositelům výhodu v boji o přežití** – šířila se tak díky přirozenému výběru (Bersaglieri a kol., 2004; Gerbault a kol., 2011; Sabeti a kol., 2007). Nicméně toto šíření se děje v historických

dobách, ze kterých je řada písemných záznamů, ale jak to bylo s výživou ohledně mléčných výrobků a selekce na základě tolerance, se můžeme jen dohadovat. Žádný z kronikářů a historiků nepíše nic, co by se vztahovalo k tomuto tématu. Z dob, kde chybí písemné záznamy a máme k dispozici jen archeologické nálezy, jsou údaje z aDNA zatím velmi kusé. Tyto soubory nelze považovat za dostatečně reprezentativní soubory a hlavně za dostatečně zmapované evropské populace v minulosti. Je potřeba prozkoumat více regionů, pak snad budou mít data větší vypovídací hodnotu. Mohla by tu být souvislost s kočovníky? Když se zaměříme na uváděný soubor testovaných jedinců z Maďarska, tak konkrétní jedinec obsahující jednu alelu genu pro toleranci k laktóze se od ostatních poněkud odlišuje. Jeho genom je blíže východním populacím a pohřební výbava je také spíše stepního charakteru (Gamba a kol., 2014). Mohla se tedy mutace do Evropy šířit od východu s kočovníky při opakovaných migracích? Tuto možnost nevylučují ani autoři dalších prací (Číperová a kol., 2015). **Kočovníci z doby nálezů se obvykle řadí k indoevropským Kimmerijcům** (Chochorowski, 1993). Zde citelně chybí data mapující frekvenci mutantní alely u Kimmerijců a jejich nástupců Skythů, případně dalších původních Indoevropanů. Výhodnost trávení syrového mléka, nejen mléčných produktů, není u pastevců asi nutno zbytečně zdůrazňovat. Je pravdou, že schopnost trávit mléko je výrazná na severozápadě Evropy, kde je v současnosti nejvíce rozšířena. Mléko dodává organismu vitamíny D nezbytné pro správné ukládání vápníku a fosforu; přirozeně se v těle vyskytují díky slunečnímu záření, při jeho nedostatku je však potřeba tyto vitamíny doplňovat z vnějších zdrojů. Ale proč se tedy objevuje tolik mutací v Africe? Je to možná důsledek preferovaného typu stravy. **Tezi o šíření alely od kočovníků je nutno brát jen jako jednu z možností**, protože proti ní stojí možnost šíření od západu z Baskicka (Witas a kol., 2015). Místo a čas vzniku mutace (respektive mutací) jsou tedy zatím poněkud nejasné a vztah jednotlivých událostí, kde mutace vznikla a jak se šířila, je prozatím neobjasněný (Smith a kol., 2009).

Zajímavá data jsou známá z období středověku. Při výzkumu nálezů z období kolem roku 1200 n. l. ze hřbitova v Dalheimu v Německu, kde jsou k dispozici výsledky analýz aDNA 18 jedinců (testovalo se 36 jedinců), byla frekvence alely způsobující toleranci k laktóze 70 %, což je podobné frekvenci ze současnosti, např. Německo a Rakousko v současnosti vykazují frekvenci 71 až 80 % (Krüttli a kol., 2014). Avšak taková frekvence, téměř se shodující se současnou, může být jen regionální záležitostí. U vzorků pouze o sto až dvě stě let starších (10.–11. stol.) byla při zkoumání z 23 jedinců z lokality v Maďarsku zjištěna frekvence přítomnosti alely 11 % (Nagy a kol., 2011). Jak a proč stoupá frekvence těchto alel v Evropě? Byla příčinou selekce a genetický drift během morových epidemií, jak uvažuje Krüttli a kol. (2014), nebo jsou důvody jiné? Odpověď na tuto otázku čeká na další studie sekvencí z různých lokalit a časových horizontů.

4.7 Proteiny v paleogenetice

Proteiny představují další výzvu pro archeogenetiku, a zvláště pro paleogenetiku, protože **mají mnohdy větší šanci na uchování než DNA**. Jejich informační hodnota je však mnohem omezenější. Z proteinů nelze získat informace o celém genomu jako z jaderné DNA, přesto však jejich analýza může poskytnout řadu informací. Uvedeme si několik zajímavých příkladů, pro začátek spíše z paleogenetiky než z archeogenetiky, které by zde neměly chybět. Poměrně populární je fakt, že se podařilo získat proteinové sekvence z mastodonta (*Mammuth americanum*) a z křídového dinosaura *Tyrannosaurus rex* (Asara a kol., 2007). Získané proteinové sekvence, kterými jsou zde fragmenty proteinů kolagenu alfa1 (I) a alfa2 (I), byly analyzovány různými fylogenetickými metodami a mastodont byl podle očekávání podobný slonům, zatímco *T. rex* ptákům (Organ a kol., 2008). Další proteiny pocházely z vnitřku kostních fragmentů z osmdesát milionů let starého hadrosaura *Brachylophosaurus canadensis* (Schweitzer a kol., 2009). Myšlenka, že by mohly proteiny přežít tolik milionů let, se mnoha odborníkům zdála velmi nepravděpodobná, proto se na hlavní autorku snesla vlna kritiky. Ta se snaží bránit, například na svých přednáškách (na vkus autora této kapitoly až příliš emotivně), ale své výsledky podepírá dodatečně i seriózními pracemi. Pomocí zobrazovacích, difrakčních, spektroskopických a imunohistochemických metod s kolegy demonstrovala vnitřní strukturu tkání, fosilních cév a také přítomnost kolagenu typu I ve vrstvách vnějších cév. Byla provedena synchrotronová FTIR na cévní tkáni *T. rex* (metoda založená na absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem, která je více popisovaná v kapitole 3.2.1.4, zde jen krátké připomenutí)³⁵ a získané výsledky byly následně porovnány s obdobnými vzorky tkání kuřat. Cílem bylo demonstrovat možné zachování struktur krevních cév získaných z kortikální kosti *Tyrannosaurus rex* (Boatman a kol., 2019). Zde se autoři pokouší demonstrovat, že objevené proteiny jsou původní součástí tkáně kostí a ne dodatečnou kontaminací. Ovšem tento autorský kolektiv není ojedinelý. Jedná se o proteiny v uhličitánových konkrecích, které jsou známy tím, že se v nich zachovává řada fosilií i s metabolity, např. cholesterolem (Plet a kol., 2017).

V konkréci, která obsahovala **kosti ichtyosaurů ze svrchní jury** (před asi 187 milióny let), se podařilo pomocí řady mikroanalytických technik a analýz izotopů specifických pro jednotlivé sloučeniny identifikovat struktury podobné červeným a bílým krvinkám a také proteiny podobné kolagenovým destičkám a cholesterolu. Je zajímavé, že struktury typu červenýchrvinek jsou u ichtyo-

³⁵ Při použití této techniky vznikají FTIR spektra, která se vzájemně porovnávají. Pro každou látku vznikají charakteristické vzorce absorpčních pásmů, které ukazují složení materiálu. FTIR také dokáže určovat polaritu transmembránového proteinu.

saurů čtyřikrát až pětkrát menší než analogické struktury identifikované v moderních organismech (Plet a kol., 2017). Autoři navrhuje, že malá velikost těchto struktur je výsledkem evoluční adaptace na tehdejší dlouhodobé nízké atmosférické hladiny kyslíku (Plet a kol., 2017). Zbytky z ichtyosaura, který patří k poměrně rozšířenému rodu *Stenopterygius*, obsahovaly i zbytky původní kůže s morfologicky odlišitelnými epidermálními a dermálními vrstvami. Analýzou tohoto unikátního nálezu bylo zjištěno, že tyto vrstvy jsou podloženy izolační vrstvou, podle všeho hlavně tukovou, podobně jako u dnešních kytovců a ploutvonožců, která sloužila zřejmě pro lepší vztlak a homeotermii. Navíc se podařilo identifikovat endogenní proteinové a lipidové složky spolu s keratinocyty a rozvětvenými melanofory, které obsahují eumelaninový pigment. Tyto melanofory s pigmenty odpovídají za barvu živočicha. Hřbetní strana byla tmavší než břišní a rozmístění melanoforů napovídá, že ichtyosaurus měl kontrastní barvy, které si možná byl schopen fyziologicky upravovat, nejspíše kvůli osvit, pro ukrytí se před většími predátory, nebo kvůli termoregulaci (Lindgren a kol., 2018).

4.8 Proteiny a zbytky potravin na archeologické keramice

Zajímavý segment archeogenetiky představuje **identifikace zbytků potravin na keramice**, zejména proteinů a lipidů, v omezenější míře i jiných látek. DNA z původních potravin se ve většině případů nemůže zachovat, protože při procesu zpracování, hlavně dlouhých tepelných úpravách a následném uchovávání zbytků v porézní keramice, dochází k silné degradaci DNA řetězců z rostlin i živočichů. Naopak lipidy a mnohé proteiny se do určité míry mohou zachovat, a tak lze identifikovat mnohé potraviny, které byly v keramických objektech uchovávány. Také rozvíjíme metodu detekce pomocí protilátek, která byla poněkud neprávem opuštěna (Pavelka a kol., 2016). Identifikaci těchto organických zbytků je možno provádět řadou způsobů, zejména pak pomocí hmotnostní spektrometrie a plynové i kapalinové chromatografie. Tyto metody jsou podrobněji popisovány v předchozích kapitolách (3.2.1.3, 3.2.2.1 a 3.2.2.2). V následujících kapitolách je podrobněji diskutováno využití archeogenetických postupů v několika aplikacích.

4.8.1 Proteiny a jejich identifikace pomocí protilátek

Identifikace proteinů pomocí protilátek z keramiky byla v minulosti často používána nesprávně, což vedlo k určitému jejímu znevěrohodnění v kontextu starších prací. Problém způsobovalo nedostatečné zohlednění nespecifických reakcí mezi antigenem a protilátkou (cross-reakce), při nichž dochází k reakci s jinými než původně zamýšlenými antigeny (Child a Pollard, 1992; Brandt a kol., 2002).

Chybně byly totiž použity protilátky, které nebyly vytvořeny proti archeologicky degradovaným proteinům, ale proti proteinům v současném nativním stavu. Takto vytvořené protilátky mohou na historické proteiny reagovat, ale je pravděpodobné, že budou reagovat jen slabě, nepřesně, nebo vůbec. Někteří autoři si to uvědomovali a uváděli, že je nutné vytvářet protilátky proti denaturovaným, nebo obecněji přeměněným proteinům, a je třeba znát formu antigenů (Craig a kol., 2000). Antigen je látka, např. protein, proti kterému organismy produkují protilátky. Jako použitelné řešení se v tomto ohledu jeví využití komerčních sad pro identifikaci potravin (Pavelka a Vařeka, 2008; Pavelka a Orna, 2011; Číperová a kol., 2015; Pavelka a kol., 2016). V těchto sadách se totiž využívají protilátky vytvořené proti denaturovaným proteinům v potravinách. Jedná se o tepelně denaturované formy, často v malých koncentracích (Björklund a kol., 2001). **Řada těchto protilátek je schopná detekovat historické proteiny**, není to však pravidlem. Například produkty firmy ELISA-Tek se ukázaly jako zcela nevhodné (Pavelka, nepublikováno). Nově zařazené protilátky je proto nutné opakovaně testovat na historických proteinech nebo na proteinech archeologizovaných. Archeologizovanými proteiny jsou myšleny tepelně upravené proteiny umístěné na keramiku. Jako nejlepší se zatím osvědčuje forma tzv. spečených příškvarků. Tím je zaručena tepelná denaturace. Ty jsou pak na dobu v řádu měsíců zakopány do země (Pavelka a Orna 2011, Pavelka a kol., 2016). Na keramice musí být vhodně (např. lihovým fixem) vyznačeno, o jaký vzorek jde, aby nedošlo k záměně. První testy byly prováděny z karbonizovaných zbytků – příškvarků, které se na keramice uchovávají spíše vzácně, případně z usazenin po zbytcích potravin (Pavelka a Vařeka, 2008; Pavelka a Orna, 2011; Pavelka a kol., 2016). Později se metodika změnila na detekci proteinů přímo z keramiky, protože příškvarků se nachází velmi málo, zatímco neporézní keramiky vhodné k analýzám se nachází poměrně značné množství. Proteiny jsou vsáknuté v keramice, nebo na povrchu. Potraviny byly často ohřívány v keramice, která byla kladena do pece, a oheň sálal z boku, takže v mnoha případech došlo ke stejnému procesu jako u příškvarků. Některé proteiny se však obtížněji detekují. Například ovčí proteiny v keramice na rozdíl od ovčích proteinů z příškvarků se z neznámých důvodů dostupnými protilátkami nedaří identifikovat vůbec (Pavelka, nepublikováno). Nicméně prasečí, hovězí a drůbeží proteiny nelze určit stejně jako u příškvarků.

4.8.2 Vybrané výsledky plynoucí z testů pomocí protilátek

Na tomto místě je vhodné uvést několik vybraných výsledků ilustrujících možnosti analýzy pomocí protilátek. Imunotesty například potvrzují, že městská chudina z Plzně i Prahy na konci středověku téměř nekonzumovala maso. Naopak u bohatších vrstev se maso potvrdilo. Použity byly testy Neogen – Biokits for

Speciation Identification. Samozřejmě to se mohlo týkat jen určitých regionů, kde se testy prováděly, a je možné, že u sousedních lokalit by situace mohla být odlišná. Proto je nutno zatím brát závěry jako předběžné.

Ve městech středověku je mléko téměř výlučně kozí, na venkově i kravské.

Mléko bylo nalezeno na nádobách pocházejících už z neolitu a prakticky skoro v každé testované době. Maso v potravě bylo pro chudší obyvatele ve starších dobách zřejmě běžnější než u středověké chudiny, a to v neolitu, eneolitu, době bronzové i železné. Zdá se, že ve středověku se s levnou porézní keramikou celkem plýtvalo a po připálení se vyhodila, zatímco ve starších dobách byla umyta, a tak např. keramika z doby bronzové obsahuje mnohem více proteinů, pocházejících zřejmě z více jídel, zatímco vrcholné středověká představuje mnohdy spíše pozůstatky jen po jednom jídle (Vařeka, 2008; Pavelka a Orna, 2011; Pavelka a kol., 2016).

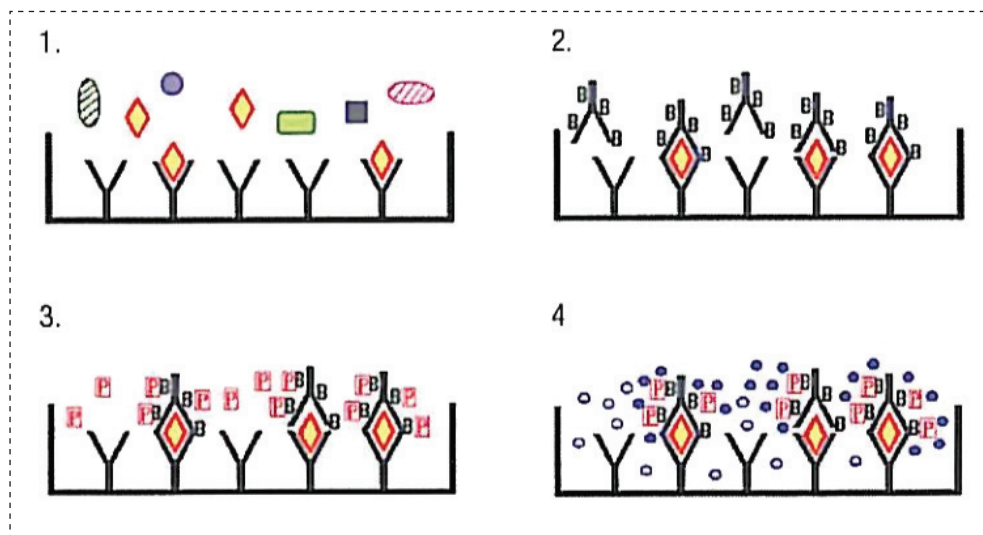
4.8.3 Metoda ELISA a Rapid 3-D testy

Použité imunologické testy vychází z ELISA (z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), případně je tato metodika označována jako EIA (Enzyme Immunoassay). Komerční ELISA testy mají specifické protilátky navázané na dno malých jamek na tzv. mikrotitračních destičkách. Testy jsou tedy založené na reakci substrátu (antigenu) a protilátky. Komerční protilátky jsou přichyceny na dně jamek mikrotitrační destičky a ty zachycují odpovídající proteiny ze vzorku. Proteiny, které se spojí s protilátkami, je však nutno zviditelnit, k tomu se používají další tzv. sekundární druhově specifické protilátky, které jsou biotinylově³⁶ značeny. Při provádění postupu se používá několik promývacích kroků (**obrázek 4-10**). Zbarvení je možno vyhodnotit vizuálně (subjektivně), ale je mnohem spolehlivější a přesnější použít spektrofotometr schopný vyhodnocovat ELISA mikrotitrační destičky (typicky je měření prováděno s použitím záření o vlnové délce 450 nm). Příklad používaného přístroje pro měření ELISA analýzy a výsledek stanovení na mikrotitrační destičce jsou uvedeny na **obrázku 4-11**. Dochází k barevné změně, která musí být pokud možno silně kontrastní, v našem případě se původní modrá barva reakcí změnila na žlutou. Měří se intenzita zabarvení, která odpovídá množství stanovené látky. Používá se měření absorbance při 450 nm. Vlastní metody ELISA se dělí podle způsobu provedení a detekce do několika kategorií. Mezi dvě hlavní patří přímá ELISA využívaná pro detekci antigenu a nepřímá ELISA, která se využívá pro detekci specifických protilátek. Pro příklad nepřímé metody uveďme test BIODIRECT BLG Assay ELISA. To je kompetitivní nepřímá ELISA. V tomto typu testu neoznačený antigen soutěží o vazbu na omezený počet vazebných míst, na pevném povrchu imobilizovaných protilátek, s antigenem

³⁶ Biotinylace – proces vazby biotinu (vitamin H) k molekule proteinu pomocí NH₂ skupiny.

označeným enzymem. Čím více je reakce zbarvena, tím méně původní vzorek obsahoval proteinu, v tomto případě β -lactoglobulinu skotu. Negativní reakce u vzorků, které neobsahují cílové proteiny, jsou zbarveny a silně pozitivní nejsou zbarveny. Zbarvení se tedy mění obráceně než u přímé nekompetitivní ELISA.

Rapid 3-D jsou testy na bázi laterální průtokové imunochromatografie – jednoduchá zařízení na bázi celulózy, která detekují přítomnost nebo nepřítomnost určité látky (analytu) v kapalném vzorku. Nejznámější a běžně používaná je „domácí“ forma těhotenského testu. Tyto testy nejsou tak citlivé jako ELISA testy, ale pokud je ve vzorku dostatečné množství historických přeměněných proteinů, jsou použitelné. Zvláště se tyto testy osvědčily pro analýzu příškvarků na keramice (Pavelka a Vařeka, 2008; Pavelka a kol., 2016). Rapid 3-D testy od společnosti Neogen, Lansing, USA jsou dodávány v plastickém obalu, který má otvor s analytickou podložkou a čtecí otvor. Vzorek je obvykle rozpuštěn v malém množství přiloženého pufru (asi ve 150 μ l) a 120 μ l vzniklého roztoku se napipetuje do analytického otvoru. V tomto bodě bylo nutno protokol změnit, protože výrobce nepočítá s nepatrným množstvím testovaného materiálu. Vzorek nebylo možné rozpustit v roztocích sady kitu, ale v plastické mikrozkuhavce (např. Eppendorf), a množství cca 200 μ l bylo nutno napipetovat do jamky



Obrázek 4-10

Průběh ELISA testu (1. inkubace pozitivní kontroly nebo vzorku, odpovídající proteiny jsou zachyceny protilátkami imobilizovanými na dně jamky. Ty, které se nenavázaly, jsou odmyty promývacím roztokem, 2. přidavek sekundární protilátky s navázaným enzymem pro zviditelnění, 3. promytí a přidavek dalších připravených roztoků z kitu, které způsobí identifikační zbarvení reakce. Obvykle se přidává TMB substrát (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), 4. přidání STOP roztoku, obvykle zředěná kyselina (fosforečná, nebo sírová), ustálení barviva, dochází k vybarvení.

plastového obalu, která se normálně ponoří do roztoku se vzorkem. Kapilární síly vedou proteiny ve vzorku přes porézní membránu (reakční matici) směrem k detekčním místům, kde se setkávají s imobilizovanými molekulami (protilátky, případně antigeny – v závislosti na designu konkrétního testu), a tam dochází k reakci. Nadbytek roztoku pokračuje dál kolem detekčních proužků až do konce membrány (O'Farrell, 2013; Posthuma-Trumpie a kol., 2009; Posthuma-Trumpie a Van Amerongen, 2012). Za 5 až 15 minut se v případě pozitivního záchytu v okně pro čtení objeví viditelné pruhy. Při práci s archeologickým materiálem, kde je koncentrace proteinu obvykle nízká, je vhodné prodloužit dobu testu (reakce) alespoň na jednu hodinu.

Tento test může prokázat přítomnost mléčných produktů ve vzorku. Přítomnost kaseinu, který je přirozenou součástí mléka a představuje 80 % mléčných bílkovin, může být detekována pomocí Biokits Rapid 3-D Casein Test Kit (laterální průtokový test, Neogen, Lansing, USA). Detekce je založena na reakci kaseinu s jeho specifickou protilátkou. Jako citlivější se osvědčil ELISA test Veratox for Casein Allergen (Neogen, Lansing, USA) (Pavelka a kol., 2016). Nicméně extrakce pomocí aditiv v kitu se neosvědčila a musela být zjednodušena (Pavelka, nepublikováno).

Pokud je přítomnost mléka potvrzena, je možno pokusit se identifikovat, od kterého savčího druhu pochází. Výborně se osvědčila ELISA sada na detekci kozího mléka RIDASCREEN®GIS (R-Biopharm AG, Německo) (Pavelka a Vařeka, 2008; Pavelka a kol., 2016). Test na detekci kozího mléka byl určen především pro odhalení podvodů ve výrobě sýra, kde se kozí mléko míchalo s ovčím a sýr byl nezákonně deklarován jako čistě ovčí. Tyto testy však zřejmě přestaly být vyžadovány, neboť firma je přestala vyrábět. Dosud se nepodařilo najít odpovídající náhradu od žádného dalšího výrobce, která by obsahovala protilátky stejně



Obrázek 4-11 Přístroj na měření absorbance výsledných reakcí na mikrotitračních destičkách – ELISA reader VERSAmax™ (Molecular Devices) a výsledná mikrotitrační destička pro měření absorbance.

vhodné pro detekci historických proteinů. Dostupné alternativy nefungují vůbec, nebo dosti slabě (Pavelka, nepublikováno). S využitím testu BIODATA BLG (β -lactoglobulin) lze však alespoň určit, zda se jedná o mléko kravské, nebo mléko jiného savce („nekravské“). Zkoušky na identifikaci původu mléka a mléčných výrobků skotu z historických proteinů je možno provádět také pomocí BIODATA BLG (β -lactoglobulin) (Neogen, Lansing, USA). Jedná se o kompetitivní ELISA test, kde se žlutě zbarvují negativní reakce. Díky této sadě je možno určit, zda je mléko zachycené v keramice kravské, nebo z jiného zdroje (Pavelka a kol., 2016).

Obiloviny obsahují lepek neboli gluten (v současnosti detailně zkoumaný alergen). Pro určení obilovin existují detekční sady založené na citlivé detekci glutenu v potravinách. Gluten je chemicky složitou směsí s významným podílem glykoproteinů, které se vyskytují u většiny rostlin čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), a tedy i v pšenici, ječmeni, žitu a ovsu. Jedním z glykoproteinů glutenu je gliadin. Na gluten i na gliadin byly vyvinuty imunochemické sady, které se osvědčily i na analýzu historických proteinů (Pavelka a kol., 2016). Tyto sady dodává firma Neogen. Na gluten je k dispozici Biokits Rapid 3-D™ (laterální průtokový test) a na gliadin citlivější sendvičový ELISA test Veratox for Gliadin. Test na gluten identifikuje tyto rostliny: pšenice (*Triticum spp.*), žito (*Secale cereale* L.), v menší míře ječmen (*Hordeum vulgare* L.), ale nikoli oves (*Avena sativa*), proso (*Panicum miliaceum*) a jiné plodiny bez lepku. Tento ELISA test identifikuje gliadin z pšenice, žita a ječmene.

Zajímavé je testování přítomnosti lískového oříšku. Tento plod byl zatím testován pouze výjimečně (Šálková a kol., 2015). K testování této potraviny je možno použít Biokits Rapid 3-D Hazelnut Test (laterální průtokový test) (Neogen). Reakce ale nebyly příliš výrazné.

Historické proteiny pocházející z masa – svaloviny, ale i z kostí, lze určit také pomocí ELISA sendvičové sady „Beef/Pork/Poultry/Sheep – Microwell assay“ (Neogen, Lansing, USA). Tato sada umožňuje dobře rozlišit druhy proteinů podle původu na hovězí, vepřové, drůbeží a skopové (Pavelka a kol., 2016). Na základě našich experimentů je možné detekovat v příškvarcích i v keramice hovězí, vepřové a drůbeží proteiny. Skopové bylo možno zatím identifikovat jen ve formě příškvarků. Několikrát byl úspěšně vyzkoušen i test Biokits Rapid 3-D Egg (laterální průtokový test). Tento test je citlivý na přítomnost bílkovin ptačích vajec, konkrétně ovomukoidu (Gal d 1), což je hlavní termostabilní alergen vaječných bílků (Matsuda a kol., 1982). Ovomukoid je možno identifikovat ve vařeném i syrovém stavu.

Na trhu jsou však i další potenciálně použitelné testy, které dosud nebyly vyzkoušeny. Výhodou oproti hmotnostní spektrometrii je v některých případech větší citlivost a rozlišitelnost podle druhů. Citelnou nevýhodou metody je nedo-

statek komerčních imunologických testů pro zeleninu a ovoce. Problémy představují mnohé proteiny z organických hnojiv, zvláště z prasečího a vepřového hnoje (do hnojiv se zřejmě také přidávají už zkažené mléčné produkty). Tyto tři uvedené skupiny proteinů byly opakovaně detekovány v půdě a mohou kontaminovat archeologickou keramiku. Významná je kooperace imunologických metod s hmotnostní spektrometrií, která je mnohdy synergická. Hmotnostní spektrometrií je možno detekovat signály, které mohou odpovídat určitému zbytku potravin (např. triacylglyceroly), a imunochemická metoda může následně specificky detekovat další složky (například mléčný protein). Metody si tedy vzájemně indikují vhodné vzorky (potenciální kandidáty na pozitivní záchyt dané potravin) a mohou si vzájemně potvrzovat získaná data (viz např. spolupráce našeho MS a imunochemického týmu uvedená v kap. 3.2.1.3 a práce Kučery a kol., 2018).

Literatura

- Abu-Amero K. K., Larruga J. M., Cabrera V. M., González A. M., Mitochondrial DNA structure in the Arabian Peninsula, *BMC Evol. Biol.* 2008, 8, 45.
- Adams S. M., Bosch E., Balaesque P. L., Ballereau S. J., Lee A. C., Arroyo E., López-Parra A. M., Aler M., Grifo M. S., Brion M., Carracedo A., Lavinha J., Martínez-Jarreta B., Quintana-Murci L., Picornell A., Ramon M., Skorecki K., Behar D. M., Calafell F., Jobling M. A., The genetic legacy of religious diversity and intolerance: paternal lineages of Christians, Jews, and Muslims in the Iberian Peninsula, *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 83, 725–736.
- Adler P. J., Pouwels R. L., World Civilizations: Volume 1: To 1700, *Cengage Learning* 2007, 169.
- Achilli A., Perego U. A., Lancioni H., Olivieri A., Gandini F., Hooshar Kashani B., Battaglia V., Grugni V., Angerhofer N., Rogers M. P., Herrera R. J., Woodward S. R., Labuda D., Smith D. G., Cybulski J. S., Semino O., Malhi R. S., Torroni A., Reconciling migration models to the Americas with the variation of North American native mitogenomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110, 14308–14313.
- Anderung C., Bouwman A., Persson P., Carretero J. M., Ortega A. I., Elburg R., Smith C., Arsuaga J. L., Ellegren H., Götherström A., Prehistoric contacts over the Straits of Gibraltar indicated by genetic analysis of Iberian Bronze Age cattle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 8431–8435.
- Asara J. M., Schweitzer M. H., Freimark L. M., Phillips M., Cantley L. C., Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry, *Science* 2007, 316, 280–285.
- Balaesque P., Bowden G. R., Adams S. M., Leung H. Y., King T. E., Rosser Z. H., Goodwin J., Moisan J. P., Richard C., Millward A., Demaine A. G., Barbujani G., Previderè C., Wilson I. J., Tyler-Smith C., Jobling M. A., A predominantly neolithic origin for European paternal lineages, *Plos Biol.* 2010, 8, e1000285.
- Barac L., Pericić M., Klarić I. M., Rootsi S., Janićijević B., Kivisild T., Parik J., Rudan I., Villems R., Rudan P.

- Y chromosomal heritage of Croatian population and its island isolates, *Eur. J. Hum. Genet* 2003, 11, 535–542 (Erratum in: *Eur. J. Hum. Genet.* 2004, 83.).
- Barker G. *The agricultural revolution in prehistory: why did foragers become farmers?* Oxford University Press, Oxford, UK 2006.
- Batini C., Hallast P., Zadik D., Delser P. M., Benazzo A., Ghirotto S., Arroyo-Pardo E., Cavalleri G. L., de Knijff P., Dupuy B. M., Eriksen H. A., King T. E., de Munain A. L., López-Parra A. M., Loutradis A., Milasin J., Novelletto A., Pamjav H., Sajantila A., Tolun A., Winney B., Jobling M. A., Large-scale recent expansion of European patrilineages shown by population resequencing, *Nat. Commun.* 2015, 6, 7152.
- Behar D. M., Hammer M. F., Garrigan D., Vilems R., Bonne-Tamir B., Richards M., Gurwitz D., Rosengarten D., Kaplan M., Della Pergola S., Quintana-Murci L., Skorecki K., MtDNA evidence for a genetic bottleneck in the early history of the Ashkenazi Jewish population, *Eur. J. Hum. Genet.* 2004, 12, 355–364.
- Behar D. M., Vilems R., Soodyall H., Blue-Smith J., Pereira L., Metspalu E., Scozzari R., Makkan H., Tzur S., Comas D., Bertranpetit J., Quintana-Murci L., Tyler-Smith C., Wells R. S., Rosset S., Genographic Consortium. The dawn of human matrilineal diversity, *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 82, 1130–1140.
- Beja-Pereira A., Caramelli D., Lalueza-Fox C., Vernesi C., Ferrand N., Casoli A., Goyache F., Royo L. J., Conti S., Lari M., Martini A., Ouragh L., Magid A., Atash A., Zsolnai A., Boscato P., Triantaphylidis C., Ploumi K., Sineo L., Mallegni F., Taberlet P., Erhardt G., Sampietro L., Bertranpetit J., Barbujani G., Luikart G., Bertorelle G., The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 8113–8118.
- Bekada A., Fregel R., Cabrera V. M., Larruga J. M., Pestano J., Benhamamouch S., González A. M., Introducing the Algerian Mitochondrial DNA and Y-Chromosome Profiles into the North African Landscape, *PloS One* 2013, 8, e56775.
- Bellwood P., *First Farmers: the Origins of Agricultural Societies*. Malden (MA): Blackwell 2005 (ISBN 0-631-20565).
- Bennett C. C., Kaestle F. A., Investigation of ancient DNA from Western Siberia and the Sargat culture, *Hum. Biol.* 2010, 82, 143–156.
- Bermisheva M., Tambets K., Vilems R., Khusnutdinova E., Raznoobrazie gaplogrupp mitokhondrial'noĭ DNK u narodov Volgo-Ural'skogo regiona Rossii [Diversity of mitochondrial DNA haplotypes in ethnic populations of the Volga-Ural region of Russia], *Mol. Biol. (Mosk).* 2002, 36, 990–1001.
- Berniell-Lee G., Calafell F., Bosch E., Heyer E., Sica L., Mougouia-Daouda P., van der Veen L., Hombert J. M., Quintana-Murci L., Comas D., Genetic and demographic implications of the Bantu expansion: insights from human paternal lineages, *Mol. Biol. Evol.* 2009, 26, 1581–1589.
- Boatman E. M., Goodwin M. B., Holman H. N., Fakra S., Zheng W., Gronsky R., Schweitzer M. H., Mechanisms of soft tissue and protein preservation in *Tyrannosaurus rex*, *Sci. Rep.* 2019, 9, 15678.
- Bollongino R., Nehlich O., Richards M. P., Orschiedt J., Thomas M. G., Sell C., Fajkosová Z., Powell A., Burger J., 2000 years of parallel societies in Stone Age Central Europe, *Science* 2013, 342, 479–81.
- Bollongino R., Elsner J., Vigne J. D., Burger J., Y-SNPs do not indicate hybridisation between European aurochs and domestic cattle, *PloS One* 2008, 3, e3418.
- Bonani G., Ivy S., Hajdas I., Niklaus T. R., Suter M., Ams 14C Age Determinations of Tissue, Bone and Grass Samples from the Ötztal Ice Man, *Radiocarbon* 1994, 36, 247–250.

- Boric D., Price T. D. Strontium isotopes document greater human mobility at the start of the Balkan Neolithic, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013, 110, 3298–3303.
- Bouwman A., Rühli F., Archaeogenetics in evolutionary medicine, *J. Mol. Med. (Berl)* 2016, 94, 971–977.
- Bradley B., Stanford D., The North Atlantic Ice-Edge Corridor: A Possible Palaeolithic Route to the New World, *World Archaeol.* 2004, 36, 459–478.
- Bramanti B., Ancient DNA: genetic analysis of aDNA from sixteen skeletons of the Vedrovice, *Anthropologie (Brno)* 2008, 46, 153–160.
- Bramanti B., Thomas M. G., Haak W., Unterlaender M., Jores P., Tambets K., Antanaitis-Jacobs I., Haidle M. N., Jankauskas R., Kind C. J., Lueth F., Terberger T., Hiller J., Matsumura S., Forster P., Burger J., Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and central Europe's first farmers, *Science* 2009, 326, 137–140.
- Brooks N., Chiapello I., Lerner S. D., Drake N., Legrand M., Moulin C., Prospero J., The climate-environment-society nexus in the Sahara from prehistoric times to the present day, *J. North Afr. Stud.* 2005, 10, 253–292.
- Brunelli A., Kampuansai J., Seielstad M., Lomthaisong K., Kangwanpong D., Ghirotto S., Kutanan W., Y chromosomal evidence on the origin of northern Thai people, *PLoS One* 2017, 12, e0181935.
- Cabrera V. M., Marrero P., Abu-Amero K. K., Larruga J. M., Carriers of mitochondrial DNA macrohaplogroup L3 basal lineages migrated back to Africa from Asia around 70,000 years ago, *BMC Evol. Biol.* 2018, 18, 98.
- Callaway E., Hominin DNA baffles experts, *Nature* 2013, 504, 16–17.
- Callaway E., Evidence mounts for interbreeding bonanza in ancient human species, *Nature* 2016.
- Cieslak M., Pruvost M., Benecke N., Hofreiter M., Morales A., Reissmann M., Ludwig A., Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses, *PLoS One*. 2010, 5, e15311.
- Colli L., Milanese M., Vajana E., Iamartino D., Bombalà L., Puglisi F., Del Corvo M., Nicolazzi E. L., Ahmed S. S. E., Herrera J. R. V., Cruz L., Zhang S., Liang A., Hua G., Yang L., Hao X., Zuo F., Lai S. J., Wang S., Liu R., Gong Y., Mokhber M., Mao Y., Guan F., Vlaic A., Vlaic B., Ramunno L., Cosenza G., Ahmad A., Soysal I., Ünal E. Ö., Ketudat-Cairns M., Garcia J. F., Utsunomiya Y. T., Baruselli P. S., Amaral M. E. J., Parnpai R., Drummond M. G., Galbusera P., Burton J., Hoal E., Yusefzadeh S., Sumantri C., Moiola B., Valentini A., Stella A., Williams J. L., Ajmone-Marsan P., New Insights on Water Buffalo Genomic Diversity and Post-Domestication Migration Routes From Medium Density SNP Chip Data, *Front. Genet.* 2018, 9, 53.
- Comas D., Plaza S., Wells R. S., Yuldaseva N., Lao O., Calafell F., Bertranpetit J., Admixture, migrations, and dispersals in Central Asia: evidence from maternal DNA lineages, *Eur. J. Hum. Genet.* 2004, 12, 495–504.
- Cooper A., Lalueza-Fox C., Anderson S., Rambaut A., Austin J., Ward R., Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution, *Nature* 2001, 409, 704–707.
- Copley M. S., Berstan R., Dudd S. N., Docherty G., Mukherjee A. J., Straker V., Payne S., Evershed R. P., Direct chemical evidence for widespread dairying in prehistoric Britain, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100, 1524–1529.
- Costa M. D., Pereira J. B., Pala M., Fernandes V., Olivieri A., Achilli A., Perego U. A., Rychkov S., Naumova O., Hatina J., Woodward S. R., Eng K. K., Macaulay V., Carr M., Soares P., Pereira L., Richards M. B., A substantial prehistoric European

- ancestry amongst Ashkenazi maternal lineages, *Nat. Commun.* 2013, 4, 2543.
- Cruciani F., La Fratta R., Santolamazza P., Sellitto D., Pascone R., Moral P., Watson E., Guida V., Colomb E. B., Zaharova B., Lavinha J., Vona G., Aman R., Cali F., Akar N., Richards M., Torroni A., Novelletto A., Scozzari R., Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) Y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa, *Am. J. Hum. Genet.* 2004, 74, 1014–1022.
- Cruciani F., Trombetta B., Massaia A., Destro-Bisol G., Sellitto D., Scozzari R., A revised root for the human Y chromosomal phylogenetic tree: the origin of patrilineal diversity in Africa, *Am. J. Hum. Genet.* 2011, 88, 814–818.
- Cui Y., Li H., Ning C., Zhang Y., Chen L., Zhao X., Hagelberg E., Zhou H., Y Chromosome analysis of prehistoric human populations in the West Liao River Valley, Northeast China, *BMC Evol. Biol.* 2013, 13, 216.
- Číperová M., Pavelka J., Šmejda L., Detekce stop mléka v porézní keramice z neolitu jihozápadních Čech a otázka trávení laktózy u evropských populací v minulosti, *Acta Fakulty filozofické, Západočeské univerzity v Plzni* 2015, 7, 193–211.
- Diamond J., *Osudy lidských společností: Střelné zbraně, choroboplodné zárodky a ocel v historii*. Originál: Guns, Germs, and Steel: The Fates of Human Societies, 1995, Columbus 2000 (ISBN: 80-7249-047-8).
- Derenko M. V., Denisova G. A., Malyarchuk B. A., Dambueva I. K., Dorzhu C. M., Stolpovski Y. M., Lotosh E. A., Luzina F. A., Zakharov I. A., Mitochondrial DNA variability in Turkic-speaking populations of the Altai and Sayan region from South Siberia, *Am. J. Hum. Genet. Suppl.* 2000, 67, A1161.
- Derenko M. V., Grzybowski T., Malyarchuk B. A., Czarny J., Miścicka-Sliwka D., Zakharov I. A., The presence of mitochondrial haplogroup x in Altaians from South Siberia, *Am. J. Hum. Genet.* 2001, 69, 237–241.
- Derenko M. V., Grzybowski T., Malyarchuk B. A., Dambueva I. K., Denisova G. A., Czarny J., Dorzhu C. M., Kakpakov V. T., Miścicka-Sliwka D., Wozniak M., Zakharov I. A., Diversity of mitochondrial DNA lineages in South Siberia, *Ann. Hum. Genet.* 2003, 67, 391–411.
- Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G. A., Wozniak M., Dambueva I., Dorzhu C., Luzina F., Miścicka-Sliwka D., Zakharov I., Contrasting patterns of Y-chromosome variation in South Siberian populations from Baikal and Altai-Sayan regions, *Hum. Genet.* 2006, 118, 591–604.
- Derenko M., Malyarchuk B., Grzybowski T., Denisova G., Dambueva I., Perkova M., Dorzhu C., Luzina F., Lee H. K., Vanecek T., Vilems R., Zakharov I., Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations, *Am. J. Hum. Genet.* 2007, 81, 1025–1041.
- Derenko M., Malyarchuk B., Denisova G., Perkova M., Rogalla U., Grzybowski T., Khusnutdinova E., Dambueva I., Zakharov I., Complete mitochondrial DNA analysis of eastern Eurasian haplogroups rarely found in populations of northern Asia and eastern Europe, *PloS One* 2012, 7, e32179.
- Di Cristofaro J., Pennarun E., Mazières S., Myres N. M., Lin A. A., Temori S. A., Metspalu M., Metspalu E., Witzel M., King R. J., Underhill P. A., Vilems R., Chikarone J., Afghan Hindu Kush: where Eurasian sub-continent gene flows converge, *PloS One* 2013, 8, e76748.
- Dolgin E., Human mutation rate revealed, *Nature* 2009.
- Driscoll C. A., Yamaguchi N., Bar-Gal G. K., Roca A. L., Luo S., Macdonald D. W., O'Brien S. J., Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct caspian tiger and its relationship to the amur tiger, *PloS One* 2009, 4, e4125.

- Duggan A. T., Whitten M., Wiebe V., Crawford M., Butthof A., Spitsyn V., Makarov S., Novgorodov I., Osakovsky V., Pakendorf B., Investigating the prehistory of Tungusic peoples of Siberia and the Amur-Ussuri region with complete mtDNA genome sequences and Y-chromosomal markers, *PloS One* 2013, 8, e83570.
- Dulik M. C., Zhadanov S. I., Osipova L. P., Askapuli A., Gau L., Gokcumen O., Rubinstein S., Schurr T. G., Mitochondrial DNA and Y chromosome variation provides evidence for a recent common ancestry between Native Americans and Indigenous Altaians, *Am. J. Hum. Genet.* 2012, 90, 229–246. (Erratum in: *Am. J. Hum. Genet.* 2012, 90, 573.).
- Edwards C. J., Bollongino R., Scheu A., Chamberlain A., Tresset A., Vigne J. D., Baird J. F., Larson G., Ho S. Y., Heupink T. H., Shapiro B., Freeman A. R., Thomas M. G., Arbogast R. M., Arndt B., Bartosiawicz L., Benecke N., Budja M., Chaix L., Choyke A. M., Coqueugniot E., Döhle H. J., Göldner H., Hartz S., Helmer D., Herzig B., Hongo H., Mashkour M., Ozdogan M., Pucher E., Roth G., Schade-Lindig S., Schmölcke U., Schulting R. J., Stephan E., Uerpman H. P., Vörös I., Voytek B., Bradley D. G., Burger J., Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs, *Proc. Biol. Sci.* 2007, 274, 1377–1385.
- Ehret C., *An African Classical Age: Eastern and Southern Africa in World History, 1000 BC to AD 400*, James Currey, London 1998 (ISBN: 9780813920573).
- El-Sibai M., Platt D. E., Haber M., Xue Y., Youhanna S. C., Wells R. S., Izaabel H., Sanyoura M. F., Harmanani H., Bonab M. A., Behbehani J., Hashwa F., Tyler-Smith C., Zalloua P. A., Genographic Consortium. Geographical structure of the Y-chromosomal genetic landscape of the Levant: a coastal-inland contrast, *Ann. Hum. Genet.* 2009, 73, 568–581.
- Eriksson J., Larson G., Gunnarsson U., Bed'hom B., Tixier-Boichard M., Strömstedt L., Wright D., Jungerius A., Vereijken A., Randi E., Jensen P., Andersson L., Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken, *PLoS Genet.* 2008, 4, e1000010.
- Ermini L., Olivieri C., Rizzi E., Corti G., Bonnal R., Soares P., Luciani S., Marota I., De Bellis G., Richards M. B., Rollo F., Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman, *Curr. Biol.* 2008, 18, 1687–1693.
- Fagan B. M., Durrani N., *In the Beginning: An Introduction to Archaeology*, Routledge 2015 (ISBN 9781317346432).
- Fagundes N. J., Kanitz R., Eckert R., Valls A. C., Bogó M. R., Salzano F. M., Smith D. G., Silva W. A. Jr., Zago M. A., Ribeiro-dos-Santos A. K., Santos S. E., Petzl-Erler M. L., Bonatto S. L., Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas, *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 82, 583–592.
- Feder J., Blech I., Ovadia O., Amar S., Wainstein J., Raz I., Dadon S., Arking D. E., Glaser B., Mishmar D., Differences in mtDNA haplogroup distribution among 3 Jewish populations alter susceptibility to T2DM complications, *BMC Genomics* 2008, 9, 198.
- Fedorova S. A., Reidla M., Metspalu E., Metspalu M., Rootsi S., Tambets K., Trofimova N., Zhadanov S. I., Hooshiar Kashani B., Olivieri A., Voevoda M. I., Osipova L. P., Platonov F. A., Tomsy M. I., Khusnutdinova E. K., Fu Q., Hajdinjak M., Moldovan O. T., Constantin S., Mallick S., Skoglund P., Patterson N., Rohland N., Lazaridis I., Nickel B., Viola B., Prüfer K., Meyer M., Kelso J., Reich D., Pääbo S., An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor, *Nature* 2015, 524, 216–219.
- Feldman M., Fernández-Domínguez E., Reynolds L., Baird D., Pearson J., Hershkovitz I., May H., Gor-

- ing-Morris N., Benz M., Gresky J., Bianco R. A., Fairbairn A., Mustafaoğlu G., Stockhammer P. W., Posth C., Haak W., Jeong C., Krause J., Late Pleistocene human genome suggests a local origin for the first farmers of central Anatolia, *Nat. Commun.* 2019, 10, 1218.
- Ferreira R. C., Rodrigues C. R., Broach J. R., Briciones M. R., Neandertal signatures in modern human mitochondrial genome haplogroups? *bioRxiv* S2018 190363, 2017 (doi: <https://doi.org/10.1101/190363>).
- Forster P., Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2004, 35, 255–264.
- Fregel R., Méndez F.L., Bokbot Y., Martín-Socas D., Camalich-Massieu M. D., Santana J., Morales J., Ávila-Arcos M. C., Underhill P. A., Shapiro B., Wojcik G., Rasmussen M., Soares A. E. R., Kapp J., Sockell A., Rodríguez-Santos F. J., Mikdad A., Trujillo-Mederos A., Bustamante C. D., Ancient genomes from North Africa evidence prehistoric migrations to the Maghreb from both the Levant and Europe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, 115, 6774–6779.
- Friedlaender J., Schurr T., Gentz F., Koki G., Friedlander F., Horvat G., Babb P., Cerchio S., Kaestle F., Schanfield M., Deka R., Yanagihara R., Andrew Merriwether D., Expanding Southwest Pacific mitochondrial haplogroups P and Q, *Mol. Biol. Evol.* 2005, 22, 1506–1517 [published correction appears in *Mol. Biol. Evol.* 2005, 22, 2313].
- Fu Q., Mittnik A., Johnson P. L. F., Bos K., Lari M., Bollongino R., Sun C., Giemsch L., Schmitz R., Burger J., Ronchitelli A. M., Martini F., Cremonesi R. G., Svoboda J., Bauer P., Caramelli D., Castellano S., Reich D., Pääbo S., Gonder M. K., Mortensen H. M., Reed F. A., de Sousa A., Tishkoff S. A., Whole-mtDNA genome sequence analysis of ancient African lineages, *Mol. Biol. Evol.* 2007, 24, 757–768.
- Fu Q., Meyer M., Gao X., Stenzel U., Burbano H. A., Kelso J., Pääbo S., DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013. 110, 2223–2227.
- Fu Q., Mittnik A., Johnson P. L. F., Bos K., Lari M., Bollongino R., Sun C., Giemsch L., Schmitz R., Burger J., Ronchitelli A. M., Martini F., Cremonesi R. G., Svoboda J., Bauer P., Caramelli D., Castellano S., Reich D., Pääbo S., Krause J., A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes, *Curr. Biol.* 2013, 23, 553–559.
- Fu Q., Li H., Moorjani P., Jay F., Slepchenko S. M., Bondarev A. A., Johnson P. L., Aximu-Petri A., Prüfer K., de Filippo C., Meyer M., Zwyns N., Salazar-García D. C., Kuzmin Y. V., Keates S. G., Kosintsev P. A., Razhev D. I., Richards M. P., Peristov N. V., Lachmann M., Douka K., Higham T. F., Slatkin M., Hublin J. J., Reich D., Kelso J., Viola T. B., Pääbo S., Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia, *Nature* 2014, 514, 445–449.
- Fu Q., Posth C., Hajdinjak M., Petr M., Mallick S., Fernandes D., Furtwängler A., Haak W., Meyer M., Mittnik A., Nickel B., Peltzer A., Rohland N., Slon V., Talamo S., Lazaridis I., Lipson M., Mathieson I., Schiffels S., Skoglund P., Derevianko A. P., Drozdov N., Slavinsky V., Tsybankov A., Cremonesi R. G., Mallegni F., Gély B., Vacca E., Morales M. R., Straus L. G., Neugebauer-Maresch C., Teschler-Nicola M., Constantin S., Moldovan O. T., Benazzi S., Peresani M., Coppola D., Lari M., Ricci S., Ronchitelli A., Valentin F., Thevenet C., Wehrberger K., Grigorescu D., Rougier H., Crevecoeur I., Flas D., Semal P., Maninino M. A., Cupillard C., Bocherens H., Conard N. J., Harvati K., Moiseyev V., Drucker D. G., Svoboda J., Richards M. P., Caramelli D., Pinhasi R., Kelso J., Patterson N., Krause J., Pääbo S., Reich D., The genetic history of Ice Age Europe, *Nature* 2016, 534, 200–205.

- Geel B., van Bokovenko N. A., Burova N. D., Chugunov K. V., Dergachev V. A., Dirksen V. G., Kulkova M., Nagler A., Parzinger H., Plicht J., van der Vasiliev S. S., Zaitseva G. I., Climate change and the expansion of the Scythian culture after 850 BC: a hypothesis, *J. Archaeol. Sci.* 2004, 31, 1735–1742.
- Gonder M. K., Mortensen H. M., Reed F. A., De Sousa A., Tishkoff S. A., Whole-mtDNA Genome Sequence Analysis of Ancient African Lineages, *Mol. Biol. Evol.* 2007, 24, 757–768.
- González A. M., García O., Larruga J. M., Cabrera V. M., The mitochondrial lineage U8a reveals a Paleolithic settlement in the Basque country, *BMC Genomics* 2006, 7, 124.
- González A. M., Larruga J. M., Abu-Amero K. K., Shi Y., Pestano J., Cabrera V. M., Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa, *BMC Genomics* 2007, 8, 223.
- Götherström A., Anderung C., Hellborg L., Elburg R., Smith C., Bradley D. G., Ellegren H., Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe, *Proc. Biol. Sci.* 2005, 272, 2345–2350 [Erratum in: *Proc Biol Sci.* 2005, 272, 2660].
- Green R. E., Malaspina A. S., Krause J., Briggs A. W., Johnson P. L., Uhler C., Meyer M., Good J. M., Maricic T., Stenzel U., Prüfer K., Siebauer M., Burbano H. A., Ronan M., Rothberg J. M., Egholm M., Rudan P., Brajković D., Kučan Z., Gusić I., Wikström M., Laakkonen L., Kelso J., Slatkin M., Pääbo S., A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing, *Cell* 2008, 134, 416–426.
- Grugni V., Battaglia V., Hooshyar Kashani B., Parolo S., Al-Zahery N., Achilli A., Olivieri A., Gandini F., Houshmand M., Sanati M. H., Torroni A., Semino O., Ancient migratory events in the Middle East: new clues from the Y-chromosome variation of modern Iranians, *PLoS One* 2012, 7, e41252.
- Haak W., Lazaridis I., Patterson N., Rohland N., Mallick S., Llamas B., Brandt G., Nordenfelt S., Harney E., Stewardson K., Fu Q., Mittnik A., Bánffy E., Economou C., Francken M., Friederich S., Pena R. G., Hallgren F., Khartanovich V., Khokhlov A., Kunst M., Kuznetsov P., Meller H., Mochalov O., Moiseyev V., Nicklisch N., Pichler S. L., Risch R., Rojo Guerra M. A., Roth C., Szécsényi-Nagy A., Wahl J., Meyer M., Krause J., Brown D., Anthony D., Cooper A., Alt K. W., Reich D., Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe, *Nature* 2015, 522, 207–211.
- Hassan H. Y., Underhill P. A., Cavalli-Sforza L. L., Ibrahim M. E., Y-chromosome variation among Sudanese: restricted gene flow, concordance with language, geography, and history, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2008, 137, 316–323.
- Haber M., Platt D. E., Ashrafian Bonab M., Youhanna S. C., Soria-Hernanz D. F., Martínez-Cruz B., Douaihy B., Ghassibe-Sabbagh M., Rafatpanah H., Ghanbari M., Whale J., Balanovsky O., Wells R. S., Comas D., Tyler-Smith C., Zalloua P. A., Genographic Consortium. Afghanistan's ethnic groups share a Y-chromosomal heritage structured by historical events, *PLoS One* 2012, 7, e34288.
- Haber M., Doumet-Serhal C., Scheib C. L., Xue Y., Mikulski R., Martiniano R., Fischer-Genz B., Schutkowski H., Kivisild T., Tyler-Smith C., Transient Pulse of Genetic Admixture from the Crusaders in the Near East Identified from Ancient Genome Sequences, *Am. J. Hum. Genet.* 2019a, 104, 977–984.
- Haber M., Jones A. L., Connell B. A., Asan, Arciero E., Yang H., Thomas M. G., Xue Y., Tyler-Smith C., A Rare Deep-Rooting D0 African Y-Chromosomal Haplogroup and Its Implications for the Expansion of

- Modern Humans Out of Africa, *Genetics* 2019b, 212, 1421–1428.
- Hänni C., Laudet V., Stehelin D., Taberlet P., Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91, 12336–12340.
- Helgason A., Pálsson G., Pedersen H. S., Angulalik E., Gunnarsdóttir E. D., Yngvadóttir B., Stefánsson K., mtDNA variation in Inuit populations of Greenland and Canada: migration history and population structure, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2006, 130, 123–134.
- Herrera K. J., Lowery R. K., Hadden L., Calderon S., Chiou C., Yepiskoposyan L., Regueiro M., Underhill P. A., Herrera R. J., Neolithic patrilineal signals indicate that the Armenian plateau was repopulated by agriculturalists, *Eur. J. Hum. Genet.* 2012, 20, 313–320.
- Heyer E., Sibert A., Austerlitz F., Cultural transmission of fitness: genes take the fast lane, *Trends Genet.* 2005, 21, 234–239.
- Hill C., Soares P., Mormina M., Macaulay V., Meehan W., Blackburn J., Clarke D., Raja J. M., Ismail P., Bulbeck D., Oppenheimer S., Richards M., Phylogeography and ethnogenesis of aboriginal Southeast Asians, *Mol. Biol. Evol.* 2006, 23, 2480–2491.
- Hill C., Soares P., Mormina M., Macaulay V., Clarke D., Blumbach P. B., Vizuete-Forster M., Forster P., Bulbeck D., Oppenheimer S., Richards M., A mitochondrial stratigraphy for island southeast Asia, *Am. J. Hum. Gen.* 2007, 80, 29–43.
- Hofmanová Z., Kreutzer S., Hellenthal G., Sell C., Diekmann Y., Díez-Del-Molino D., van Dorp L., López S., Kousathanas A., Link V., Kirsanow K., Cassidy L. M., Martiniano R., Strobel M., Scheu A., Kotsakis K., Halstead P., Triantaphyllou S., Kyparissi-Apostolika N., Urem-Kotsou D., Ziota C., Adaktylou F., Gopalan S., Bobo D. M., Winkelbach L., Blöcher J., Unterländer M., Leuenberger C., Çilingiroğlu Ç., Horejs B., Gerritsen F., Shennan S. J., Bradley D.G., Currat M., Veeramah K. R., Wegmann D., Thomas M. G., Papa-georgopoulou C., Burger J., Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, 6886–6891.
- Hristov P., Sirakova D., Mitkov I., Spassov N., Radoslavov G., Balkan brachicerous cattle – the first domesticated cattle in Europe, *Mitochondrial DNA* 2018, 29, 56–61.
- <https://www.medgadget.com/2015/09/nanopore-minion-novel-dna-sequencing-device-diagnosis-treatment-guidance-urinary-tract-infections.html>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Haplogroup_CT
- Chandrasekar A., Kumar S., Sreenath J., Sarkar B. N., Urade B. P., Mallick S., Bandopadhyay S. S., Barua P., Barik S. S., Basu D., Kiran U., Gangopadhyay P., Sahani R., Prasad B. V., Gangopadhyay S., Lakshmi G. R., Ravuri R. R., Padmaja K., Venugopal P. N., Sharma M. B., Rao V. R., Updating phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup m in India: dispersal of modern human in South Asian corridor, *PloS One* 2009, 4, e7447.
- Chavarro-Portillo B., Soto C. Y., Guerrero M. I., Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation, *Acta Trop.* 2019, 197, 105041.
- ISOGG (International Society of Genetic Genealogy) https://isogg.org/tree/ISOGG_HapgrpF.html
- Itan Y., Powell A., Beaumont M. A., Burger J., Thomas M. G., The origins of lactase persistence in Europe, *PloS Comput. Biol.* 2009, 5, e1000491.
- Jonathan J., Migration of Yamnaya-related people, 2020, staženo 07-04-2021, z https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e9/Yamnaya-related_migrations.jpg/1920px-Yamnaya-related_migrations.jpg?1617824258681
- Juras A., Chyleński M., Ehler E., Malmström H., Żurkiewicz D., Włodarczyk P., Wilk S., Peška J.,

- Fojtík P., Králík M., Libera J., Bagińska J., Tunia K., Klochko V. I., Dabert M., Jakobsson M., Koško A., Mitochondrial genomes reveal an east to west cline of steppe ancestry in Corded Ware populations, *Sci Rep.* 2018, 8, 11603.
- Karafet T., Xu L., Du R., Wang W., Feng S., Wells R. S., Redd A. J., Zegura S. L., Hammer M. F., Paternal population history of East Asia: sources, patterns, and microevolutionary processes, *Am. J. Hum. Genet.* 2001, 69, 615–628.
- Karafet T. M., Mendez F. L., Meilerman M. B., Underhill P. A., Zegura S. L., Hammer M. F., New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree, *Genome Res.* 2008, 18, 830–838.
- Karafet T. M., Mendez F. L., Sudoyo H., Lansing J. S., Hammer M. F., Improved phylogenetic resolution and rapid diversification of Y-chromosome haplogroup K-M526 in Southeast Asia, *Eur. J. Hum. Genet.* 2015, 23, 369–373.
- Karmin M., Saag L., Vicente M., Wilson Sayres M. A., Järve M., Talas U. G., Rootsi S., Ilumäe A. M., Mägi R., Mitt M., Pagani L., Puurand T., Faltyskova Z., Clemente F., Cardona A., Metspalu E., Sahakyan H., Yunusbayev B., Hudjashov G., DeGiorgio M., Loogväli E. L., Eichstaedt C., Eelmets M., Chaubey G., Tambets K., Litvinov S., Mormina M., Xue Y., Ayub Q., Zoraqi G., Korneliussen T. S., Akhatova F., Lachance J., Tishkoff S., Momynaliev K., Ricaut F. X., Kusuma P., Razafindrazaka H., Pierron D., Cox M. P., Sultana G. N., Willerslev R., Muller C., Westaway M., Lambert D., Skaro V., Kovačević L., Turdikulova S., Dalimova D., Khusainova R., Trofimova N., Akhmetova V., Khidiyatova I., Lichman D. V., Isakova J., Pocheshkhova E., Sabitov Z., Barashkov N. A., Nymadawa P., Mihailov E., Seng J. W., Evseeva I., Migliano A. B., Abdullah S., Andriadze G., Primorac D., Atramentova L., Utevska O., Yepiskoposyan L., Marjanovic D., Kushniarevich A., Behar D. M., Gilissen C., Vissers L., Veltman J. A., Balanovska E., Derenko M., Malyarchuk B., Metspalu A., Fedorova S., Eriksson A., Manica A., Mendez F. L., Karafet T. M., Veeramah K. R., Bradman N., Hammer M. F., Osipova L. P., Balanovsky O., Khusnutdinova E. K., Johnsen K., Remm M., Thomas M. G., Tyler-Smith C., Underhill P. A., Willerslev E., Nielsen R., Metspalu M., Vilems R., Kivisild T., A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture, *Genome Res.* 2015, 25, 459–66.
- Ke Y., Su B., Song X., Lu D., Chen L., Li H., Qi C., Marzuki S., Deka R., Underhill P., Xiao C., Shriver M., Lell J., Wallace D., Wells R. S., Seielstad M., Oefner P., Zhu D., Jin J., Huang W., Chakraborty R., Chen Z., Jin L., African origin of modern humans in East Asia: a tale of 12,000 Y chromosomes, *Science* 2001, 292, 1151–1153.
- Keller A., Graefen A., Ball M., Matzas M., Boissguerin V., Maixner F., Leidinger P., Backes C., Khairat R., Forster M., Stade B., Franke A., Mayer J., Spangler J., McLaughlin S., Shah M., Lee C., Harkins T. T., Sartori A., Moreno-Estrada A., Henn B., Sikora M., Semino O., Chiaroni J., Rootsi S., Myres N. M., Cabrera V. M., Underhill P. A., Bustamante C. D., Vigl E. E., Samadelli M., Cipollini G., Haas J., Katus H., O'Connor B. D., Carlson M. R., Meder B., Blin N., Meese E., Pusch C. M., Zink A., New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing, *Nat. Commun.* 2012, 3, 698.
- Key F. M., Abdul-Aziz M. A., Mundry R., Peter B. M., Sekar A., D'Amato M., Dennis M. Y., Schmidt J. M., Andrés A. M., Human local adaptation of the TRPM8 cold receptor along a latitudinal cline, *PloS Genet.* 2018, 14, e1007298.
- Kim S. H., Kim K. C., Shin D. J., Jin H. J., Kwak K. D., Han M. S., Song J. M., Kim W., Kim W., High frequen-

- cies of Y-chromosome haplogroup O2b-SRY465 lineages in Korea: a genetic perspective on the peopling of Korea, *Investig. Genet.* 2011, 2, 10.
- Kim B. Y., Lohmueller K. E., Selection and reduced population size cannot explain higher amounts of Neandertal ancestry in East Asian than in European human populations, *Am. J. Hum. Genet.* 2015, 96, 454–461.
- Kivisild T., Rootsi S., Metspalu M., Mastana S., Kaldma K., Parik J., Metspalu E., Adojaan M., Tolk H. V., Stepanov V., Gölge M., Usanga E., Papiha S. S., Cinnioglu C., King R., Cavalli-Sforza L., Underhill P. A., Vilems R., The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations, *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72, 313–332.
- Krajewski C., Buckley L., Westerman M., DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved, *Proc. Biol. Sci.* 1997, 264, 911–917.
- Krause J., Fu Q., Good J. M., Viola B., Shunkov M. V., Derevianko A. P., Pääbo S., The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia, *Nature* 2010, 464, 894–897.
- Krings M., Stone A., Schmitz R. W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S., Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans, *Cell* 1997, 90, 19–30.
- Kučera L., Peška J., Fojtík P., Barták P., Sokolovská D., Pavelka J., Komárková V., Beneš J., Polcerová L., Králík M., Bednář P., Determination of Milk Products in Ceramic Vessels of Corded Ware Culture from a Late Eneolithic Burial, *Molecules* 2018, 23, 3247.
- Kujanová M., Pereira L., Fernandes V., Pereira J. B., Cerný V., Near eastern neolithic genetic input in a small oasis of the Egyptian Western Desert, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2009, 140, 336–346.
- Kushniarevich A., Sivitskaya L., Danilenko N., Novogrodskii T., Tsybovsky I., Kiseleva A., Kotova S., Chaubey G., Metspalu E., Sahakyan H., Bahmanimehr A., Reidla M., Rootsi S., Parik J., Reisberg T., Achilli A., Hooshiar Kashani B., Gandini F., Olivieri A., Behar D. M., Torroni A., Davydenko O., Vilems R., Uniparental genetic heritage of belarusians: encounter of rare middle eastern matrilineages with a central European mitochondrial DNA pool, *PLoS One* 2013, 8, e66499.
- Lacan M., Keyser C., Ricaut F. X., Brucato N., Tarrús J., Bosch A., Guilaine J., Crubézy E., Ludes B., Ancient DNA suggests the leading role played by men in the Neolithic dissemination to Italy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 18255–18259.
- Lacan M., Keyser C., Ricaut F. X., Brucato N., Duranthon F., Guilaine J., Crubézy E., Ludes B., Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 9788–9791.
- Lalueza-Fox C., Sampietro M. L., Gilbert M. T., Castri L., Facchini F., Pettener D., Bertranpetit J., Unravelling migrations in the steppe: mitochondrial DNA sequences from ancient central Asians, *Proc. Biol. Sci.* 2004, 271, 941–947.
- Lamberg Karlovsky C., Archaeology and Language: The Indoeuropeans, *Curr. Anthropol.* 2002, 43, 63–88.
- Larruga J. M., Marrero P., Abu-Amero K. K., Golubenko M. V., Cabrera V. M., Carriers of mitochondrial DNA macrohaplogroup R colonized Eurasia and Australasia from a southeast Asia core area, *BMC Evol. Biol.* 2017, 17, 115.
- Larson G., Dobney K., Albarella U., Fang M., Matisoo-Smith E., Robins J., Lowden S., Finlayson H., Brand T., Willerslev E., Rowley-Conwy P., Andersson L., Cooper A., Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication, *Science* 2005, 307, 1618–1621.
- Larson G., Albarella U., Dobney K., Rowley-Conwy P., Schibler J., Tresset A., Vigne J. D., Edwards C. J.,

- Schlumbaum A., Dinu A., Balaşescu A., Dolman G., Tagliacozzo A., Manaseryan N., Miracle P., Van Wijngaarden-Bakker L., Masseti M., Bradley D. G., Cooper A., Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 15276–15281.
- Lazaridis I., Mittnik A., Patterson N., Mallick S., Rohland N., Pfrengle S., Furtwängler A., Peltzer A., Posth C., Vasilakis A., McGeorge P. J. P., Kousolaki-Yannopoulou E., Korres G., Martlew H., Michalodimitrakis M., Özşait M., Özşait N., Papathanasiou A., Richards M., Roodenberg S. A., Tzedakis Y., Arnott R., Fernandes D. M., Hughey J. R., Lotakis D. M., Navas P. A., Maniatis Y., Stamatoyannopoulos J. A., Stewardson K., Stockhammer P., Pinhasi R., Reich D., Krause J., Stamatoyannopoulos G., Genetic origins of the Minoans and Mycenaeans, *Nature* 2017, 548, 214–218.
- Li L., Speed T. P., An estimate of the crosstalk matrix in four-dye fluorescence-based DNA sequencing, *Electrophoresis* 1999, 20, 1433–1442.
- Lindgren J., Sjövall P., Thiel V., Zheng W., Ito S., Wakamatsu K., Hauff R., Kear B. P., Engdahl A., Alwmark C., Eriksson M. E., Jarenmark M., Sachs S., Ahlberg P. E., Marone F., Kuriyama T., Gustafsson O., Malmberg P., Thomen A., Rodríguez-Meizoso I., Uvdal P., Ojika M., Schweitzer M. H., Soft-tissue evidence for homeothermy and crypsis in a Jurassic ichthyosaur, *Nature* 2018, 564, 359–365.
- Loy T., Blood on the Axe, *New Sci.* 1998, 159, 40–43.
- Lucioni Maristany, M. Hypothesized map of human migration based on mitochondrial DNA, Wikipedie, 2010a, staženo 06.04.2021, https://cs.wikipedia.org/wiki/Haploskupiny_lidské_mitochondriální_DNA
- Lucioni Maristany, M. World map of early migration of modern humans on the Y-chromosome DNA, Wikipedie, 2010b, staženo 06.04.2021, https://en.wikipedia.org/wiki/File:Migraciones_humanas_en_haplogrupos_de_ADN-Y.PNG
- MacAulay V., Hill C., Achilli A., Rengo C., Clarke D., Meehan W., Blackburn J., Semino O., Scozzari R., Cruciani F., Taha A., Kassim Shaari N., Raja J. M., Ismail P., Zainuddin Z., Goodwin W., Bulbeck D., Bandelt H. J., Oppenheimer S., Torroni A., Richards M., Single, Rapid Coastal Settlement of Asia Revealed by Analysis of Complete Mitochondrial Genomes, *Science* 2005, 308, 1034–1036.
- Mahal D. G., Matsoukas I. G., The Geographic Origins of Ethnic Groups in the Indian Subcontinent: Exploring Ancient Footprints with Y-DNA Haplogroups, *Front. Genet.* 2018, 9, 4.
- Maixner F., Krause-Kyora B., Turaev D., Herbig A., Hoopmann M. R., Hallows J. L., Kusebauch U., Vigl E. E., Malfertheiner P., Megraud F., O'Sullivan N., Cipollini G., Coia V., Samadelli M., Engstrand L., Linz B., Moritz R. L., Grimm R., Krause J., Nebel A., Moodley Y., Rattei T., Zink A., The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman, *Science* 2016, 351, 162–165.
- Maji S., Krithika S., Vasulu T. S., Distribution of Mitochondrial DNA Macrohaplogroup N in India with Special Reference to Haplogroup R and its Sub-Haplogroup U, *Int. J. Hum. Gen.* 2008, 8, 85–96.
- Malhi R. S., Smith D. G., Brief communication: Haplogroup X confirmed in prehistoric North America, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2002, 119, 84–86.
- Malmström H., Gilbert M. T., Thomas M. G., Brandström M., Storå J., Molnar P., Andersen P. K., Bendixen C., Holmlund G., Götherström A., Willerslev E., Ancient DNA reveals lack of continuity between neolithic hunter-gatherers and contemporary Scandinavians, *Curr. Biol.* 2009, 19, 1758–1762.
- Mary L., Zvenigorosky V., Kovalev A., Gonzalez A., Fausser J. L., Jagorel F., Kilunovskaya M., Semenov V.,

- Crubézy E., Ludes B., Keyser C., Genetic kinship and admixture in Iron Age Scytho-Siberians, *Hum. Genet.* 2019, 138, 411–423.
- Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N., Mallick S., Llamas B., Pickrell J., Meller H., Guerra M. A., Krause J., Anthony D., Brown D., Lalueza-Fox C., Cooper A., Alt K. W., Haak W., Patterson N., Reich D., Eight thousand years of natural selection in Europe, *bioRxiv* [Internet] 2015. (DOI:10.1101/016477).
- Mathieson I., Alpaslan-Roodenberg S., Posth C., Szécsényi-Nagy A., Rohland N., Mallick S., Olalde I., Broomandkhoshbacht N., Candilio F., Cheronet O., Fernandes D., Ferry M., Gamarra B., Fortes G. G., Haak W., Harney E., Jones E., Keating D., Krause-Kyora B., Kucukkalipci I., Michel M., Mitnik A., Nägele K., Novak M., Oppenheimer J., Patterson N., Pfrengle S., Sirak K., Stewardson K., Vai S., Alexandrov S., Alt K. W., Andreescu R., Antonović D., Ash A., Atanassova N., Bacvarov K., Gusztáv M. B., Bocherens H., Bolus M., Boroneanț A., Boyadzhiev Y., Budnik A., Burmaz J., Chohadzhiev S., Conard N. J., Cottiaux R., Čuka M., Cupillard C., Drucker D. G., Elenski N., Francken M., Galabova B., Ganetsovski G., Gély B., Hajdu T., Handzhyiska V., Harvati K., Higham T., Iliev S., Janković I., Karavanić I., Kennett D. J., Komšo D., Kozak A., Labuda D., Lari M., Lazar C., Leppek M., Leshtakov K., Vetro D. L., Los D., Lozanov I., Malina M., Martini F., McSweeney K., Meller H., Mendišić M., Mirea P., Moiseyev V., Petrova V., Price T. D., Simalcik A., Sineo L., Šlaus M., Slavchev V., Stanev P., Starović A., Szeniczey T., Talamo S., Teschler-Nicola M., Thevenet C., Valchev I., Valentin F., Vasilyev S., Veljanovska F., Venelinova S., Veselovskaya E., Viola B., Virag C., Zaninović J., Zäuner S., Stockhammer P. W., Catalano G., Krauß R., Caramelli D., Zariņa G., Gaydarska B., Lillie M., Nikitin A. G., Potekhina I., Papathanasiou A., Borić D., Bonsall C., Krause J., Pinhasi R., Reich D., The genomic history of southeastern Europe, *Nature* 2018, 555, 197–203.
- McCoy R. C., Wakefield J., Akey J. M., Impacts of Neanderthal-Introgressed Sequences on the Landscape of Human Gene Expression, *Cell* 2017 168, 916–927.
- McElreavey K., Quintana-Murci L., A population genetics perspective of the Indus Valley through uniparentally-inherited markers, *Ann. Hum. Biol.* 2005, 32, 154–162.
- Meyer M., Kircher M., Gansauge M.-T., Li H., Racimo F., Mallick S., Schraiber J. G., Jay F., Prüfer K., de Filippo C., Sudmant P. H., Alkan C., Fu Q., Do R., Rohland N., Tandon A., Siebauer M., Green R. E., Bryc K., Briggs A. W., Stenzel U., Dabney J., Shendure J., Kitzman J., Hammer M. F., Shunkov M. V., Deriviano A. P., Patterson N., Andrés A. M., Eichler E. E., Slatkin M., Reich D., Kelso J., Pääbo S., A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual, *Science* 2012, 338, 222–226.
- Meyer M., Fu Q., Aximu-Petri A., Glocke I., Nickel B., Arsuaga J. L., Martínez I., Gracia A., de Castro J. M., Carbonell E., Pääbo S., A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos, *Nature* 2014, 505, 403–406.
- Meyer M., Arsuaga J. L., de Filippo C., Nagel S., Aximu-Petri A., Nickel B., Martínez I., Gracia A., Bermúdez de Castro J. M., Carbonell E., Viola B., Kelso J., Prüfer K., Pääbo S., Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins, *Nature* 2016, 531, 504–507.
- Martinez L., Underhill P. A., Zhivotovsky L. A., Gayden T., Moschonas N. K., Chow C. E., Conti S., Mamolini E., Cavalli-Sforza L. L., Herrera R. J., Paleolithic Y-haplogroup heritage predominates in a Cretan highland plateau, *Eur. J. Hum. Genet.* 2007, 15, 485–493.

- Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N., Mallick S., Patterson N., Roodenberg S. A., Harney E., Stewardson K., Fernandes D., Novak M., Sirak K., Gamba C., Jones E. R., Llamas B., Dryomov S., Pickrell J., Arsuaga J. L., de Castro J. M., Carbonell E., Gerritsen F., Khokhlov A., Kuznetsov P., Lozano M., Meller H., Mochalov O., Moiseyev V., Guerra M. A., Roodenberg J., Vergès J. M., Krause J., Cooper A., Alt K. W., Brown D., Anthony D., Lalueza-Fox C., Haak W., Pinhasi R., Reich D., Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians, *Nature* 2015, 528, 499–503.
- Mendez F. L., Krahn T., Schrack B., Krahn A. M., Veeramah K. R., Woerner A. E., Fomine F. L., Bradman N., Thomas M. G., Karafet T. M., Hammer M. F., An African American paternal lineage adds an extremely ancient root to the human Y chromosome phylogenetic tree, *Am. J. Hum. Genet.* 2013, 92, 454–459.
- Metspalu M., Kivisild T., Bandelt H. J., Richards M., Villems R., The pioneer settlement of modern humans in Asia. In: Bandelt H. J., Macaulay V., Richards M. (eds.), *Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens*, Springer-Verlag, Berlin 2006, s. 181–199.
- Metspalu M., Cornejo O. E., Malaspinas A. S., Wang Y., Rasmussen M., Raghavan V., Hansen T. V., Khusnutdinova E., Pierre T., Dneprovsky K., Andreasen C., Lange H., Hayes M. G., Coltrain J., Spitsyn V. A., Götherström A., Orlando L., Kivisild T., Villems R., Crawford M. H., Nielsen F. C., Dissing J., Heinemeier J., Meldgaard M., Bustamante C., O'Rourke D. H., Jakobsson M., Gilbert M. T., Nielsen R., Willerslev E., The genetic prehistory of the New World Arctic, *Science* 2014, 345, 1255832.
- Meyer Ch., Lohr Ch., Gronenborn D., Alt K. A., The massive mass grave of Schöneck-Kilianstädten, *Proc. Nat. Acad. Sci.* Sep. 2015, 112, 11217–11222.
- Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Golik P., Macaulay V., Clark A. G., Hosseini S., Brandon M., Easley K., Chen E., Brown M. D., Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 171–176.
- Müller R., Roberts C. A., Brown T. A., Genotyping of ancient Mycobacterium tuberculosis strains reveals historic genetic diversity, *Proc. Biol. Sci.* 2014, 281, 20133236.
- Murphy W. A. Jr., Nedden D., Gostner P., Knapp R., Recheis W., Seidler H., The iceman: discovery and imaging, *Radiology* 2003, 226, 614–629.
- Nagle N., Ballantyne K. N., van Oven M., Tyler-Smith C., Xue Y., Taylor D., Wilcox S., Wilcox L., Turkalov R., van Oorschot R. A., McAllister P., Williams L., Kayser M., Mitchell R. J., Genographic Consortium. Antiquity and diversity of aboriginal Australian Y-chromosomes, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2016, 159, 367–381.
- Nagle N., Ballantyne K. N., van Oven M., Tyler-Smith C., Xue Y., Wilcox S., Wilcox L., Turkalov R., van Oorschot R. A. H., Holst Pellekaan S., Schurr T. G., McAllister P., Williams L., Kayser M., Mitchell R. J., Mitochondrial DNA diversity of present-day Aboriginal Australians and implications for human evolution in Oceania, *J. Hum. Genet.* 2017, 62, 343–353.
- Narasimhan V. M., Patterson N., Moorjani P., Rohland N., Bernardos R., Mallick S., Lazaridis I., Nakatsuka N., Olalde I., Lipson M., Kim A. M., Olivieri L. M., Coppa A., Vidale M., Mallory J., Moiseyev V., Kitov E., Monge J., Adamski N., Alex N., Broomandkhoshbacht N., Candilio F., Callan K., Cheronet O., Culleton B. J., Ferry M., Fernandes D., Freilich S., Gamarra B., Gaudio D., Hajdinjak M., Harney É., Harper T. K., Keating D., Lawson A. M., Mah M., Mandl K., Michel M., Novak M., Oppenheimer J., Rai N., Sirak K., Slon V., Stewardson K., Zalzal F., Zhang Z., Akhatov G., Bagashev A. N., Bagnera A., Baitanayev B., Bendezu-Sarmiento J., Bissembaev A. A., Bonora G. L., Charginov T. T., Chikisheva T., Dashkovskiy P. K., Derevianko A.,

- Dobeš M., Douka K., Dubova N., Duisengali M. N., Enshin D., Epimakhov A., Fribus A. V., Fuller D., Goryachev A., Gromov A., Grushin S. P., Hanks B., Judd M., Kazizov E., Khokhlov A., Krygin A. P., Kupriyanova E., Kuznetsov P., Luiselli D., Maksudov F., Mamedov A. M., Mamirov T. B., Meiklejohn C., Merrett D. C., Micheli R., Mochalov O., Mustafokulov S., Nayak A., Pettener D., Potts R., Razhev D., Rykun M., Sarno S., Savenkova T. M., Sikhymbaeva K., Slepchenko S. M., Soltobaev O. A., Stepanova N., Svyatko S., Tabaldiev K., Teschler-Nicola M., Tishkin A. A., Tkachev V. V., Vasilyev S., Velemínský P., Voyakin D., Yermolayeva A., Zahir M., Zubkov V. S., Zubova A., Shinde V. S., Lalueza-Fox C., Meyer M., Anthony D., Boivin N., Thangaraj K., Kennett D. J., Frachetti M., Pinhasi R., Reich D., The formation of human populations in South and Central Asia, *Science* 2019, 365, eaat7487.
- Nasidze I., Sarkisian T., Kerimov A., Stoneking M., Testing hypotheses of language replacement in the Caucasus: evidence from the Y-chromosome, *Hum. Genet.* 2003, 112, 255–261.
- Nasidze I., Ling E. Y., Quinque D., Dupanloup I., Cordaux R., Rychkov S., Naumova O., Zhukova O., Sarraf-Zadegan N., Naderi G. A., Asgary S., Sardas S., Farhud D. D., Sarkisian T., Asadov C., Kerimov A., Stoneking M., Mitochondrial DNA and Y-chromosome variation in the caucasus, *Ann. Hum. Genet.* 2004a, 68, 205–221.
- Nasidze I., Quinque D., Dupanloup I., Rychkov S., Naumova O., Zhukova O., Stoneking M., Genetic evidence concerning the origins of South and North Ossetians, *Ann. Hum. Genet.* 2004b, 68, 588–599.
- Nelson E.A., Buikstra J. E., Herbig A., Tung T. A., Bos K. I., Advances in the molecular detection of tuberculosis in pre-contact Andean South America, *Int. J. Paleopathol.* 2020, S1879-9817, 30153–30156.
- Nicklisch N., Maixner F., Ganslmeier R., Friederich S., Dresely V., Meller H., Zink A., Alt K. W., Rib lesions in skeletons from early neolithic sites in Central Germany: on the trail of tuberculosis at the onset of agriculture, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012, 149, 391–404.
- Nikitin A. G., Ivanova S., Kiosak D., Badgerow J., Pashnick J., Subdivisions of haplogroups U and C encompass mitochondrial DNA lineages of Eneolithic-Early Bronze Age Kurgan populations of western North Pontic steppe, *J. Hum. Genet.* 2017, 62, 605–613.
- Ning C., Yan S., Hu K., Cui Y. Q., Jin L., Refined phylogenetic structure of an abundant East Asian Y-chromosomal haplogroup O*-M134, *Eur. J. Hum. Genet.* 2016, 24, 307–309.
- Olivieri A., Achilli A., Pala M., Battaglia V., Fornarino S., Al-Zahery N., Scozzari R., Cruciani F., Behar D. M., Dugoujon J. M., Coudray C., Santachiara-Benerecetti A. S., Semino O., Bandelt H. J., Torroni A., The mtDNA legacy of the Levantine early Upper Palaeolithic in Africa, *Science* 2006, 314, 1767–1770.
- Oget C., Servin B., Palhière I., Genetic diversity analysis of French goat populations reveals selective sweeps involved in their differentiation, *Anim. Genet.* 2019, 50, 54–63.
- Omrak A., Günther T., Valdiosera C., Svensson E. M., Malmström H., Kiesewetter H., Aylward W., Storå J., Jakobsson M., Götherström A., Genomic Evidence Establishes Anatolia as the Source of the European Neolithic Gene Pool, *Curr. Biol.* 2016, 26, 270–275.
- Orlando L., Calvignac S., Schnebelen C., Douady C. J., Godfrey L. R., Hänni C., DNA from extinct giant lemurs links archaolemurids to extant indriids, *BMC Evol Biol.* 2008, 8, 121.
- Organ C. L., Schweitzer M. H., Zheng W., Freimark L. M., Cantley L. C., Asara J. M., Molecular phylogenetics of mastodon and Tyrannosaurus rex, *Science* 2008, 320, 499.

- Pääbo S., The diverse origins of the human gene pool, *Nat. Rev. Gen.* 2015, 16, 313–314.
- Pala M., Olivieri A., Achilli A., Accetturo M., Metspalu E., Reidla M., Tamm E., Karmin M., Reisberg T., Hooshiar Kashani B., Perego U.A., Carossa V., Gandini F., Pereira J.B., Soares P., Angerhofer N., Rychkov S., Al-Zahery N., Carelli V., Sanati M. H., Houshmand M., Hatina J., Macaulay V., Pereira L., Woodward S. R., Davies W., Gamble C., Baird D., Semino O., Villems R., Torroni A., Richards M. B., Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia, *Am. J. Hum. Genet.* 2012, 90, 915–924.
- Palanichamy M. G., Sun C., Agrawal S., Bandelt H. J., Kong Q. P., Khan F., Wang C. Y., Chaudhuri T. K., Palla V., Zhang Y. P., Phylogeny of mitochondrial DNA macrohaplogroup N in India, based on complete sequencing: implications for the peopling of South Asia, *Am. J. Hum. Gen.* 2004, 75, 966–978.
- Pálfi G., Maixner F., Maczel M., Molnár E., Pósa A., Kristóf L. A., Marcsik A., Balázs J., Masson M., Paja L., Palkó A., Szentgyörgyi R., Nerlich A., Zink A., Dutour O., Unusual spinal tuberculosis in an Avar Age skeleton (Csongrád-Felgyő, Ürmös-tanya, Hungary): A morphological and biomolecular study, *Tuberculosis* (Edinb) 2015, 95, Suppl 1, S29–S34.
- Palkopoulou E., Mallick S., Skoglund P., Enk J., Rohland N., Li H., Omrak A., Vartanyan S., Poinar H., Götherström A., Reich D., Dalén L., Complete genomes reveal signatures of demographic and genetic declines in the woolly mammoth, *Curr. Biol.* 2015, 25, 1395–1400.
- Panyushkina I. P., Climate-Induced Changes in Population Dynamics of Siberian Scythians (700–250 B.C.). In: *Climates, Landscapes, and Civilizations*, Volume 198 Editor(s): Giosan L., Fuller D. Q., Nicoll K., Flad R.K., Clift P.D., Book Series: Geophysical Monograph Series 2012 (<https://doi.org/10.1029/2012GM001220>).
- Papagrigorakis M. J., Yapijakis C., Synodinos P. N., Baziotopoulou-Valavani E., DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens, *Int. J. Infect. Dis.* 2006, 10, 206–214.
- Pavelka J., Území České republiky ve vztahu k předpokládaným vícenásobným centrům domestikace prasat. In: *Opomíjená archeologie 2005–2006 = Neglected archaeology 2005–2006*, Západočeská univerzita, Filozofická fakulta, Katedra archeologie, 2007, s. 219–232. (ISBN: 978-80-254-1062-2).
- Pavelka J., Vařeka P., Příspěvek k poznání stravy ve vrcholném a pozdním středověku – A contribution to the recognition of medieval subsistence in the High and Later Middle Ages. The first results of the analysis of food residues on ceramics, *Kuděj* 2008, 1–2, 98–109.
- Pavelka J., Šmejda L., Hynek R., Hrdličková-Kučková Š., Immunological detection of denatured proteins as a method for rapid identification of food residues on archaeological pottery, *J. Archaeol. Sci.* 2016, 73, 25–35.
- Pavelková Řičánková V., Robovský J., Riegert J., Ecological structure of recent and last glacial mammalian faunas in northern Eurasia: the case of Altai-Sayan refugium, *PLoS One* 2014, 9, e85056.
- Pashnick J., *Genetic Analysis of Ancient Human Remains from the Early Bronze Age Cultures of the North Pontic Steppe Region*, Masters Theses. Nature Research 2014, 737.
- Perego U. A., Achilli A., Angerhofer N., Accetturo M., Pala M., Olivieri A., Hooshiar Kashani B., Ritchie K. H., Scozzari R., Kong Q. P., Myres N. M., Salas A., Semino O., Bandelt H. J., Woodward S. R., Torroni A., Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups, *Curr. Biol.* 2009, 19, 1–8.

- Perić M., Lauc L. B., Klarić I. M., Rootsi S., Janićijević B., Rudan I., Terzić R., Colak I., Kvesić A., Popović D., Sijacki A., Behluli I., Dordević D., Efre-movska L., Bajec D. D., Stefanović B. D., Vilems R., Rudan P., High-resolution phylogenetic analysis of southeastern Europe traces major episodes of paternal gene flow among Slavic populations, *Mol. Biol. Evol.* 2005, 22, 1964–1975.
- Piégu B., Arensburger P., Beauclair L., Chabault M., Raynaud E., Coustham V., Brard S., Guizard S., Burlot T., Le Bihan-Duval E., Bigot Y., Variations in genome size between wild and domesticated lineages of fowls belonging to the *Gallus gallus* species, *Genomics* 2020, 112, 1660–1673.
- Plet C., Grice K., Pagès A., Verrall M., Coolen M. J. L., Ruebsam W., Rickard W. D. A., Schwark L., Palaeo-biology of red and white blood cell-like structures, collagen and cholesterol in an ichthyosaur bone, *Sci Rep.* 2017, 7, 13776.
- Pordel S., Nemati K., Karimi M. H., Doroudchi M., NF- κ B1 Rs28362491 Mutant Allele Frequencies along the Silk Road and Beyond, *Iran J. Public Health.* 2018, 47, 397–406.
- Poznik G. D., Henn B. M., Yee M. C., Sliwerska E., Euskirchen G. M., Lin A. A., Snyder M., Quintana-Murci L., Kidd J. M., Underhill P. A., Bustamante C. D., Sequencing Y chromosomes resolves discrepancy in time to common ancestor of males versus females, *Science* 2013, 341, 562–565.
- Poznik G. D., Xue Y., Mendez F. L., Willems T. F., Massaia A., Wilson Sayres M. A., Ayub Q., McCarthy S. A., Narechania A., Kashin S., Chen Y., Banerjee R., Rodriguez-Flores J. L., Cerezo M., Shao H., Gymrek M., Malhotra A., Louzada S., Desalle R., Ritchie G. R., Cerveira E., Fitzgerald T. W., Garrison E., Marcketta A., Mittelman D., Romanovitch M., Zhang C., Zheng-Bradley X., Abecasis G. R., McCarroll S. A., Flicek P., Underhill P. A., Coin L., Zerbin D. R., Yang F., Lee C., Clarke L., Auton A., Erlich Y., Handsaker R. E., 1000 Genomes Project Consortium, Bustamante C. D., Tyler-Smith C., Punctuated bursts in human male demography inferred from 1,244 worldwide Y-chromosome sequences, *Nat Genet.* 2016, 48, 593–599.
- Prüfer K., Racimo F., Patterson N., Jay F., Sankararaman S., Sawyer S., Heinze A., Renaud G., Sudmant P. H., de Filippo C., Li H., Mallick S., Dannemann M., Fu Q., Kircher M., Kuhlwlilm M., Lachmann M., Meyer M., Ongyerth M., Siebauer M., Theunert C., Tandon A., Moorjani P., Pickrell J., Mullikin J. C., Vohr S. H., Green R. E., Hellmann I., Johnson P. L., Blanche H., Cann H., Kitzman J. O., Shendure J., Eichler E. E., Lein E. S., Bakken T. E., Golovanova L. V., Doronichev V. B., Shunkov M. V., Derevianko A. P., Viola B., Slatkin M., Reich D., Kelso J., Pääbo S., The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains, *Nature* 2014, 505, 43–49.
- Qamar R., Ayub Q., Mohyuddin A., Helgason A., Mazhar K., Mansoor A., Zerjal T., Tyler-Smith C., Mehdi S. Q., Y-chromosomal DNA variation in Pakistan, *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 70, 1107–1124.
- Quintana-Murci L., Semino O., Bandelt H. J., Passarino G., McElreavey K., Santachiara-Benerecetti A. S., Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens* sapiens from Africa through eastern Africa, *Nat. Genet.* 1999, 23, 437–441.
- Quintana-Murci L., Quach H., Harmant C., Luca F., Massonnet B., Patin E., Sica L., Mougouia-Daouda P., Comas D., Tzur S., Balanovsky O., Kidd K. K., Kidd J. R., van der Veen L., Hombert J. M., Gessain A., Verdu P., Froment A., Bahuchet S., Heyer E., Dausset J., Salas A., Behar D. M., Maternal traces of deep common ancestry and asymmetric gene flow between Pygmy hunter-gatherers and Bantu-speaking farmers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 1596–1601.

- Raghavan M., DeGiorgio M., Albrechtsen A., Moltke I., Skoglund P., Korneliussen T. S., Grønnow B., Appelt M., Gulløv H. C., Friesen T. M., Fitzhugh W., Malmström H., Rasmussen S., Olsen J., Melchior L., Fuller B. T., Fahrni S. M., Stafford T. Jr., Grimes V., Renouf M. A., Cybulski J., Lynnerup N., Lahr M. M., Britton K., Knecht R., Arneborg J., Rajkumar R., Bannerjee J., Gunturi H. B., Trivedi R., Kashyap V. K., Phylogeny and antiquity of M macrohaplogroup inferred from complete mt DNA sequence of Indian specific lineages, *BMC Evol. Biol.* 2005, 5, 26. [correction: *BMC Evol Biol.* 2006, 6, 9].
- Raghavan M., Skoglund P., Graf K. E., Metspalu M., Albrechtsen A., Moltke I., Rasmussen S., Stafford T. W. Jr., Orlando L., Metspalu E., Karmin M., Tambets K., Rootsi S., Mägi R., Campos P. F., Balanovska E., Balanovsky O., Khusnutdinova E., Litvinov S., Osipova L. P., Fedorova S. A., Voevoda M. I., DeGiorgio M., Sicheritz-Ponten T., Brunak S., Demeshchenko S., Kivisild T., Villems R., Nielsen R., Jakobsson M., Willerslev E., Upper Palaeolithic Siberian genome reveals dual ancestry of Native Americans, *Nature* 2014, 505, 87–91.
- Ramírez O., Gigli E., Bover P., Alcover J. A., Bertranpetit J., Castresana J., Lalueza-Fox C., Paleogenomics in a temperate environment: shotgun sequencing from an extinct Mediterranean caprine, *PloS One* 2009, 4, e5670.
- Rasmussen S., Allentoft M. E., Nielsen K., Orlando L., Sikora M., Sjögren K. G., Pedersen A. G., Schubert M., Van Dam A., Kapel C. M., Nielsen H. B., Brunak S., Avetisyan P., Epimakhov A., Khalyapin M. V., Gnutni A., Kriiska A., Lasak I., Metspalu M., Moiseyev V., Gromov A., Pokutta D., Saag L., Varul L., Yepiskoposyan L., Sicheritz-Pontén T., Foley R. A., Lahr M. M., Nielsen R., Kristiansen K., Willerslev E., Early divergent strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 years ago, *Cell* 2015, 163, 571–582.
- Regueiro M., Cadenas A. M., Gayden T., Underhill P. A., Herrera R. J., Iran: tricontinental nexus for Y-chromosome driven migration, *Hum. Hered.* 2006, 61, 132–143.
- Reich D., Price A. L., Patterson N., Principal component analysis of genetic data, *Nat. Genet.* 2008, 40, 491–492.
- Reich D., Patterson N., Kircher M., Delfin F., Nandineni M. R., Pugach I., Ko A. M., Ko Y. C., Jinam T. A., Phipps M. E., Saitou N., Wollstein A., Kayser M., Pääbo S., Stoneking M., Denisova admixture and the first modern human dispersals into Southeast Asia and Oceania, *Am. J. Hum. Genet.* 2011, 89, 516–528.
- Reidla M., Kivisild T., Metspalu E., Kaldma K., Tambets K., Tolk H. V., Parik J., Loogväli E. L., Derenko M., Malyarchuk B., Bermisheva M., Zhadanov S., Pannarun E., Gubina M., Golubenkov M., Damba L., Fedorova S., Gusar V., Grechanina E., Mikerezi I., Moisan J. P., Chaventré A., Khusnutdinova E., Osipova L., Stepanov V., Voevoda M., Achilli A., Rengo C., Rickards O., De Stefano G. F., Papiha S., Beckman L., Janicijevic B., Rudan P., Anagnou N., Michalodimitrakis E., Koziel S., Usanga E., Geberhiwot T., Herrnschmidt C., Howell N., Torroni A., Villems R., Origin and Diffusion of mtDNA Haplogroup X, *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 73, 1178–1190.
- Richards M., Macaulay V., Hickey E., Vega E., Sykes B., Guida V., Rengo C., Sellitto D., Cruciani F., Kivisild T., Villems R., Thomas M., Rychkov S., Rychkov O., Rychkov Y., Gölge M., Dimitrov D., Hill E., Bradley D., Romano V., Calì F., Vona G., Demaine A., Papiha S., Triantaphyllidis C., Stefanescu G., Hatina J., Belle-di M., Di Rienzo A., Novelletto A., Oppenheim A., Nørby S., Al-Zaheri N., Santachiara-Benerecetti S., Scozari R., Torroni A., Bandelt H. J., Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool, *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 67, 1251–1276.

- Rizzi E., Lari M., Gigli E., De Bellis G., Caramelli D., Ancient DNA studies: new perspectives on old samples, *Genet. Sel. Evol.* 2012, 44, 21. [Erratum in: *Genet Sel Evol.* 2013, 45, 4.]
- Rootsi S., Magri C., Kivisild T., Benuzzi G., Help H., Bermisheva M., Kutuev I., Barac L., Pericić M., Balanovsky O., Pshenichnov A., Dion D., Grobei M., Zhivotovsky L. A., Battaglia V., Achilli A., Al-Zahery N., Parik J., King R., Cinnioğlu C., Khusnutdinova E., Rudan P., Balanovska E., Scheffrahn W., Simonescu M., Brehm A., Goncalves R., Rosa A., Moisan J. P., Chaventre A., Ferak V., Füredi S., Oefner P. J., Shen P., Beckman L., Mikerezi I., Terzić R., Primorac D., Cambon-Thomsen A., Krumina A., Torroni A., Underhill P. A., Santachiara-Benerecetti A. S., Villems R., Semino O., Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe, *Am. J. Hum. Genet.* 2004, 75, 128–137.
- Rootsi S., Zhivotovsky L. A., Baldovic M., Kayser M., Kutuev I. A., Khusainova R., Bermisheva M. A., Gubina M., Fedorova S. A., Ilumäe A. M., Khusnutdinova E. K., Voevoda M. I., Osipova L. P., Stoneking M., Lin A. A., Ferak V., Parik J., Kivisild T., Underhill P. A., Villems R., A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe, *Eur. J. Hum. Genet.* 2007, 15, 204–211.
- Rootsi S., Myres N. M., Lin A. A., Järve M., King R. J., Kutuev I., Cabrera V. M., Khusnutdinova E. K., Varendi K., Sahakyan H., Behar D. M., Khusainova R., Balanovsky O., Balanovska E., Rudan P., Yepiskoposyan L., Bahmanimehr A., Farjadian S., Kushniarevich A., Herrera R. J., Grugni V., Battaglia V., Nici C., Crobu F., Karachanak S., Hooshiar Kashani B., Houshmand M., Sanati M. H., Toncheva D., Lisa A., Semino O., Chiaroni J., Di Cristofaro J., Villems R., Kivisild T., Underhill P. A., Distinguishing the co-ancestries of haplogroup G Y-chromosomes in the populations of Europe and the Caucasus, *Eur. J. Hum. Genet.* 2012, 20, 1275–1282.
- Rothschild B. M., Martin L. D., Lev G., Bercovier H., Bargal G. K., Greenblatt C., Donoghue H., Spigelman M., Brittain D., Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present, *Clin Infect Dis.* 2001, 33, 305–311.
- Sand S., *The Invention of the Jewish People*, London, Verso, 2009, s. 332 (ISBN: 9781844674220).
- Sankararaman S., Mallick S., Dannemann M., Prüfer K., Kelso J., Pääbo S., Patterson N., Reich D., The genomic landscape of Neanderthal ancestry in present-day humans, *Nature* 2014, 507, 354–357.
- Sankararaman S., Mallick S., Patterson N., Reich D., The Combined Landscape of Denisovan and Neanderthal Ancestry in Present-Day Humans, *Curr Biol.* 2016, 26, 1241–1247.
- Scozzari R., Massaia A., D'Atanasio E., Myres N. M., Perego U. A., Trombetta B., Cruciani F., Molecular dissection of the basal clades in the human Y chromosome phylogenetic tree, *PLoS One* 2012, 7, e49170.
- Sengupta S., Zhivotovsky L. A., King R., Mehdi S. Q., Edmonds C. A., Chow C. E., Lin A. A., Mitra M., Sil S. K., Ramesh A., Usha Rani M. V., Thakur C. M., Cavalli-Sforza L. L., Majumder P. P., Underhill P. A., Polarity and temporality of high-resolution Y-chromosome distributions in India identify both indigenous and exogenous expansions and reveal minor genetic influence of Central Asian pastoralists, *Am. J. Hum. Genet.* 2006, 78, 202–221.
- Serre D., Langaney A., Chech M., Teschler-Nicola M., Paunovic M., Menecier P., Hofreiter M., Possnert G., Pääbo S., No evidence of Neanderthal mtDNA contribution to early modern humans, *PLoS Biol.* 2004, 2, E57.
- Sikora M., Pitulko V. V., Sousa V. C., Allentoft M. E., Vinner L., Rasmussen S., et al. The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene, *Nature* 2019, 570, 182–188.

- Silva M., Alshamali F., Silva P., Carrilho C., Mandlate F., Jesus Trovoadá M., Černý V., Pereira L., Soares P., 60,000 years of interactions between Central and Eastern Africa documented by major African mitochondrial haplogroup L2, *Sci. Rep.* 2015, 5, 12526.
- Silva N. M., Rio J., Kreutzer S., Papageorgopoulou C., Currat M., Bayesian estimation of partial population continuity using ancient DNA and spatially explicit simulations, *Evol. Appl.* 2018, 11, 1642–1655.
- Simoni L., Calafell F., Pettener D., Bertranpetit J., Barbujani G., Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe, *Am. J. Hum. Genet.* 2000, 66, 262–278. [correction: *Am. J. Hum. Genet.* 2000 Mar, 66, 1185.]
- Simonti C. N., Vernot B., Bastarache L., Bottinger E., Carrell D. S., Chisholm R. L., Crosslin D. R., Hebring S. J., Jarvik G. P., Kullo I. J., Li R., Pathak J., Ritchie M. D., Roden D. M., Verma S. S., Tromp G., Prato J. D., Bush W. S., Akey J. M., Denny J. C., Capra J. A., The phenotypic legacy of admixture between modern humans and Neandertals, *Science* 2016, 351, 737–741.
- Shennan S., Downey S. S., Timpson A., Edinborough K., Colledge S., Kerig T., Manning K., Thomas M. G., Regional population collapse followed initial agriculture booms in mid-Holocene Europe, *Nat. Commun.* 2013, 4, 2486.
- Schibler J., Elsner J., Schlumbaum A., Incorporation of aurochs into a cattle herd in Neolithic Europe: single event or breeding?, *Sci Rep.* 2014, 4, 5798.
- Schlebusch C. M., Malmström H., Günther T., Sjödin P., Coutinho A., Edlund H., Munters A. R., Vicente M., Steyn M., Soodyall H., Lombard M., Jakobsson M., Southern African ancient genomes estimate modern human divergence to 350,000 to 260,000 years ago, *Science* 2017, 358, 652–655.
- Schuenemann V. J., Peltzer A., Welte B., van Pelt W. P., Molak M., Wang C. C., Furtwängler A., Urban C., Reiter E., Nieselt K., Teßmann B., Francken M., Harvati K., Haak W., Schiffels S., Krause J., Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods, *Nat. Commun.* 2017, 8, 15694.
- Schurr T. G., Sukernik R. I., Starikovskaya Y. B., Wallace D. C., Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: population replacement in the Okhotsk Sea-Bering Sea region during the Neolithic, *Am. J. Phys. Anthropol.* 1999, 108, 1–39.
- Schweitzer M. H., Zheng W., Organ C. L., Avci R., Suo Z., Freimark L. M., Lebleu V. S., Duncan M. B., Vander Heiden M. G., Neveu J. M., Lane W. S., Cottrell J. S., Horner J. R., Cantley L. C., Kalluri R., Asara J. M., Biomolecular characterization and protein sequences of the Campanian hadrosaur *B. canadensis*, *Science* 2009, 324, 626–631.
- Smith G. D., Lawlor D. A., Timpson N. J., Baban J., Kiessling M., Day I. N., Ebrahim S., Lactase persistence-related genetic variant: population substructure and health outcomes, *Eur. J. Hum. Genet.* 2009, 17, 357–367.
- Smolenyak M. S., Turner A., *Trace Your Roots with DNA: Using Genetic Tests to Explore Your Family Tree*, Paperback, Rodale Books 2004, 256 (ISBN 1594860068).
- Skoglund P., Malmström H., Omrak A., Raghavan M., Valdiosera C., Günther T., Hall P., Tambets K., Parik J., Sjögren K. G., Apel J., Willerslev E., Storå J., Götherström A., Jakobsson M., Genomic diversity and admixture differs for Stone-Age Scandinavian foragers and farmers, *Science* 2014, 344, 747–750.
- Skoglund P., Thompson J. C., Prendergast M. E., Mitnik A., Sirak K., Hajdinjak M., Salie T., Rohland N., Mallick S., Peltzer A., Heinze A., Olalde I., Ferry M., Harney E., Michel M., Stewardson K., Cerezo-Román J. I., Chiumia C., Crowther A., Gomanichindebvu E., Gidna A. O., Grillo K. M., Helenius I. T., Hellenthal G., Helm R., Horton M., López S., Mab-

- ulla A. Z. P., Parkington J., Shipton C., Thomas M. G., Tibesasa R., Welling M., Hayes V. M., Kennett D. J., Ramesar R., Meyer M., Pääbo S., Patterson N., Morris A. G., Boivin N., Pinhasi R., Krause J., Reich D., Reconstructing Prehistoric African Population Structure, *Cell* 2017, 171, 59–71.
- Shou W. H., Qiao E. F., Wei C. Y., Dong Y. L., Tan S. J., Shi H., Tang W. R., Xiao C. J., Y-chromosome distributions among populations in Northwest China identify significant contribution from Central Asian pastoralists and lesser influence of western Eurasians, *J. Hum. Genet.* 2010, 55, 314–322.
- Soares P., Achilli A., Semino O., Davies W., Macaulay V., Bandelt H.-J., Torroni A., Richards M. B. The archaeogenetics of Europe, *Curr. Biol.* 2010, 20, R174–R183.
- Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M., Rito T., Röhl A., Salas A., Oppenheimer S., Macaulay V., Richards M. B., Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock, *Am. J. Hum. Genet.* 2009, 84, 740–759.
- Soares P., Alshamali F., Pereira J. B., Fernandes V., Silva N. M., Afonso C., Costa M. D., Musilová E., Macaulay V., Richards M. B., Cerný V., Pereira L., The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa, *Mol. Biol. Evol.* 2012, 29, 915–927.
- Sokal R. R., Archaeogenetics: DNA and the Population Prehistory of Europe, *Am. J. Hum. Gen.* 2001, 69, 243–244.
- Starikovskaya E. B., Sukernik R. I., Derbeneva O. A., Volodko N. V., Ruiz-Pesini E., Torroni A., Brown M. D., Lott M. T., Hosseini S. H., Huoponen K., Wallace D. C., Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups, *Ann. Hum. Genet.* 2005, 69, 67–89.
- Sukernik R. I., Shurr T. G., Starikovskaya Y. B., Wallace D. C., Mitochondrial DNA variation in native inhabitants of Siberia, with reconstructions of the evolutionary history of American Indians, Restriction polymorphism. *Genetika* (Russian J. Genetics) 1996, 32, 432–439.
- Svensson E., Götherström A., Temporal fluctuations of Y-chromosomal variation in *Bos taurus*, *Biol. Lett.* 2008, 4, 752–754.
- Sykes B. *The Seven Daughters of Eve*, Bantam Press. London, New York 2001 (ISBN 0393020185).
- Szécsényi-Nagy A., Brandt G., Haak W., Keerl V., Jakucs J., Möller-Rieker S., Köhler K., Mende B. G., Oross K., Marton T., Oszász A., Kiss V., Fecher M., Pálfi G., Molnár E., Sebők K., Czene A., Paluch T., Šlaus M., Novak M., Pećina-Šlaus N., Ósz B., Voicsek V., Somogyi K., Tóth G., Kromer B., Bánffy E., Alt K. W., Tracing the genetic origin of Europe's first farmers reveals insights into their social organization, *Proc. R. Soc. B.* 2015, 282, 20150339.
- Šáliková T., Bezděk A., Březinová H., Farkašová K., Houfková P., Chvojka O., John J., Kmošek J., Koník P., Kovačiková L., Michálek J., Msallamová Š., Novák J., Pavelka J., Šuláková H., Bešta T., Myšková E., Weiter L., Zronek P., Bioarchaeological reconstruction of the funeral rite – case study based on organic material from the Hallstatt Period tumulus at the site Zahradka (South Bohemia, Czech Republic), *Památky Archeologické* 2015, 106, 95–135.
- Tassi F., Ghirotto S., Caramelli D., Barbujani G., Genetic evidence does not support an Etruscan origin in Anatolia, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2013, 152, 11–18.
- Tabbada K. A., Trejaut J., Loo J. H., Chen Y. M., Lin M., Mirazón-Lahr M., Kivisild T., De Ungria M. C., Philippine mitochondrial DNA diversity: a populated viaduct between Taiwan and Indonesia?, *Mol. Biol. Evol.* 2010, 27, 21–31.
- Thangaraj K., Chaubey G., Singh V. K., Vanniarajan A., Thanseem I., Reddy A. G., Singh L., In situ origin of

- deep rooting lineages of mitochondrial Macrohaplogroup ,M' in India, *BMC Genomics* 2006, 7, 151.
- Tixier-Boichard M., Bed'hom B., Rognon X., Chicken domestication: from archeology to genomics, *C. R. Biol.* 2011, 334, 197–204.
- Tishkoff S. A., Gonder M. K., Henn B. M., Mortensen H., Knight A., Gignoux C., Fernandopulle N., Lema G., Nyambo T. B., Ramakrishnan U., Reed F. A., Mountain J. L., History of click-speaking populations of Africa inferred from mtDNA and Y chromosome genetic variation, *Mol. Biol. Evol.* 2007, 24, 2180–2195.
- Tolk H. V., Barac L., Pericic M., Klaric I.M., Janicijevic B., Campbell H., Rudan I., Kivisild T., Villems R., Rudan P., The evidence of mtDNA haplogroup F in a European population and its ethnohistoric implications, *Eur. J. Hum. Genet.* 2001, 9, 717–723.
- Tomczyk J., Jedrychowska-Danska K., Płoszaj T., Witas H. W., Anthropological analysis of the osteological material from an ancient tomb (Early Bronze Age) from the middle Euphrates valley, Terqa (Syria), *Int. J. Osteoarchaeol.* 2011, 21, 435–445.
- Torroni A., Villems R., Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of Northeast Eurasia, *BMC Evol. Biol.* 2013, 13, 127.
- Trombetta B., D'Atanasio E., Massaia A., Ippoliti M., Coppa A., Candilio F., Coia V., Russo G., Dugoujon J. M., Moral P., Akar N., Sellitto D., Valesini G., Novelletto A., Scozzari R., Cruciani F., Phylogeographic Refinement and Large Scale Genotyping of Human Y Chromosome Haplogroup E Provide New Insights into the Dispersal of Early Pastoralists in the African Continent, *Genome Biol. Evol.* 2015, 7, 1940–1950.
- Troy C. S., MacHugh D. E., Bailey J. F., Magee D. A., Loftus R. T., Cunningham P., Chamberlain A. T., Sykes B. C., Bradley D. G., Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle, *Nature* 2001, 410, 1088–1091.
- Bailey J. F., Richards M. B., Macaulay V. A., Colson I. B., James I. T., Bradley D. G., Hedges R. E., Sykes B. C., Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species, *Proc. Biol. Sci.* 1996, 263, 1467–1473.
- Underhill P. A., Passarino G., Lin A. A., Shen P., Mirazón Lahr M., Foley R. A., Oefner P. J., Cavalli-Sforza L. L., The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations, *Ann. Hum. Genet.* 2001, 65, 43–62.
- Vai S., Sarno S., Lari M., Luiselli D., Manzi G., Galinaro M., Mataich S., Hübner A., Modi A., Pilli E., Tafuri M. A., Caramelli D., di Lernia S., Ancestral mitochondrial N lineage from the Neolithic ,green' Sahara, *Sci. Rep.* 2019, 9, 3530.
- Valouev A., Ichikawa J., Tonthat T., Stuart J., Ranade S., Peckham H., Zeng K., Malek J. A., Costa G., McKernan K., Sidow A., Fire A., Johnson S. M., A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning, *Genome Res.* 2008, 18, 1051–1063.
- van Oven M., Kayser M., Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation, *Hum. Mutat.* 2009, 30, E386–E394.
- Vaya I., Gustavsson T., Miannay F.-A., Douki T., Markovitsi D., Fluorescence of Natural DNA: From the Femtosecond to the Nanosecond Time Scales, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 11834–11835.
- Vernot B., Akey J. M. Resurrecting surviving Neandertal lineages from modern human genomes, *Science* 2014, 343, 1017–1021.
- Vernot B., Akey J. M., Complex history of admixture between modern humans and Neandertals, *Am. J. Hum. Genet.* 2015, 96, 448–453.

- Vernesi C., Caramelli D., Dupanloup I., Bertorelle G., Lari M., Cappellini E., Moggi-Cecchi J., Chiarelli B., Castri L., Casoli A., Mallegni F., Lalueza-Fox C., Barbujani G., Etrusci: populačně-genetický studie, *Am. J. Hum. Genet.* 2004, 74, 694–704.
- Volodko N. V., Starikovskaya E. B., Mazunin I. O., Eltsov N. P., Naidenko P. V., Wallace D. C., Sukernik R. I., Mitochondrial genome diversity in arctic Siberians, with particular reference to the evolutionary history of Beringia and Pleistocenic peopling of the Americas, *Am. J. Hum. Genet.* 2008, 82, 1084–1100.
- Voytek B., Bradley D. G., Burger J., Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs, *Proc. Biol. Sci.* 2007, 274, 1377–1385.
- Wang C. C., Reinhold S., Kalmykov A., Wissgott A., Brandt G., Jeong C., Cheronet O., Ferry M., Harney E., Keating D., Mallick S., Rohland N., Stewardson K., Kantorovich A. R., Maslov V. E., Petrenko V. G., Erlikh V. R., Atabiev B. C., Magomedov R. G., Kohl P. L., Alt K. W., Pichler S. L., Gerling C., Meller H., Vardanyan B., Yeganyan L., Rezekin A. D., Mariaschk D., Berezina N., Gresky J., Fuchs K., Knipper C., Schiffels S., Balanovska E., Balanovsky O., Mathieson I., Higham T., Berezin Y. B., Buzhilova A., Trifonov V., Pinhasi R., Belinskij A. B., Reich D., Hansen S., Krause J., Haak W., Ancient human genome-wide data from a 3000-year interval in the Caucasus corresponds with eco-geographic regions, *Nat. Commun.* 2019, 10, 590.
- Wells R. S., Yuldasheva N., Ruzibakiev R., Underhill P. A., Evseeva I., Blue-Smith J., Jin L., Su B., Pitchappan R., Shanmugalakshmi S., Balakrishnan K., Read M., Pearson N. M., Zerjal T., Webster M. T., Zhoshvili I., Jamarjashvili E., Gambarov S., Nikbin B., Dostiev A., Aknazarov O., Zalloua P., Tsoy I., Kitaev M., Mirrakhimov M., Chariev A., Bodmer W. F., The Eurasian heartland: a continental perspective on Y-chromosome diversity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 10244–10249.
- Wells S., *Deep Ancestry: Inside the Genographic Project*, Washington DC: National Geographic Society, Hardcover 2007. (ISBN13: 9780792262152)
- Wen B., Li H., Lu D., Song X., Zhang F., He Y., Li F., Gao Y., Mao X., Zhang L., Qian J., Tan J., Jin J., Huang W., Deka R., Su B., Chakraborty R., Jin L., Genetic evidence supports demic diffusion of Han culture, *Nature* 2004a, 431, 302–305.
- Wen B., Xie X., Gao S., Li H., Shi H., Song X., Qian T., Xiao C., Jin J., Su B., Lu D., Chakraborty R., Jin L., Analyses of genetic structure of Tibeto-Burman populations reveals sex-biased admixture in southern Tibeto-Burmans, *Am. J. Hum. Genet.* 2004b, 74, 856–865.
- Wen B., Li H., Gao S., Mao X., Gao Y., Li F., Zhang F., He Y., Dong Y., Zhang Y., Huang W., Jin J., Xiao C., Lu D., Chakraborty R., Su B., Deka R., Jin L., Genetic structure of Hmong-Mien speaking populations in East Asia as revealed by mtDNA lineages, *Mol. Biol. Evol.* 2005, 22, 725–734.
- Wilde S., Timpson A., Kirsanow K., Kaiser E., Kayser M., Unterländer M., Hollfelder N., Potekhina I. D., Schier W., Thomas M. G., Burger J., Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 y, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 4832–4837.
- Wood E. T., Stover D. A., Ehret C., Destro-Bisol G., Spedini G., McLeod H., Louie L., Bamshad M., Strassmann B. I., Soodyall H., Hammer M. F., Contrasting patterns of Y chromosome and mtDNA variation in Africa: evidence for sex-biased demographic processes, *Eur. J. Hum. Genet.* 2005, 13, 867–876.

- Wutke S., Ludwig A., Targeted PCR Amplification and Multiplex Sequencing of Ancient DNA for SNP Analysis, *Meth. Mol. Biol.* 2019, 1963, 141–147.
- Xue Y., Zerjal T., Bao W., Zhu S., Shu Q., Xu J., Du R., Fu S., Li P., Hurles M. E., Yang H., Tyler-Smith C., Male demography in East Asia: a north-south contrast in human population expansion times, *Genetics* 2006, 172, 2431–2439.
- Yaka R., Birand A., Yılmaz Y., Caner C., Açıkan S. C., Gündüzalp S., Parvizi P., Erim Özdoğan A., Togan İ., Somel M., Archaeogenetics of Late Iron Age Çemialo Sırtı, Batman: Investigating maternal genetic continuity in north Mesopotamia since the Neolithic, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2018, 166, 196–207.
- Yan S., Wang C. C., Li H., Li S. L., Jin L., Genographic Consortium. An updated tree of Y-chromosome Haplogroup O and revised phylogenetic positions of mutations P164 and PK4, *Eur. J. Hum. Genet.* 2011 19, 1013–1015. [Erratum in: *Eur. J. Hum. Genet.* 2011, 19, 1018.]
- Zegura S. L., Karafet T. M., Zhivotovsky L. A., Hammer M. F., High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas, *Mol. Biol. Evol.* 2004, 21, 164–175.
- Zei G., Lisa A., Fiorani O., Magri C., Quintana-Murci L., Semino O., Santachiara-Benerecetti A.S., From surnames to the history of Y chromosomes: the Sardinian population as a paradigm, *Eur. J. Hum. Genet.* 2003, 11, 802–807.
- Zeng T. C., Aw A. J., Feldman M. W., Cultural hitchhiking and competition between patrilineal kin groups explain the post-Neolithic Y-chromosome bottleneck, *Nat. Commun.* 2018, 9, 2077.
- Zheng H. X., Yan S., Qin Z. D., Wang Y., Tan J. Z., Li H., Jin L., Major population expansion of East Asians began before neolithic time: evidence of mtDNA genomes, *PLoS One* 2011, 6, e25835.
- Zhong H., Shi H., Qi X. B., Xiao C. J., Jin L., Ma R. Z., Su B., Global distribution of Y-chromosome haplogroup C reveals the prehistoric migration routes of African exodus and early settlement in East Asia, *J. Hum. Genet.* 2010, 55, 428–435.

5

Databáze a dokumentace

5.1 Databázování v archeologii

Ondřej Kurka

Nedílnou součástí zpracování dat získaných analýzou archeologických vzorků je jejich správné uchovávání umožňující jejich retrospektivní zkoumání, porovnávání jednotlivých vzorků mezi sebou a také aktualizace těchto informací plynoucí z neustále se rozvíjejících metod výzkumu a znalostí vědeckých pracovníků. Vhodný systém uchovávání navíc přináší možnost přiřadit jednomu vzorku informace různého charakteru – v našem případě data získaná archeology (např. určené/předpokládané stáří vzorku, kultura, která předmět vyrobila, fotografie vzorku, různá další archeometrická data), data z chemických analýz (surová data získaná jednotlivými technikami chemické analýzy, identifikované sloučeniny, které mají vztah ke klíčovým typům materiálu vzorku – např. textilie, potraviny, informace o metodách zpracování vzorku) a rovněž data významná pro obě odvětví, tedy archeologii i chemickou analýzu (identifikační znaky – tj. místo nálezu vzorku a s ním spojené souvislosti, informace o již publikovaných studiích relevantních ke vzorku). Pro tento účel je užitečné jednotlivé informace o vzorcích ukládat ve formě databáze.

Databází rozumíme organizovaný soubor strukturovaných informací (laicky řečeno fyzický nebo virtuální prostor), ve kterém se vyskytují veškerá data (informace) týkající se klíčových objektů (v našem případě tedy vzorků, přičemž platí, že jeden objekt může být zdrojem pro více vzorků). Jednotlivá data (druhy informace) náleží vždy ke konkrétnímu záznamu (označovanému jako „entita“) – tím je zároveň určen i jejich vzájemný vztah. Historicky se systém databází vyvíjel

od původních čistě analogových systémů (kartotékové systémy) do současné digitální podoby. Přitom jednotlivými vývojovými stupni byly databáze *hierarchické* (s daty uspořádanými ve „stromové“ struktuře – např. uložení knih v jednotlivých místnostech/skříních/policích), následně *síťové* (každý prvek může a nemusí být vázán na libovolný jiný prvek – čímž vznikají charakteristické kombinace prvků – např. v databázi automobilů, kde jsou pomocí prvků vybavení definovány jednotlivé modely) a konečně pak *relační* (v současnosti nejvyužívanější systém, realizovaný tabulkami, viz další kapitola). Následující kapitoly popisují možnosti tvorby databází, rozdílů v možných přístupech obecně, podrobněji pak s důrazem na současný stav v kombinovaném výzkumu (archeologickém a přírodovědném). Jako příklad umožňující lepší vhled do problematiky potom slouží příklad databáze kombinující archeologická data s daty z chemické analýzy nálezů – ANARBASE (kach-database.upol.cz/anarbase/).

5.1.1 Relací databáze

Základní stavební jednotkou relační databáze je jedna *relace* – dvourozměrná tabulka. V té řádce odpovídají *entitám* (vzorkům) a sloupce pak vyjadřují *atributy* těchto entit (zjištěné informace o vzorku). Atribut se skládá z *názvu* a z *domény*, kterou rozumíme přípustný rozsah hodnot pro daný atribut (např. *název* = „místo nálezu“ a *doména* = „textová hodnota v rozsahu 100 znaků“). Databáze se zpravidla skládá z více *relací* (tabulek).³⁷ **Každý záznam je definován svým *primárním klíčem*.** Jedná se o hodnotu, která musí být v rámci relace unikátní a která identifikuje daný záznam. Zpravidla se jedná o jeden atribut (ID, rodné číslo, číslo archeologického nálezu a další), avšak primárním klíčem může být i kombinace několika atributů, z nichž však všechny musí být vždy přítomné, aby mohlo dojít k jednoznačné identifikaci záznamu. Důležitým prvkem relačních databází je *referenční integrita*. Slouží k udržení vztahu mezi podřízenou a nadřízenou tabulkou. Pomocí atributu označeného jako tzv. *cizí klíč* je možno regulovat akce v jednotlivých tabulkách. Příkladem může být seznam zaměstnanců a seznam oddělení ve firmě. Pokud jsou oba seznamy vhodně propojeny (primární klíč pracoviště je vložen jako cizí klíč do záznamu zaměstnance), je možné např. kontrolovat, že každý zaměstnanec má při vložení svého záznamu vyplněno existující oddělení. Cizí klíče pak chápeme jako atributy, které slouží jako odkazy na další tabulky a nesou tak informaci o vztazích záznamů v těchto tabulkách mezi sebou. V archeologické oblasti by např. bylo možné vytvořit tabulku jednotlivých kultur, která by obsahovala informace o těchto kulturách – např. jejich časové rozpětí,

³⁷ Zde v rámci problematiky tvorby databáze dochází k jisté významové mnohoznačnosti samotného slova „relace“. V závislosti na kontextu se totiž může jednat jak o jednu tabulku databáze, tak i o vztah mezi více entitami (Otte, 2012).

a pokud by tyto kultury tvořily cizí klíč v databázi nálezů, bylo by možné propojovat informace o nálezu s informacemi o příslušné kultuře. Zároveň by bylo vyloučeno nezařadit nález ke kultuře, nebo vybrat jinou než kulturu existující v tabulce kultur. S tímto v problematice relačních databází souvisí pojem *parcialita*. Ta udává, zda je nutné, aby daný záznam odpovídal alespoň jednomu záznamu v jiné tabulce (jednostranná parcialita), příp. není nutné, aby záznam odpovídal nějakému záznamu v jiné tabulce (oboustranná parcialita). Příkladem může být tabulka autorů, kteří vkládají informace o archeologických nálezech v jiné tabulce: je nutné, aby každý záznam o nálezu měl autora, ne však, aby každý autor vložil alespoň jeden záznam (jednostranná parcialita).

Samotná databáze je pouze souborem dat s vyznačením jejich vzájemných vztahů. Pro práci s daty je však nutné využít vhodné **softwarové řešení** – rozhraní mezi aplikačními programy a uloženými daty. Takový software se označuje jako *systém řízení báze dat* (SRBD; z angl. *database management system*, DBMS). Tyto systémy musí být schopny jednak pracovat s uloženými daty a také nová data vkládat, případně upravovat stará data a mazat je z databáze. Příkladem těchto systémů mohou být MySQL (www.mysql.com) nebo Microsoft Access. **Jako databázový systém pak označujeme spojení samotné databáze a zvoleného systému řízení báze dat.** Důležitým paradigmatem je, že existence dat v databázi (a příslušných vztahů mezi nimi) je nezávislá na aplikačních programech (Hronek, 2007).

5.1.2 Nástroje pro tvorbu databáze

Klíčovým rozhodnutím při tvorbě databáze je volba vhodného softwaru a rozhraní, přes které budou uživatelé k datům přistupovat. V případě námi konstruované databáze spojující archeologická a chemická data byla základním požadavkem snadná dostupnost databáze pro více uživatelů z několika různých míst. Rozhodli jsme se proto využít variantu online databáze. V principu je možné pro stejný účel využít i samotný databázový systém – tj. umožnit uživatelům komunikaci přímo s databázovým rozhraním (např. pomocí příkazového řádku). Přímé používání databázového systému však vyžaduje znalost jednotlivých příkazů (např. pro výpis, přidávání či seřazování hledaných údajů). Rovněž grafické znázornění dat je v takovém uspořádání značně omezené. Pro běžné uživatele je proto jednodušším řešením automaticky generovat tyto příkazy na základě uživatelských akcí v předem navrženém rozhraní (výběr předvolených možností, kliknutí na tlačítko apod.).

Jako obslužné rozhraní v našem případě (tj. pro databázi ANARBASE) slouží webové stránky napsané s využitím kombinace tří jazyků/systémů:

- ⇒ HTML zajišťuje vzhled stránek,
- ⇒ PHP interpretuje uživatelské akce ve formě dotazů pro databázový systém,
- ⇒ MySQL vystupuje jako databázový systém, který jednotlivé příkazy zpracovává a vyhledává v tabulkách data, o která má uživatel zájem.

5.1.2.1 HTML

HTML (HyperText Markup Language) je tzv. značkovacím (markup) jazykem umožňujícím zobrazovat dokument rozdělený na části, které lze zvlášť formátovat pomocí tzv. značek („tagů“). Kromě základních textových úprav (velikost, styl a řez písma) umožňuje HTML nastavit také barvy a/nebo textury jednotlivých částí dokumentu, dokáže tvořit tabulky a také jednoduché formuláře, pomocí kterých může uživatel posílat stránce informace, které jsou dále zpracovány (textová pole, zaškrťovací políčka, výběry, roletky apod.). Např. při vkládání informací o záznamu může vkladatel vyplnit v textovém poli místo nálezu vzorku a poté z roletky vybrat, zda je záznam původním vzorkem, nebo existuje ve formě literární citace. Charakteristickým rysem HTML jazyka je existence odkazů, které přesměrovávají uživatele na jiné stránky a zajišťují provázanost jednotlivých dokumentů (Písek, 2007). Tvorba HTML dokumentů (**obrázek 5-1**) může probíhat v zásadě dvěma způsoby. Prvním je klasická textová forma, kdy tvůrce dokumentů ručně zadává jak obsah dokumentu, tak jeho formu – ručně tedy „píše“ i značky. Druhou možností jsou tzv. WYSIWYG editory (z angl. „What You See Is What You Get“), kde uživatel formátuje stránku pomocí grafického rozhraní (podobně jako např. při úpravě dokumentů v programu MS Word) tak, aby odpovídala jeho požadavkům. Při uložení takové stránky pak editor vygeneruje HTML dokument včetně značek, které uživatel nemusí ovládat (Písek, 2007).

Hotová HTML stránka se poté publikuje na serveru, kde si ji (po získání odkazu) mohou uživatelé prohlédnout/interagovat s ní. Obecným úskalím vykreslení celého HTML dokumentu je v tomto ohledu tzv. *parsování* – zpracování HTML kódu webovým prohlížečem (např. MS Edge, Mozilla Firefox nebo Google Chrome). Zejména v počátcích rozvoje HTML jazyka a jednotlivých prohlížečů se mohly vyskytnout chyby spjaté s různou interpretací HTML kódu v různých prohlížečích („ignorování“ konkrétních značek nebo odlišný způsob jejich vykreslení). Díky snaze tvůrců jednotlivých prohlížečů je v současné době nekompatibilita minoritním jevem, přesto však stále existuje několik oblastí designu HTML kódu, které jsou náchylné na zobrazení různými prohlížeči. Obecným doporučením pro HTML vývojáře je tedy testovat vytvořené stránky (dokumenty) ve více prohlížečích.

```

1 <!DOCTYPE html>
2 <html>
3 <head>
4 <title>Database system for Department of Analytical Chemistry, UP</title>
5 <meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=windows-1250">
6 <link rel="stylesheet" type="text/css" href="styl.css" />
7 <link rel="shortcut icon" href="favicon.ico">
8 </head>
9 <body>
10 <a href="/index.html"></a>
11 <div class="obsah">
12 <ul>
13 <br>
14 <p><form action="/index.php" method="get"><input type="submit" class="tlacitko" value="Home"></form></p>
15 <p><form action="/db/index.php" method="get"><input type="submit" class="tlacitko" value="View the database"></form></p>
16 <p><form action="/documents.php" method="get"><input type="submit" class="tlacitko" value="Documents"></form></p>
17 <p><form action="/publications.php" method="get"><input type="submit" class="tlacitko" value="Publications"></form></p>
18 </ul>
19 </div>
20 <div class="telo"><h2>Welcome to our database! </h2>
21 The Analytical-Archaeological database (ANARBASE) was created to combine chemical and archaeological knowledge. Each analysed sample (content of
ceramic vessel, wall painting, amber artefact, etc.) contains information about its chemical composition. In some cases the most significant markers found by
advanced statistical data treatment (principal component analysis - PCA, and orthogonal projection to latent structure - OPLS-DA) and archaeological
information including historical context, time period and culture are added as well. Combination of such information in one integrated database is an
excellent tool for further research and can help to understand the economic and social situation of the past.</br></br>
22 In the panel "Documents" you can find many interesting materials including manuals for appropriate sampling of archaeological contexts and amber
artefacts. The articles published by our team dealing with archaeological samples are listed in the panel "Publications".</br></br>
23 If you have any questions, please contact us on this email address: <a href="mailto:lukas.kucera@upol.cz">lukas.kucera@upol.cz</a></div>
24 </body>
25 </html>

```

Obrázek 5-1 Zdrojový kód HTML

5.1.2.2 PHP

PHP (název je rekurzivní zkratkou „PHP: Hypertext Preprocessor“) je programovací jazyk vhodný pro skriptování (tvorbu jednoduchých automatizovaných úloh). **Jedná se o interpretovaný programovací jazyk – vytvořené programy/skripty není nutné před spuštěním kompilovat („překládat“),** jako je tomu u *kompilovaných* jazyků (např. C++ nebo Pascal). Pro funkčnost skriptů je však potřeba spustit příslušnou službu na straně serveru. Uživatel pak svoje požadavky posílá na server, který zpracovává instrukce a uživateli posílá zpět pouze výsledky operací. Výhodou je snadné propojení s HTML kódem, a tedy možnost provozovat rozhraní pro zadávání vstupních dat v okně internetového prohlížeče. PHP vzniklo jako *imperativní* programovací jazyk (programování se skládá z jednotlivých příkazů, kterým program určuje, *jak* se bude úloha řešit), v souvislosti s rozvojem *objektově orientovaného* programování (program určuje, *co* se má stát, jednotlivé procedury jsou součástí datových typů) byly i do PHP postupně přidány prvky umožňující využít objektově orientované programování.

Cílem práce s PHP je generování dynamického HTML obsahu pro uživatele na základě akcí, které uživatel na stránce provádí. K tomuto účelu PHP sbírá a vyhodnocuje data, která mu uživatel předá (kliknutím na odkaz/tlačítko, vyplněním textového pole či výběrem možnosti z roletky). Tato data následně předává databázovému systému ve formě hotových příkazů a poté, co obdrží od databázového systému požadovaný výstup, jej znovu převede do uživatelsky

příjemné formy a zobrazí na stránce. Při svém chodu využívá (stejně jako další programovací jazyky) zejména systém cyklů a podmínek, ve kterých zpracovává uživatelem definované proměnné, které určují chování skriptu (pro příklad skriptu viz **obrázek 5-2**).

```
167 function VypisModu($anarbase,$styl,$barva) {
168     if ($anarbase['ionization']=='pos') $mod='(';
169     elseif ($anarbase['ionization']=='neg') $mod='(';
170     else $mod='none';
171     echo '<td class="'. $styl. $barva. "'>'. $mod. '</td>';
172 };
173
174 function VypisPolozky($polozky,$styl,$colspan='1') {
175     foreach ($polozky as $value) {
176         echo '<td colspan="'. $colspan. "' class='". $styl. "'><b>'. $value. '</b></td>';
177     };
178 };
179
180 function VyberAutora($link) {
181     echo '<td class="jedna"><select name="author">
182         <option value=""--any author--';
183     $querynaautora=(mysqli_query($link,"SELECT `id`, `jmeno` FROM `workers`"));
184     while ($autor = mysqli_fetch_array($querynaautora)) {
185         echo '<option value="'. $autor['id']. "'';
186         if ($autor['id']!= $_POST['author']) echo '>'. $autor['jmeno']. '</option>';
187         else echo 'selected >'. $autor['jmeno']. '</option>';
188     };
189     echo '</select>';
190 };
```

Obrázek 5-2 Zdrojový kód PHP

5.1.2.3 MySQL

Relační databázový systém MySQL je naprogramován v jazyce C++. Jedná se o systém vycházející z „SQL“ jazyků (z angl. „Structured Query Language“= „strukturovaný dotazovací jazyk“). Uživatelé systému zadávají požadavky („dotazy“/ „queries“) zahrnující klíčová slova typu „vyber“, „seřad“, „vytvor“, „vloz“, „odstran“ apod. Tyto požadavky jsou zpracovány systémem, který pak vrací příslušný výstup. Přestože v principu je možné jednotlivé příkazy psát pomocí textové řádky a rovněž výstupy získávat v čistě textové podobě, v praxi se nejčastěji s MySQL pracuje pomocí tzv. GUI (z angl. „Graphical User Interface“ – grafické uživatelské rozhraní), jako jsou např. phpMyAdmin a Adminer, nebo přímo ve spojení s nějakým programovacím jazykem.

Mimo výše zmíněné „základní“ operace se záznamy dokáže MySQL (stejně jako většina rozšířenějších SŘBD) provádět také složitější operace, které mají význam

u rozsáhlejších databází – např. *transakce* (sady příkazů, které musí proběhnout uceleně), *triggery* (automaticky spouštěné akce při vybraných operacích s tabulkami), *podpora různých jazykových sad* (a jazykových pravidel v nich zavedených), *poddotazy* (vnořené dotazy) nebo *pohledy*, tedy možnost definovaného zobrazení dat využívaného ve specifických případech (Schwartz a kol., 2012; Nixon, 2015).

5.1.3 Struktura databáze

Při výstavbě databáze a jejího obslužného softwaru je třeba vycházet z praktických potřeb: jednotlivé vzorky musí být do databáze vloženy, zkontrolována jejich správnost a musí existovat také rozhraní pro procházení jednotlivých záznamů a vyhledávání v nich. Tyto tři základní součásti tvoří rovněž kostru databáze ANARBASE. Významná je i kvalita zabezpečení databáze, která bude popsána níže.

5.1.3.1 Zabezpečení přístupu

Jednotlivé zmíněné součásti databáze obvykle vyžadují jistá omezení přístupu. Je užitečné, aby zabezpečení bylo řešeno jako víceúrovňové. Omezené množství informací může být například přístupné širšímu okruhu zájemců, případně veřejnosti, a větší množství (včetně odbornějších informací, případně dat pro prohlížení ve speciálních softwarech) potom užšímu kruhu odborníků obvykle tvořících společný výzkumný tým. Důležité je zabezpečení vkládání a kontroly záznamů. Patřičná oprávnění by měla být vyhrazena pověřeným uživatelům. Z tohoto důvodu bývá část databáze chráněna bezpečnostními prvky omezujícími vstup uživatelů. V jednoduchých verzích databáze k tomuto účelu může sloužit zabezpečení pomocí tzv. „htaccess password protection“. Tento jednoduchý systém využívá dva soubory v adresářích, které chceme ochránit. Při vstupu do takového adresáře je nutné v prohlížeči vložit uživatelské jméno a heslo, které uživatele pustí do adresáře a umožní mu provádět v něm další práci. Výhodou tohoto systému je jeho jednoduchost a relativně vysoká systémová bezpečnost (<https://www.jakpsatweb.cz/heslo.html>). Nevýhodou je poměrně složitější konfigurace serveru (zejména v případě, kdy je potřeba jednotlivé uživatele oddělit) a také nepružnost – např. v případě, že si uživatel chce změnit heslo, případně je potřeba založit nový uživatelský účet.

Elegantnějším přístupem (a současným řešením zabezpečení ANARBASE) je zavedení jednotlivých uživatelských účtů platných pro celou databázi (resp. její webové rozhraní). V tomto módu je vytvořen každému uživateli účet s identifikujícími znaky – těmi jsou zejména uživatelské jméno a heslo, dále pak volitelné atributy (např. úroveň zabezpečení, která je uživateli dostupná). Uživatel se poté

přihlašuje v rámci celého webu jednou a v rámci návštěvy zůstává v jeho prohlížeči uložena informace o jeho identitě. Pokud uživatel (např. kliknutím na patřičný odkaz) požádá o přístup k citlivým datům, systém má ihned k dispozici informaci o tom, zda se jedná o přihlášeného uživatele, a případně, zda má tento uživatel povolen přístup k dotazovaným informacím. Pokud jsou splněny všechny podmínky, uživateli je umožněn přístup do patřičné sekce databáze/webu.

5.1.3.2 Zabezpečení souborových dat

Nedílnou součástí databáze jsou přiložené soubory – jedná se zpravidla o fotografický a další obrazový materiál související se vzorky, a dále pak o surová či zpracovaná data získaná instrumentálními technikami při analýzách vzorků. **Všechna tato data musí být uložena na místě dostupném uživatelům, zároveň je však potřeba zabránit přístupu (a stažení/zkopírování nebo modifikaci citlivých dat) neautorizovaným uživatelům.** Základní možností je uložit data do vyhrazené složky na serveru a odkazovat na ně. V takovém případě jsou však data dostupná všem uživatelům, kteří znají (či „uhodnou“) název souboru. Pravděpodobnost neoprávněného přístupu stoupá s tím, jak přibývá v databázi dat a je nutné pojmenovávat je určitým klíčem, který usnadňuje systémovou práci s těmito soubory (jejich ukládání na server a odkazování na ně v případě požadavku uživatele) a brání např. duplicitě názvů. Rovněž je vhodné zakázat/znemožnit procházení adresářů (tzv. „open directories“, **obrázek 5-3**) vzhledem k tomu, že se jedná o kritickou chybu zabezpečení, která umožňuje anonymním uživatelům z takových adresářů stahovat data.






















Pokročilejší možností poskytující jistou úroveň zabezpečení je stahování pomocí skriptu, který sám přistupuje k souboru a zároveň může ověřovat identitu uživatele. Stále však není řešena situace, kdy uživatel na soubor „narazí“, protože samotný soubor není ošetřen proti zkopírování, pokud je známa jeho přesná URL adresa.

Současné řešení zabezpečení citlivých souborů v databázi ANARBASE využívá předchozí variantu (stahování pomocí skriptu) spolu s trikem spočívajícím v tom, že pomocí příkazu v souboru .htaccess lze zakázat přístup do složky, a zároveň že PHP tento zákaz může na vlastním serveru porušit (a tedy do takto zablokované složky vstoupit a pracovat s jejími daty). K souborům se tak přistupuje výhradně zpracováním pomocí skriptu. Tím pádem uživatel nemůže soubor stáhnout klasickou cestou ani tehdy, pokud zjistí jeho přesnou adresu – do příslušné složky jej systém jednoduše nepustí. Samotné ověření identity uživatele může být realizováno kontrolou „session“ (tzn. ověřením, že uživatel pracuje v autorizovaném módu), ve které může být uvedena i informace o tom, zda má mít uživatel k datům přístup. Dodatečným zabezpečením je pak možnost generování unikátního odka-

zu pro stažení souboru (tzv. „salt-hash“), která zajišťuje, že stažení funguje pouze pro konkrétní instanci prohlížení uživatele. Tento přístup zároveň znemožňuje uživateli, aby poslal odkaz na stažení jiným uživatelům. Nebrání samozřejmě uživateli v poslání samotného souboru, proměnlivé odkazy nicméně dále snižují bezpečnostní riziko nechtěného úniku informací.

5.1.3.3 Vkládání nových záznamů

Obecně se vložení záznamu do MySQL databáze provádí pomocí příkazu „INSERT“ s uvedením výčtu atributů a jejich hodnot. Toto vložení může být provedeno přes příkazový řádek (nejjednodušší možnost), případně s pomocí obslužného programu (např. phpMyAdmin (www.phpmyadmin.net), nebo Adminer (www.adminer.org)), který uživatelovy akce překládá do příslušných příkazů. V případě databází integrujících data z různých oblastí je potřeba systém vkládání

Index of /anarbase			
	<u>Name</u>	<u>Last modified</u>	<u>Size</u> <u>Description</u>
	Parent Directory	-	-
	Documentation-old.pdf	2016-01-14 15:46	78K
	Documentation.docx	2017-10-24 13:48	19K
	Documentation.pdf	2017-10-26 13:37	272K
	Dokumentace-old.pdf	2016-01-14 15:47	78K
	Dokumentace.docx	2017-10-24 13:47	17K
	Dokumentace.pdf	2017-10-26 13:37	280K
	Sampling-amber.mp4	2017-01-04 09:58	12M
	Sampling-amber.pdf	2016-05-02 16:41	481K
	Sampling.docx	2017-12-18 14:57	2.2M
	Sampling.pdf	2017-12-18 14:57	771K
	Vzorkovani.pdf	2016-02-29 13:15	450K
	banner.png	2016-02-29 13:15	106K
	documents.php	2019-05-24 13:43	701
	error.php	2015-11-30 14:58	1.3K
	favicon.ico	2011-07-20 15:10	5.6K
	hlavicka.html	2020-01-22 15:23	932
	index2.php	2019-05-24 13:44	1.2K
	mmass_v5.5.0_msw.zip	2017-04-27 14:28	17M
	publications.php	2019-05-24 13:42	2.3K
	styl.css	2020-02-03 15:27	952

Obrázek 5-3 Příklad tzv. „open directory“

nastavit tak, aby byl uživatelsky dobře a s minimálním rizikem chyby obsluhovatelný přispěvateli s různým zaměřením. V případě ANARBASE je vložení nového záznamu (vzorku) do databáze realizováno pomocí HTML formuláře, který uživatel naplní daty a vloží do něj soubory, které si přeje k záznamu přiřadit. Jak bylo zmíněno dříve, každý záznam v databázi ANARBASE obsahuje identifikátory užitečné (zejména) pro archeology i pole, která jsou důležitá pro analytické chemiky. Užitečným prvkem je v tomto ohledu zavedení „povinných“ polí, která musí být vyplněna, jinak není záznam do databáze přijat. Součástí přijetí záznamu do databáze je automaticky také přiřazení autora k záznamu. To umožňuje jednak kontaktovat jej v případě, že je potřeba zjistit další informace o vzorku, zároveň pak může tímto parametrem být ovlivňováno další nakládání se vzorkem – prakticky se může jednat zejména o možnost úpravy (editace) záznamu, která může být záměrně vázána pouze na původního vkladatele, možné je také např. upravit databázi tak, aby zobrazovala pouze záznamy vložené konkrétními uživateli – např. s ohledem na jednotlivá pracoviště apod.

Systém vkládání se komplikuje v situaci, kdy jsou do databáze vkládána data z měření sofistikovanými technikami pracujícími v řadě režimů, které je potřeba od sebe oddělit. Situaci je možno demonstrovat například na datech získaných při měření hmotnostní spektrometrií. Jeden vzorek může být hmotnostně-spektrometrickými metodami měřen s využitím několika iontových zdrojů (např. elektrosprej, laserová desorpce-ionizace, přímá sonda apod.), v kladném i záporném ionizačním módu, může být využito měření s iontovou mobilitou, s předřazenou separační technikou a podobně (detaily jsou popsány v kapitolách zaměřených na hmotnostní spektrometrii). Data získaná v těchto režimech se od sebe často značně liší, a proto musí být možné dohledávat informace separátně pro každý režim zvlášť.

V případě ANARBASE obsahuje vkladací formulář (**obrázek 5-4**) například příslušná pole pro kladný i záporný ionizační mód a pokud jsou zadána data pro oba módy, je vzorek uložen pro účely vyhledávání zvlášť v kladném i v záporném módu (pokaždé s jinými primárními daty). Zároveň však platí, že např. identifikátory, fotky nebo citace jsou pro jeden vzorek (kterému odpovídají dva záznamy) shodné. Aby nedocházelo ke zbytečnému duplikování souborů v databázi, je systém vkládání upraven tak, že pro záznam v obou módech je na duplicitní data odkazováno a fyzicky každý soubor existuje pouze v jedné kopii. Např. pro dva záznamy, které sdílejí společnou fotografii (jedná se o stejný objekt měřený ve dvou režimech), je fotografie na server zkopírována pouze jednou a u obou záznamů je v příslušném atributu (sloupci tabulky) uveden odkaz na patřičný soubor. Tento systém je úspornější z hlediska potřebného místa na disku a zohledňuje to, že pokud bude soubor změněn pro jeden ze záznamů, automaticky se změna

projev i u druhého (svázaného) záznamu. Tato vlastnost může být v závislosti na okolnostech vnímána jak jako výhoda (pro úpravy není nutné dohledávat druhý z dvojice záznamů), tak nevýhoda (bez zásahu ve vnitřní části databáze není možné vložit odlišné informace pro oba dotčené záznamy).

Obrázek 5-4 Náhled formuláře pro vložení vzorku v systému ANARBASE

Pro zajištění toho, že data budou do ANARBASE vkládat pouze autorizovaní uživatelé, je odkaz na vložení nového záznamu umístěn přímo v uživatelském menu ANARBASE (**obrázek 5-5**, tlačítko „Input new record“). Tím je mimo jiné zabezpečeno výše zmíněné svázání vkládaného záznamu s uživatelským účtem.

V případě, že vkládání dat do databáze není omezeno (tzn. data může vkládat libovolný uživatel), může být žádoucí vstupy kontrolovat před jejich vložení do databáze. Pověřená osoba pak může zkontrolovat, zda data na první pohled nevykazují nějaké nedostatky a zda jsou zadány všechny potřebné informace (např. pokud toto není ošetřeno přímo v rámci vkládacího formuláře). Tento krok však vyžaduje pružnou odezvu ze strany administrátora (aby byla data co nejdříve dostupná v databázi). Dřívější varianta ANARBASE zahrnovala také mezikrok „schvalování“ vložení záznamu do databáze. Po vložení se záznam nacházel v dočasné „frontě“, ve které jej musel kontrolovat pověřený uživatel databáze (disponující přístupem do schvalovací sekce). Tento způsob vkládání záznamů byl realizován v souvislosti s jednou z prvních verzí databáze, kdy mohl záznam do databáze vložit libovolný (tj. neregistrovaný) uživatel. V současnosti je však vkládání záznamů vázáno na registrované uživatele, rekrutující se zpravidla z odborné oblasti. Vzhledem k tomu, že tato část databáze vyžaduje údržbu a aktualizace při změnách struktury samotné databáze (typu sbíraných dat), a k faktu, že záznamy lze částečně upravovat (a zbavit se tedy chyb vzniklých z nepozornosti),

byla tato část administrace databáze v pozdějších verzích odstraněna jako zbytečná (toto je však subjektivní zkušenost s provozováním ANARBASE).

5.1.3.4 Prohlížení databáze a vyhledávání

Hlavním požadavkem na databázi z pohledu řadového uživatele je možnost snadno vyhledávat data, a potažmo vztahy mezi jednotlivými záznamy, a výsledky vyhledávání přehledným způsobem vizualizovat. S ohledem na dvourozměrný charakter ukládaných dat (tj. řada unikátních záznamů s odpovídajícími charakteristikami) je ideálním způsobem vizualizace dat tabulka. Podle složitosti systému a množství dat odpovídajících jednotlivým záznamům mohou být jednotlivé tematické celky např. odděleny formou záložek (nebo alespoň graficky). Rovněž vyhledávání může být buď přímo součástí zobrazovacího rozhraní, nebo může být vyhledávací formulář umístěn samostatně (odděleně). Konkrétní řešení je v tomto ohledu zpravidla realizováno již spíše s ohledem na plánovanou estetickou (vizuální) stránku konkrétní databáze. Přesto je však výhodou, pokud je možno uchovat filtrovací parametry a s ohledem na získané výsledky umožnit uživateli dále tyto parametry měnit při současném náhledu na získané výstupy. Dalším prvkem, který usnadňuje uživateli orientaci, je dostupnost více služeb na jedné stránce.

V současné verzi ANARBASE je na základě výše uvedeného zjednodušeno základní uživatelské rozhraní natolik, že prohlížeč stránka funguje zároveň i jako stránka, kde se uživatel může přihlásit do soukromé (zabezpečené) části databáze a ve které se nachází odkaz na sekci určenou pro vkládání nových záznamů (**obrázek 5-5**). Na úvodní straně databáze se nachází také odkaz na manuál, kde jsou uvedeny užitečné tipy pro práci s databází. Zobrazení s nulovým výpisem (nejsou tedy zobrazeny žádné záznamy) napomáhá k rychlejšímu načítání stránky a uživatel má k dispozici pouze jednotlivé vyhledávací prvky – převážně textová pole a roletky s výběrem – realizované ve formě záhlaví tabulky. Pro pohodlí uživatele obsahuje databáze standardně ještě tři prohlížečské prvky: možnost smazat všechny filtry současně (de facto resetovat zobrazení databáze), možnost zobrazit najednou všechny záznamy a možnost zobrazit najednou pouze záznamy, které vložil on sám.

Kombinací jednotlivých parametrů vyhledávání dosáhneme zefektivnění práce s databází. Uživatel může např. zobrazit všechny záznamy konkrétní archeologicky definované kultury, které zároveň obsahují fotografii a byly měřeny pomocí GC/MS. Jakmile nastaví požadované parametry, stiskne tlačítko „Search“ a systém vypíše na jednotlivé řádky všechny záznamy odpovídající kombinaci zadaných parametrů. Vyhledávání pomocí textových polí funguje v tzv. „fulltextovém“ módu, tzn. např. dotaz na „Context“ ve tvaru „Prostějov“ vyhledá všechny záznamy,

ve kterých se v příslušném atributu vyskytuje tento řetězec (např. tedy jak „Prostějov Mubea“, tak „Brodek u Prostějova“). Pokud některé z vyhledávacích polí není vyplněno, filtr se na něj neaplikuje – s ohledem na takové pole „propouští“ všechny záznamy. Pokud tedy provedeme hledání např. se zadáním konkrétních údajů pro „místo nálezů“ a „kulturu“ a následně se zadáním údaje pouze pro „kulturu“, přičemž pole „místo nálezů“ ponecháme prázdné, druhé hledání poskytne více výsledků – není omezeno místem kultury a zahrnuje výsledky s libovolnou (i prázdnou) hodnotou v poli „místo nálezů“. Jedním z klíčových polí specializovanější databáze zahrnující analytická data (např. z hmotnostní spektrometrie) je seznam chemických markerů. Jedná se o hodnoty m/z (bližší vysvětlení v kapitolách o hmotnostní spektrometrii), které byly pro vzorek vyhodnoceny jako charakteristické. V závislosti na dalších provedených analýzách mohou přímo informovat o tom, jaký druh materiálu (např. mléko či rostlinný olej) byl ve vzorku (např. nalezené starověké nádobě) přítomen. I pokud tato informace (tj. vztah chemického otisku a povahy materiálu) chybí, je přítomnost markeru důležitá v tom, že nám pomáhá nalézat společné chemické motivy v jednotlivých vzorcích. Pokud je s určitým typem vzorků svázán některý chemický marker (nebo více markerů), pak lze na základě jeho přítomnosti ve vzorcích dalších předpokládat jejich materiálový charakter a měření cíleně doplnit dalšími experimenty, které tento předpoklad dále potvrdí (například cílené imunochemické testy provedené po hmotnostně spektrometrickém screeningu, viz publikace Kučery a kol. (2018) a **tabulka 5-1**).

The screenshot shows the web interface of the Analytical-Archaeological Database - ANARBASE. The browser address bar shows the URL: kach-database.upol.cz/anarbase/db/index.php. The page title is "Analytical-Archaeological Database - ANARBASE" and the subtitle is "(Database of archaeological samples of the Department of Analytical Chemistry, UP)". Below this, it says "Full version". There is a login section with the text "You are logged in as Ondřej Kurka." and buttons for "Input new record", "Change Password", and "Log out". Below the login section, there is a link to an instruction manual for the database use in .pdf format, which can be downloaded in English and Czech. There is also a color coding section with the text "Color coding: original samples / article citations". At the bottom, there are three buttons: "Back to home page", "Erase all filters (and hide all records)", and "Show all records (might take a while)". Below these buttons is a table with the following structure:

Sample description					
Search	Context	Feature no.	Deposit no.	Further specification	Sample type
Search					

Obrázek 5-5 Výchozí zobrazení vyhledávací části ANARBASE

Vzhledem k tomu, že markerů je typicky při analýze získáno mnoho (jejich počty se pohybují zpravidla v desítkách až stovkách), není standardně vypisován v databázi jejich kompletní seznam. Namísto toho je možné jej stáhnout jako textový soubor. V rámci vyhledávacích textových polí však pro markery funguje také fulltextové vyhledávání – pro pohodlí uživatele jsou pak v tabulkovém výpisu zobrazeny pouze markery, které odpovídají vyhledávanému řetězci (**obrázek 5-6**). Vhodnou volbou syntaxe při vkládání nových záznamů je možné odlišovat markery odpovídající nejen charakteristickým hodnotám m/z , ale např. i charakteristickému retenčnímu času (kombinace MS s vhodnou separační technikou), příp. driftovému času (kombinace MS experimentu s měřením iontovou mobilitou). Užitečnou možností je v takovém případě odlišování typu markeru odpovídající předponou/příponou v okolí číselné hodnoty (např. „mz123.45“ pro marker s hodnotou m/z rovnou 123.45, nebo „rt15.27“ pro marker s hodnotou retenčního času rovnou 15.27 min.).

Tabulka 5-1 Detekce mléčných proteinů ve zkoumaných nádobách pomocí imunochemických metod (Kučera a kol., 2018)

	kasein [ppm]	vyhodnocení	hovězí β -LG [ppm]	vyhodnocení
pozitivní kontrolní vzorek	0,02	–	1,32	–
negativní kontrolní vzorek	0,2 *	+	0,0021**	+
nádoba č. 4	0,36	+	1,81	–
nádoba č. 5	0,52	+	0,044	+

+: pozitivní, –: negativní, *: standard o koncentraci 0,5 mg/kg, **: 10 mg/kg β -LG

Z chemického hlediska je samozřejmě užitečné porovnávat mezi sebou nejen primární data získaná na pracovišti, ale také výsledky analýz nových vzorků s již publikovanými daty. Pro tento účel je možno do databáze vkládat i informace převzaté z literatury (např. publikované hodnoty m/z , jejichž hlavní přidanou hodnotou je známý typ zkoumaného vzorku, identifikovaný organický/anorganický obsah, případné další hodnoty potenciálních markerů a zejména citace umožňující dohledání a stažení příslušné literatury). Pro odlišení původních vzorků analyzovaných uživateli databáze a informací převzatých z literatury jsou tyto dva druhy záznamů podbarveny ve výpisu různými barvami – na první pohled je tak možno odlišit původ dat.

Důležitým rysem módu prohlížení databáze je oddělení veřejné části databáze a části určené pro sdílení pracovních (např. doposud nepublikovaných) dat v rámci řešitelského týmu. Jsou tři možnosti vstupu do databáze:

1. **vstup pro neregistrované uživatele** – Ti mají přístup do databáze, vidí však pouze data, která nejsou vyhodnocena jako citlivá. Nemají tedy přístup např. k primárním analytickým datům; vidí však již uveřejněné informace o složení archeologického objektu a informace o tom, kterými technikami byly změřeny zobrazené záznamy (tato informace je automaticky zobrazována, pokud jsou přítomna odpovídající primární data z měření příslušnou technikou). Informace, které si může zobrazit běžný návštěvník webových stránek, tak odrážejí typické potřeby těchto uživatelů: zjistit informaci o místním, časovém i kulturním původu vzorku a prohlédnout si jeho fotografii.
2. **vstup v tzv. neautorizovaném módu** – Registrace je otevřená (tj. kdokoli si může vytvořit účet). Takovýto uživatel může zobrazovat data i v pokročilém módu (tzn. např. i stahovat surová data). Má však přístup pouze k již odtajněným (např. publikovaným) datům a k datům, která do databáze sám vložil. Takový uživatel má také možnost požádat o zpřístupnění všech dat pomocí kontaktního fomuláře, jehož obsah přijde v e-mailové podobě administrátorovi databáze.

Analytical-Archaeological Database - ANARBASE

(Database of archaeological samples of the Department of Analytical Chemistry, UP)

Full version

You are logged in as Ondřej Kurka ("Kurka").

Input new record

Change Password

Log out

An instruction manual for the database use in pdf format can be downloaded in [English](#) and [Czech](#).

Color coding: [original samples](#) / article citations

Back to home page

Erase all filters (and hide all records)

Show all records (might take a while)

Show all own records

Sample description								
Search	Context	Feature no.	Deposit no.	Further specification	Sample type	Time period	Culture	Photo
Search								both ▾
-	Držovice	H4_2015	5		ceramic vessel	2600_2300-2300_2200 BC	Moravian Corded Ware culture	jpg
-	Přerov-Předmostí 5	H32	447		Soil from the vessel			-

MS data									Other							
Photo	Suspected content	Ionization mode	Markers	MALDI-MS	MS/MS	IMS	LC/MS	GC/MS	Note	Citation	Attachment	ID	Author	Date of input	Edit	Search
both ▾		both ▾	829.7	both ▾	both ▾	both ▾	both ▾	both ▾		both ▾	both ▾		--any author-- ▾		-	Search
jpg	milk	(+)	mz829.7901	Download list	nm	-	-	-	Methods file and ELISA test results in attachment	-	zip	10	Ondřej Kurka	N/A	Edit	-
-	tri- and diacylglycerols	(+)	mz829.7668	Download list	nm	-	-	-	data - GC-MS	-	-	37	Dana Sokolovská	2019-04-29	-	-

Obrázek 5-6 Výsledek hledání markeru s hodnotou m/z 829,7 v databázi ANARBASE (výpis z důvodu lepší čitelnosti vertikálně rozdělen na dvě části, které jsou umístěny pod sebe).

3. **autorizovaný vstup do zabezpečené části databáze** – Ta obsahuje všechny informace přítomné ve veřejné části a další informace, které jsou pro běžného uživatele nedůležité (např. autor vloženého záznamu), nebo citlivé (dosud nepublikovaná primární data, poznámky vkladatelů záznamu, ID záznamu – využívané pro potřeby vnitřní komunikace týmu). K tomuto typu výpisu mají přístup pouze přihlášení uživatelé.

5.1.3.5 Úprava existujících záznamů

V případě, že je nutné změnit parametry záznamu (ať už z důvodu chyby při vkládání, nebo vzhledem k nově zjištěným skutečnostem), je potřeba v databázi vyhledat dotýčný záznam a požadované atributy změnit. Toto lze uskutečnit nejjednodušší opět „administrátorským“ zásahem, tj. přímým vstupem do databáze přes vhodný obslužný program (viz kap. 5.1.3.3). Je také možné ponechat úpravu dat na uživateli – zde je však potřeba zavést jistou míru restrikce přístupu. Proto je vhodné tento proces opět zautomatizovat. Nejjednodušším kritériem, podle kterého lze uživateli dovolit změnit obsah záznamu, je zjistit, zda je jeho autorem. V takovém případě totiž za záznam „zodpovídá“ a pravděpodobně je s odpovídajícím vzorkem také nejlépe obeznámen. Rozsah úprav, které uživateli systém povolí, je volitelný, nemělo by však dojít ke dvěma situacím: 1) přepsání systémových proměnných, které udržují integritu databáze (např. unikátní ID záznamu nebo vazba záznamu na jeho autora); 2) smazání informací, které považujeme za klíčové (jejich vyplnění je povinné už při prvotním vkládání záznamu do databáze). Možnou dodatečnou informací, kterou může systém obsahovat, je pak čas a obsah úpravy. Zde je možností řešení více – počínaje vytvořením kopií všech atributů záznamu, kde jsou archivovány starší verze, případně vytváření souboru či atributu obsahujícího „historii“ všech úprav v textové či jinak čitelné formě. Pokud je možné, aby záznamy upravovalo více autorů, je užitečné rovněž spárovat úpravu a jejího autora.

V rámci ANARBASE je úprava záznamu řešena jednoduchým formulářem, který obsahuje informace o záznamu extrahované z databáze stejným způsobem jako v případě pouhého prohlížení. Tento formulář je možné vyvolat kliknutím na odkaz u záznamu, jehož autorem je právě přihlášený uživatel. Formulář umožňuje data nejen vizualizovat, ale také upravit – ovšem pouze ty atributy, které nemají vliv na výše zmiňovanou stabilitu databáze. Zbýlé atributy (včetně přiložených souborů) jsou pro úplnost informací zobrazeny rovněž, ale pouze v náhledové formě. Po provedení potřebných změn systém zkontroluje, zda formulář obsahuje povinná data, a pokud je vše v pořádku, uloží změny do databáze. Do související tabulky rovněž zaznamená čas a obsah změny, aby bylo možné vrátit se ke starším verzím záznamu v případě chyby/zneužití.

5.1.4 Další existující archeologicko-chemické databáze

Myšlenka uchovávání chemických dat souvisejících s archeologickými nálezy samozřejmě není v odborných kruzích nová a v literatuře najdeme často zmínky o „databázích“ vytvářených pro potřeby jednotlivých analýz/týmů. Poměrně často se však jedná pouze o databáze standardů, se kterými jsou následně analyzované vzorky srovnávány – včetně databáze NIST (National Institute of Science and Technology) používané typicky pro analýzu GC/MS dat. Pokud se jedná o *de novo* budované dedikované databáze, existují často pouze v uzavřené formě pro potřeby konkrétních pracovišť, navíc jsou typicky omezené tematickým rozsahem vzorků a často také povahou vkládaných dat. Níže uvádíme přehled publikací, ve kterých autoři nějakou formou prezentují využití databáze pro analýzu naměřených dat, resp. ukládání změřených dat do existující (popř. nově vznikající) databáze.

5.1.4.1 Databáze standardů

Některé z prací se nezabývají přímo tvorbou databáze vzorků, ale využívají již existující databáze pro zjednodušení interpretace naměřených dat. Z hlediska zájmu o organická rezidua můžeme uvést např. práci Barkera a kol. zabývající se identifikací reziduí proteinů v prehistorických nádobách určených k vaření. Tato práce je zaměřena na identifikaci kostních proteinů z kostních pozůstatků zvířat nalezených v archeologických lokalitách metodou LC/MS/MS. Data byla v tomto případě vyhodnocována softwarem Mascot s využitím proteinové databáze Swiss-Prot (Barker a kol., 2015). Stejná databáze byla použita také při analýze proteinů v zubní sklovině recentních a středověkých zubů metodou MALDI-TOF/TOF (Porto a kol., 2011). Proteinová databáze byla uplatněna také při analýze obsahu vázy získané z hrobu čínského provinčního úředníka Jurou Li. S využitím LC/ESI-MS/MS bylo zjištěno, že fragmenty proteinů odpovídají enzymům z čiroku a dvou druhů kvasinek – obsahem nádoby tak byl pravděpodobně kvašený nápoj založený na čiroku (Zhu a kol., 2018).

Výše zmíněná NIST databáze byla využita při vyhodnocení vzorků egyptských kanop a mumii pomocí GC/MS. Necílená analýza odhalila přítomnost jehličnanových pryskyřic, včelího vosku a některých méně obvyklých sloučenin pocházejících např. z plodů anýzu (Brockbals a kol., 2018). Pomocí GC/MS byla provedena také analýza modelových vzorků lipidů v keramice s využitím extrakce, hydrolýzy a následné transesterifikace mastných kyselin. Také v tomto případě byla využita referenční databáze pro identifikaci detekovaných methylesterů mastných kyselin (Harper a kol., 2017). K identifikaci reziduí lampových olejů z vnitřní strany fragmentů lamp metodou nanoESI-FT-ICR MS/MS byla využita „domácí“ databáze

triacylglycerolů vytvořená ve formě tabulky cíleně pro potřeby studie – zdrojem referenčních dat jsou zde recentní suroviny. V rámci studie bylo zjištěno, že oleje do lamp byly tvořeny převážně zvířecím (hovějším a ovčím) tukem (Garnier a kol., 2009).

5.1.4.2 Databáze obsahující informace o anorganických složkách

Mnoho autorských týmů zabývajících se dlouhodobě analýzou konkrétního typu archeologických vzorků tvoří pro vlastní potřebu více či méně interní databáze, a ty následně využívají při analýzách nových vzorků, o něž poté tyto databáze dále rozšiřují. V tomto ohledu je časté využití metod anorganické analýzy pro identifikaci základních tvůrčích materiálů. Zde je situace většinou odlišná oproti analýze organických reziduí – jedná se zejména o známé materiály a analýza rozdílů ve složení slouží zejména k bližší geografické lokalizaci původu vzorků.

Rešeršním stylem je prezentována petrograficko-izotopová databáze mramorů používaných zejména v antických dobách (Řecko a Řím). Práce uvádí příklady mramorů spadajících pod jednotlivá geografická naleziště s ohledem na jejich identifikaci pomocí obou hlavních metod, tj. petrografie (jsou prezentovány mikroskopické fotografie vzorků) a zjišťování poměrů izotopů kyslíku a uhlíku (jsou prezentovány dvourozměrné grafy s uvedením poměrů izotopů obou prvků ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ a $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$) pro jednotlivé geografické skupiny). Kromě těchto dvou oblastí analýzy práce zmiňuje využití instrumentálních metod, jako jsou neutronová aktivační analýza (NAA), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), elektronová spinová rezonance (ESR) a elektronová paramagnetická rezonance (EPR) – všechny zejména s ohledem na detekci a stanovení přechodných prvků a kovů vzácných zemin. Data získaná v rámci citovaných prací pomocí instrumentálních technik jsou však k dispozici pouze v tabulkové podobě jako součásti těchto prací – chybí zde tak možnost např. cíleně vyhledávat vzorky podle předem očekávaných vlastností (Antonelli a kol., 2015). Podobně byla z petrograficko-chemického pohledu věnována pozornost trachytům a z výsledků petrografických i chemických (XRF) analýz byly vytvořeny tabulky charakterizující jednotlivé druhy minerálních fází trachytu (Germinario a kol., 2018).

Data z měření metodou částicemi indukované rentgenové spektrometrie (PIXE) byla vložena do databáze slonovinových artefaktů paleolitického původu z oblasti Francie a Německa. Pro odlišení původu jednotlivých vzorků se jako nejslibnější jeví sledování a databázování koncentrací hořčíku, vápníku a fluoru, ze stopových prvků pak stroncia, zinku a bromu (Heckel a kol., 2014). Metoda PIXE byla použita také pro analýzu vzorků fénické keramiky z vnitrozemského naleziště v Kharayebu. Výsledky studie byly porovnány s databází dat získaných analýzou vzorků z nalezišť na pobřeží a závěry naznačují, že nalezené vzorky

byly do vnitrozemí dováženy z pobřeží (Roumie a kol., 2019). Zkoumání blízko-východních lokalit a vznik databáze keramických nálezů zaštiťuje také bilaterální smlouva mezi Itálií a Libanonem (na webu www.cnr.it, podrobněji viz Literatura).

Další databázi chemických dat získaných ze zhruba 100 vzorků fénické a punské keramiky popisují Amadori a kol. Použitými technikami byly v tomto případě difraktometrie, optická mikroskopie a rentgenová fluorescence (Amadori a kol., 2017). Keramika byla studována také metodou NAA – autoři vytvořili databázi 38 vzorků pocházejících ze severovýchodní Brazílie a dokázali odlišit dva různé regionální zdroje hlíny, přestože vizuální ohledání (s ohledem na technologii zpracování) naznačovalo, že by se mohlo jednat o vzorky pocházející ze stejného zdroje (Santos a kol., 2006). Podobně byly metodou LA-ICP-MS zkoumány také keramické objekty z provincie Tiwanaku v údolí Moquegua v Peru a porovnáním s existující databází vzorků místní hlíny bylo zjištěno, že kromě místní produkce byla část zkoumaných nádob do provincie dovážena odjinud (Sharratt a kol., 2015).

Metoda neutronové aktivační analýzy byla využita také k vytvoření databáze vzorků pemzy ze Středomoří – bylo zjištěno, že rozdíly ve složení (zahrnující měření 25 různých prvků vyskytujících se jak stopově, tak ve vyšším zastoupení) umožňují určit jejich zdroje a tím i místo původu (Steinhauser a kol., 2006). Vytvořena byla také databáze dat získaných rychlou gama aktivační analýzou (PGAA) více než 200 předmětů z leštěného kamene a předpokládaných zdrojů tohoto materiálu z nalezišť v Maďarsku. Porovnáním dat bylo možné přiřadit jednotlivé zdrojové materiály zpracovaným výrobkům (Szakmány a kol., 2011). Pro účely monitoringu lidského osídlení byla zbudována databáze půdních vrstev nalezených v oblasti Bruselu. Získané vzorky byly vyhodnoceny z pohledu historie, archeologie, geoarcheologie a archeobotaniky a materiálová databáze byla využita pro analýzu obsahu forem fosforu v těchto vzorcích a vyhodnocení výsledků s ohledem na lidský vliv na vznik zkoumaných vzorků půdních vrstev. Nutné je však dodat, že stejně jako v některých jiných zmíněných pracích, je i zde pojmem „databáze“ označena sbírka vzorků. Chemické informace jsou pak interpretovány pouze v kombinaci s informací o typu vzorku půdy, např. zahrada, pole, stáj nebo hřbitov (Devos a kol., 2018). Součástí analýzy archeologických pozůstatků uměleckých děl je také analýza použitých pigmentů. Tvorbou databáze LIBS a ATR-FTIR spekter modelových vzorků některých významných používaných pigmentů (např. malachitu nebo ultramarínové modři) se zabývá práce Matea a kol. (2009). Calligaro využil existující knižní databázi obsidiánů (Cobean, 2002) pro zjištění původu vzorků uměleckého skla metodou PIXE (Calligaro a kol., 2008).

5.1.4.3 Databáze obsahující informace o organických reziduích

Velkou skupinou používaných organických sloučenin v oblasti lidské kultury jsou přírodní barviva. Studie Tamburini a kol. se zabývala tvorbou hmotnostně-spektrometrické databáze přírodních barviv (např. anthrachinonů, flavonoidů, alkaloidů, chalkonů, karotenoidů, xanthenů, polyfenolů apod.) metodou HPLC/ESI-Q-TOF-MS za účelem následné analýzy 31 textilií pocházejících ze staré Číny. Součástí studie bylo i umělé staření těchto barviv za účelem přiblížení se složení reálných vzorků. Ve zkoumaných vzorcích byla poté nalezena celá řada různých použitých barviv (Tamburini a kol., 2019).

Analýza textilií může odhalit rovněž samotnou povahu použitých vláken. Kombinací metod TOF-SIMS a FTIR byly zkoumány vzorky textilií pocházejících z novověkých korejských hrobek (16.–19. stol.). Kromě toho, že byla odhalena přítomnost určitých druhů barviv (např. indiga), bylo uvedenými technikami možno rozlišit také bavlněná a hedvábná vlákna. Za tímto účelem byla v rámci studie vytvořena databáze dat vzniklých měřeními barvených hedvábných vláken (Lee a kol., 2012).

5.1.4.4 Ostatní databáze

Pronikání výpočetní techniky a automatizace vyhodnocování dat dobře ilustruje studie Barone a kol., která se zabývá tvorbou neuronové sítě pro analýzu původu vzorků keramiky s využitím databáze jílových sedimentů. Trénovaná síť dosahuje podle autorů značně vyšší úspěšnost při odhalování původu vzorků v porovnání s klasickými statistickými metodami (PCA a LDA) (Barone a kol., 2019). Zmiňme rovněž dvě archeobotanické databáze, a to nizozemskou databázi RADAR (van Haaster a Brinkkemper, 1995) a britskou Archaeobotanical Computer Database (ABCD) (na webu www.york.ac.uk, podrobněji viz Literatura).

5.1.4.5 Online databáze

Mezi velké projekty v oblasti databázování archeologicko-chemických dat, které jsou k dispozici online, patří např.:

- ⇒ SEAD (Strategic Environmental Archaeology Database): databáze dat souvisejících s vývojem životního prostředí a dopady klimatu a lidské činnosti na něj, dostupná na stránce <https://www.sead.se/> (Buckland a kol., 2011)
- ⇒ EPD (European Pollen Database): databáze fosilních i recentních pylů, dostupná na stránce <http://europeanpollendatabase.net>
- ⇒ Neotoma: paleoekologická databáze, dostupná na stránce <https://www.neotomadb.org/>

- ⇒ ElcHer (Electrochemistry for Heritage Group): databáze voltametrických dat pro identifikaci pigmentů a minerálů pro účely archeometrie, konzervátorství a restaurování, dostupná na stránce <http://elcher.webs.upv.es/> (Doménech-Carbó a kol., 2016)
- ⇒ RESET (Response of Humans to Abrupt Environmental Transitions): databáze vzorků vzniklých vulkanickou činností, dostupná na stránce <https://c14.arch.ox.ac.uk/resetdb/db.php> (Bronk Ramsey a kol., 2015)
- ⇒ e-VISART: FTIR databáze pigmentů a uměleckých materiálů, dostupná na stránce <http://www.ehu.eus/udps/database/database.html> (Pérez-Alonso a kol., 2006)
- ⇒ WODAN: databáze dřeva a dřevěného uhlí, dostupná na stránce: www.wodancharcoal.ie (Stuijts a kol., bez uvedení roku)
- ⇒ Databáze mincí, mincoven a mincmistrů, dostupná na stránce: cnspg.cz/database/
- ⇒ CZAD: Archeobotanická databáze České republiky, dostupná na stránce <https://web.arup.cas.cz/czad/>

5.2 Dokumentační činnost, evidence a konzervace-restaurování archeologických nálezů

Lucie Janus Hlavičková, Barbora Zapletalová, Jaroslav Peška

Kapitola stručně pojednává o poznatcích a praxi dokumentace, evidence a konzervátorsko-restaurátorských zásahů ze dvou relativně příbuzných institucionálních oblastí, a sice z archeologických center, v nichž mimo jiné spolupracují terénní archeologičtí pracovníci a konzervátoři, a ze specializovaných a muzejních konzervátorsko-restaurátorských pracovišť, kam se archeologické nálezy z terénních výzkumů transportují pro další zpracování. Vzhledem k poměru širokého rozsahu dané problematiky a rozsahu kapitoly jsou uvedené postupy a materiály pouze vybranými příklady z řady možností, které vychází z odborné literatury a praktických zásahů.

5.2.1 Dokumentační a evidenční činnost

Zápisům jednotlivých nálezů do dané institucionální databáze vždy předchází správná a přesná dokumentace. K tomu je zapotřebí úzká spolupráce všech zainteresovaných osob a organizací, a to již v terénu. Veškerý vyzvedávaný materiál včetně odebíraných vzorků je nutné již na místě dokumentovat písemně (každý

hrob, objekt, struktura, vrstva, čtverec, sektor má své specifické číslo, podle kterého se může vždy zpětně dohledat). Každý objekt je v rámci kontextuálního záznamu (tzv. Harrisova matrice) kromě přiděleného čísla (hroby označeny symbolem H a pohřby P) identifikován pomocí čísla kontextů, jako je: nestratifikováno (X000), styková plocha (X001-X099), uložení (X100-X499), výkop (X500-X699), dřevo (X700-X799), pohřeb (X800-X899), zeď (X900-X999). Rovněž je zaznamenána situace stratigrafických vztahů (starší, mladší, žádný, resp. stratigraficky „nad“, stratigraficky „pod“) a již v terénu podrobně popsána nálezová situace každé kontextuální entity do tzv. kontextuálních karet, které se pak stanou v elektronické podobě součástí závěrečné nálezové zprávy. Dále přichází na řadu neméně důležitá dokumentace fotografická (popř. kresebná), využívá se také fotogrammetrie a v poslední době kolmé snímky z nízkoletícího dronu.

Po transportu do laboratoře jsou veškeré údaje na polyethylenových/papírových sáčcích s nálezy porovnávány s písemnou dokumentací z terénu a teprve pokud vše souhlasí, může být započato laboratorní zpracování, inventarizace a konzervace-restaurování.

Nálezy, ať už organické nebo anorganické povahy, se dokumentují a inventarizují obvykle dle interního systému každého archeologického pracoviště. Velmi častým materiálem je keramika, která představuje v objemu získaného archeologického materiálu skoro 90 %, následují ostatní materiály: mazanice, zvířecí kosti, kovy, štípaná industrie, jantar, dřevo, kůže, kameny, struska, uhlíky, různé vzorky barviv a též kombinace vyjmenovaných materiálů, u nás nejčastěji kombinace kovu a organického materiálu.

Pro evidenci, respektive inventarizaci je často využíváno inventární číslo (kód), které je složeninou přírůstkového čísla akce, lomeno číslo uložení, za pomlčkou pak následuje pořadové číslo nálezu ve vzrůstající řadě. Označení vzorků v databázi je vázáno na číslo objektu/hrobu a pořadové číslo, které je vzorku přiděleno většinou již v terénu nebo později při odběru v laboratoři. Takto inventarizované nálezy jsou uloženy do polyethylenových/papírových sáčků, popř. uzavíratelných plastových boxů, na kterých jsou pečlivě uvedeny všechny důležité popisné a inventarizační informace. Následuje fáze počítačové systémové evidence, tj. zápis do interní databáze archeologického pracoviště. Pro potřeby inventarizace v Archeologickém centru Olomouc byla databáze vytvořena v prostředí Microsoft Access, nicméně jiné instituce využívají databáze jako např. Demus 01 Archeologie, Bach aj. (Polášek, 2006).

Každé inventární číslo má v interní databázi instituce (Archeologického centra) svůj vlastní řádek, zapisované údaje jsou následující: kulturní období (využíváme zkratky pro jednotlivá období), číslo objektu/hrobu, číslo uložení, druh materiálu, název předmětu, systém (tento údaj upozorňuje, jedná-li se o zbraň,

nástroj, nádobu, platidlo, šperk apod.), inventární číslo, počet kusů, číslo bedny a poznámky (zde uvádíme veškeré důležité dodatečné údaje a upozornění). Jednotlivé položky se mohou zpětně vyhledávat pomocí jednoduše zadaných filtrů. Do databáze odebíraných vzorků se zaznamenávají základní údaje z terénu, a to číslo objektu/hrobu, uloženiny, sektoru/vrstvy, materiálu a případně také objemové množství či hmotnost odebraných vzorků.

V rámci konzervátorského zásahu je potřeba přistupovat ke každému předmětu či materiálu individuálně. Záleží na mnoha okolnostech – aktuálním stavu a stupni degradace, stáří, podmínkách při nálezu v terénu a materiálu, zejména jedná-li se o kombinaci různých materiálů.

V muzejních institucích je kurátorem archeologické podsbírky zpracovávána evidence I. a II. stupně, v rámci kterých je sbírkový předmět označen přírůstkovým a následně inventárním číslem, je zapsán do přírůstkové knihy a je mu vytvořena katalogizační karta. Na konzervátorsko-restaurátorském pracovišti je následně zpracována obrazová a písemná dokumentace, respektive konzervátorsko-restaurátorská zpráva. Takováto zpráva obvykle obsahuje přírůstkové či inventární číslo, datum, název předmětu, jeho dataci, materiály, lokalitu, ze které nález pochází, průzkum s využitím historických věd (technologie výroby, použití, analogie aj.), stav předmětu před zásahem, včetně jeho aktuálního popisu a degradace, materiální průzkum (veškeré analýzy, míry, váha, textilně-technologický rozbor, mikrobiologický průzkum aj.), individuálně pokud byly, tak předchozí zásahy a použité materiály, kompletní konzervátorsko-restaurátorský zásah, respektive výčet postupů a použitých materiálů, včetně koncentrací, doporučený depozitární a expoziční režim (specifické pro každý materiál) a v neposlední řadě uvedené jméno, kdo průzkum a zásah prováděl. Pokud se týká fotografické dokumentace, ta se z pravidla provádí před a po zásahu s určitými parametry (popisek, měřítko, barevná škála atd.). V některých případech, jako třeba u množství fragmentů archeologického textilu nebo u náročnějších zásahů, je žádoucí fotodokumentace také v průběhu zásahu. Kresebná dokumentace s měřítkem se provádí např. u textilních materiálů s motivy nebo u keramických střepů.

5.2.2 Průzkum a konzervace-restaurování

Konzervátorskému zásahu musí vždy předcházet průzkum předmětu, popřípadě vzorku, jehož dílčí metody a analýzy vyplývají z daného materiálu. Jedná se např. o analýzy mikroskopické, chemické, prvkové, RTG průzkum aj. Klíčové nejen pro chemické analýzy je, aby předcházely jakýmkoli zásahům, respektive aby vzorky nebyly kontaminovány činidly a aditivami používanými v rámci konzervátorsko-restaurátorských zásahů. Pokud se týká průzkumu, zaměřují se analytičtí chemici na zjištění a identifikaci zbytků organické hmoty, otisků prstů, zvířecí

srsti, zbytků barviv. Sanační konzervátorsko-restaurátorský zásah je složen z řady specifických postupů – čištění (mechanické, chemické), konzervace (stabilizace, pasivace, závěrečná povrchová úprava), individuálně fixace, restaurování (např. individuálně doplnění textilního materiálu aj.). Nutné je ovšem mít na paměti, že veškeré analýzy by měly být v co největší míře nedestruktivní a před každým zásahem do materiálu předmětu by měl pracovník provádějící danou analýzu tento postup konzultovat se zadávajícím konzervátorem-restaurátorem.

5.2.2.1 Keramické archeologické nálezy

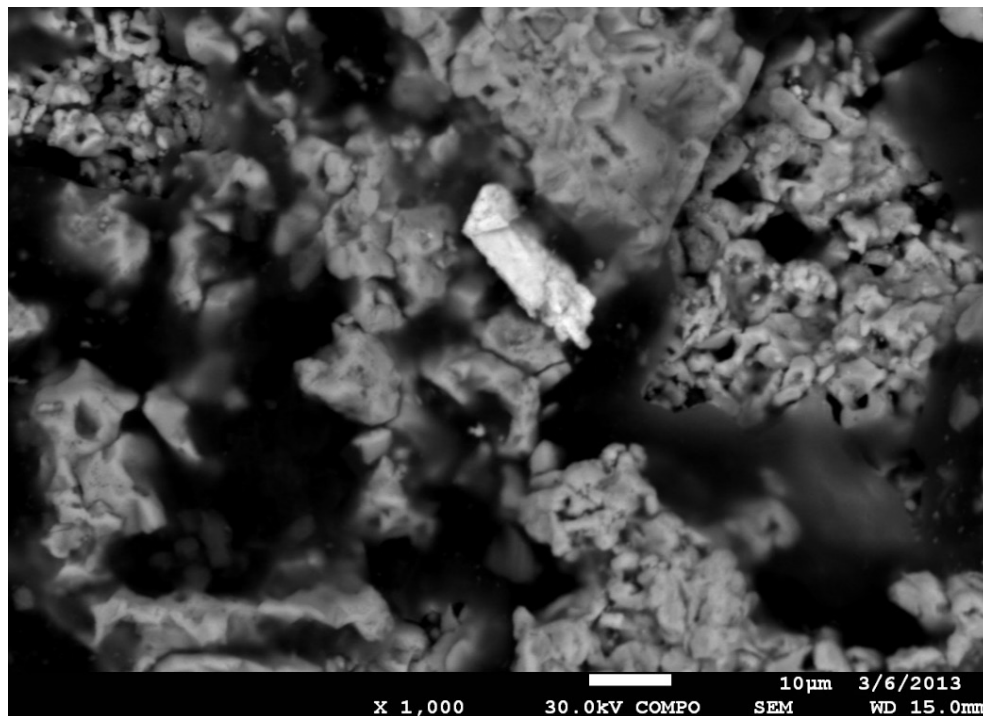
Keramické nádoby mohou být po předchozím průzkumu, suchém či mokrém čištění, lepeny např. disperzí, akrylovým lepidlem aj. Pokud je potřeba střepy před lepením zpevnit, používá se vodou ředitelná disperze (např. disperze Sokrat 2802A nebo roztoky disperzního adheziva a destilované vody). Chybějící fragmenty se v případě kompletace nádoby a potřeby zpevnění celku doplňují bílou sádrou. Závěrečnou otázkou pak bývá proces retušování, zda k němu přistoupit či nikoli. **Veškeré použité materiály by však měly být vždy reversibilní.**

5.2.2.2 Kovové archeologické nálezy

Kovové archeologické nálezy se objevují nejčastěji železné a bronzové, dále pak nálezy slitin mědi, zřídka stříbra, zlata a olova. Železné artefakty je po předchozím průzkumu a dokumentaci potřeba nejprve zbavit korozních vrstev za využití otryskávacího zařízení, brusky, skalpelů, ocelových kartáčků a destilované vody. **Takovému čištění ovšem musí předcházet mimo jiné mikroskopický a RTG průzkum,** který odhalí přítomnost kovového jádra, prasklin apod., což představuje informace týkající se rozsahu čištění každého takového předmětu. Následuje desalinace v destilované vodě, chloridové a síranové testy, tanátování, proces sušení v elektrické sušárně a závěrečné povrchové úpravy (např. dvě vrstvy Paraloidu B72 v toluenu, případně vrstva vosku v benzínu). Přesné koncentrace se v každém případě odvíjí od materiálu a také od účelu použití (závěrečná povrchová úprava, lepení apod.). **Pokud předmět obsahuje železné části v kombinaci např. s kostí nebo dřevem, je třeba tuto část před tanátováním ochránit vhodným lakem** (např. Paraloid) či aplikací papírových pásek.

Bronzové nálezy a nálezy slitin mědi mohou být čištěny tužkou se skelnými vlákny, jemným měděným kartáčkem, ultrazvukovou jehlou aj. (Ondříková, 2017). Následuje deionizace v lihovém roztoku benztotriazolu, proces sušení a závěrečné povrchové úpravy. V případě vzácnějších nálezů, typicky u mincovního materiálu, je třeba zvláštní opatrnosti. **Specifikem jsou zbytky pokovení, případně procesy vedoucí k relativnímu obohacení povrchové vrstvy** (nízkojakostní ražby, dobová falza), kterou je obvykle žádoucí zachovat. Na **obrázku 5-7** je zobrazen

typický příklad pokovení měděné mince (resp. falza měděného černého peníze Ferdinanda I. Habsburského). Nevhodným způsobem čištění byla skoro veškerá stříbrná vrstva odstraněna a jen díky zachycení mikrometrových stříbrných částic pomocí SEM/EDS analýzy povrchu falza bylo možné doložit pokovení (Richtera a kol., 2014). Běžná praxe doporučuje stříbro čistit mechanickou cestou (skelná tužka) a částečně i chemicky (Chelaton 3, zředěný roztok kys. citronové) s následným oplachem v destilované vodě a opakováním zmíněných povrchových úprav. Nicméně **v případě mincovního materiálu (a nejen u něj) je nutné pracovat velmi obezřetně, neboť jak již bylo uvedeno výše, může dojít k nenávratnému odstranění cílených povrchových úprav** (např. pokovení). Dále může docházet k narušování povrchové krusty a nevratnému poškození povrchu. V tomto případě je vhodnější mincovní materiál vyčistit pouze máčením v zahřáté destilované vodě pro odstranění hrubých nečistot a solí (roztok nutno pravidelně měnit). Teprve po detailním mikroskopickém/chemickém průzkumu je možné přistoupit k dalšímu kroku čištění. Archeologické nálezy zlata čistíme pouze v destilované vodě a necháme volně na vzduchu vysušit.



Obrázek 5-7 Detail povrchu falza při tisícinásobném zvětšení. Šedé oblasti korespondují s měděným povrchem, tmavé oblasti jsou korozní produkty a případné organické nečistoty. Světlý útvar uprostřed záznamu je stříbrná částice o délce přibližně 10 μm , jediný potenciální doklad o možném pokovení falza.

5.2.2.3 Jantarové a kostěné archeologické nálezy

Jantarové nálezy jsou méně časté. Řeší se většinou zpevněním Paraloidem B72 ředěným v xylenu, popř. toluenu. Pokud je potřeba provést konzervátorský zásah u kostěných nálezů (kosti, rohovina, zuby apod.), jedná se o rozdělení přístupu do dvou kategorií dle stavu materiálu. Předměty v dobrém stavu stačí pouze očistit, případně zpevnit. Jedná se většinou o lepení jednotlivých částí (např. epoxidovými pryskyřicemi, klihem), zpevňování, sušení a tmelení (starším postupem bývá doplnění bílou sádrou, vhodnější je ovšem použití polymerních materiálů, epoxidových a methylnethakrylátových pryskyřic, např. Dentacrylu). Vedle toho je potřeba předměty ve špatném stavu mimo uvedené procesy např. ještě zbavit biologického napadení, tukových či voskových nečistot aj.

5.2.2.4 Archeologické dřevo

Archeologické, tzv. vodou nasycené dřevo vyžaduje odlišný způsob sanačního zásahu než dřevo suché. Jedná se o nálezy dlouhodobě uložené ve vlhké půdě, bahně či rašelině, které jsou tak vystaveny degradačním procesům vlivem vody a mikroorganismů (Šimůnková a Kučerová, 2008). Po vyzvednutí takového artefaktu je nutné udržovat vlhké prostředí po celou dobu manipulace tak, aby nedošlo k jeho vysušení a nevratnému poškození. Konzervátorský zásah vodou nasyceného dřeva lze rozdělit na dva typy – dehydrataci bez borcení materiálu a zaplnění dutin (metoda vakuové sublimace ledu, tzv. „freeze-drying“), anebo proces zaplnění dutin tuhou látkou, která nahradí vodu a zabrání tak zborcení materiálu. Jedná se např. o sacharózu, kdy se postupně zvyšuje koncentrace daného předem převařeného roztoku, aby neobsahoval nežádoucí bakterie (Šimůnková a Kučerová, 2008). Konzervaci lze provést také polyethylenglykolem (tzv. PEGem), aplikací ponoru, postřiku, nebo kombinací obou postupů. Tato metoda naopak probíhá za vyšší teploty. Omytý a desinfikovaný materiál je potřeba impregnovat, zvyšovat postupně koncentraci roztoku a průběžně kontrolovat průběh impregnace a kvalitu lázně. Pokud není cílem vystavit takovýto dřevěný artefakt v lázni ve speciální vitríně, následuje po impregnaci pomalé sušení, které minimalizuje praskliny materiálu.

5.2.2.5 Archeologická useň

Cílem konzervátorského postupu archeologické usně je mimo jiné **vytěsnit z archeologického usňového materiálu vodu** tak, aby nedošlo k nevratnému poškození materiálu a ke zborcení jeho struktury. Po dokumentaci a průzkumu, důkladném šetrném očištění v destilované vodě prostřednictvím jemných kartáčků a desinfekci např. ve vodném roztoku s Ajatinem či Incidur Sprayem

lze přistoupit ke stanovení pH usně pomocí pH metru s dotykovou elektrodou a následné dehydrataci např. prostřednictvím ethanolu, acetonu, isopropylalkoholu, případně jejich vzájemnou kombinací a přidavkem glycerolu (Řezníková, 2016). Na provedenou dehydrataci navazuje proces vysoušení např. v acetonových lázních (Kosová a kol., 2014). Na místě je zde kontrola procesu, aby nedošlo k přesušení. V závěru lze usňový materiál dočistit aktivní pěnou vodného roztoku Flavonolu a tzv. natukovat, k čemuž lze využít materiály KOREX (Šulcová, 2011). V případě restaurátorského zásahu lze individuálně přistoupit k šití fragmentů, dále pak u nálezů obuvi bývá předmět často uložen v depozitáři na speciálně tvarovaném kopytě (Kosová a kol., 2014). Důležité pro budoucí stav materiálu je dodržení doporučeného depozitárního a expozičního režimu.

V rámci sanačního konzervátorského zásahu archeologické usně bývá hodnocen mimo jiné výsledný barevný odstín materiálu, jelikož je prokázáno, že tukovací látky, ale také PEG mohou působit tmavnutí usně. Co se týče pH usní, je známo, že při dlouhodobém pobytu v půdě dochází k vyrovnání pH zeminy a usně. Hodnota pH usně zde neklesá tak, jak je tomu u stárnutí historických usní v klimatických podmínkách muzeí, archivů apod. Půdní prostředí působí na useň pufrujícím účinkem. V tomto případě se pH vlivem koroziivních účinků prostředí nesnižuje, ba naopak se zvýší na hodnotu pH půdy 6,5 (Řezníková, 2016).

5.2.2.6 Archeologické sklo

Pokud se týká degradačních procesů skleněných archeologických nálezů, skleněné artefakty patří z archeologických materiálů k těm stabilnějším (Hamilton, 1999), avšak jsou náchylné k mechanickému poškození a koroziivní degradaci. Koroziivní procesy archeologického skla jsou způsobeny komplexem činitelů, především vlhkostí za spolupůsobení látek obsažených v půdě. Šetrnost je zde na místě, jelikož nevhodným odstraněním koroziivních produktů může dojít ke ztrátě skleněného materiálu, a tudíž k naprosté ztrátě možnosti získat jakékoli informace týkající se např. zdobení (Vaňurová, 2021). Nejčastěji bývá po provedení průzkumu a dokumentace přistoupeno pouze k šetrnému omytí skleněných předmětů (např. korálků), případně fragmentů v destilované vodě, osušení sterilním textilním materiálem a případně shledáním a fixací střepů, které k sobě náleží. Podstatné pro budoucí stav je – stejně jako u předešlých materiálů – dodržení doporučeného depozitárního a expozičního režimu (Daňková a kol., 2012).

5.2.2.7 Archeologické a funerální textilie

Archeologický textil je jedním z nejcitlivějších materiálů. Jedná se buďto o funerální oděvní aj. nálezy, nebo se může jednat o kombinaci materiálů, jako např. dochovaná textilní vlákna na nálezu depotu mincí, fragmenty plošných texti-

líí pouzder, pochev apod. (Otavská, 2016). Textilní fragmenty kombinovaných materiálů mohou být pokryty korozními produkty, a proto zde bývají analýzy složitější než u běžného historického textilu a někdy nelze přesnou charakteristiku textilního vlákna identifikovat. Specifickým rysem u funerálních textilií je vedle nečistot častý výskyt bakterií, plísní a škůdců, který vyžaduje provedení mikrobiologického průzkumu (Otavská, 2018). Průzkum a konzervace optimálně následuje bezprostředně po vyzvednutí a zaevidování takového materiálu. Fotografická dokumentace je zde na místě průběžně během celého sanačního procesu. Šetrné čištění probíhá jak suchou, tak mokrou cestou v lázních. Materiály a postupy se individuálně odvíjí od aktuálního stavu a charakteru předmětů či fragmentů, kombinace materiálů a jejich citlivosti. Lze např. využít jemného odsávání chirurgickým odsávacím zařízením přes vrstvu krepelíny, lázně zahřáté destilované vody, často s přidavkem desinfekčního přípravku (Incidur apod.) (Čiháková a Richtmrová, 2010), čištění suchými detergenty aj. Proces sušení probíhá ve vodorovné poloze materiálu, s možným zatížením, na vypnuté síti tak, aby mohlo probíhat z obou stran (Čiháková a Richtmrová, 2010). Některé materiály je potřeba vyrovnat např. prostřednictvím parového skalpelu. Drobné fragmenty lze uložit do polyethylenových sáčků a následně papírových krabic. Pokud se jedná o plošné textilní fragmenty, následuje po sanačním zásahu, dokumentaci a evidenci jejich adjustace např. na měkce potažené desky, opatřené snímatelným příklopem. Kontaktní materiály je nutno volit nekyselého charakteru. Součástí zásahu je vždy provedení textilně technologického rozboru.

Stejně jako se od materiálu a typu předmětu odvíjí průzkum a konzervátorsko-restaurátorský zásah, liší se také způsob manipulace a uložení do depozitářů (Kopecká a kol., 2002). Kovové nálezy se např. ukládají do pracho- a vzducho- těsných uzavíratelných boxů, buďto ještě v polyethylenových sáčcích, nebo ideálně do předem upravené a vyřezané polyethylenové hmoty, aby nedošlo během manipulace k poškození, a s přidáním vysoušecího materiálu Silikagelu E a s indikátorem vlhkosti (**obrázek 5-8**, Janusová, 2013).

V případě textilních fragmentů je žádoucí horizontální uložení v nekyselých obalech (nekyselé papíry, papírové krabice aj.). Doporučené depozitární režimy se liší materiálem (teplota, relativní vlhkost atd.), nicméně v každém případě je nutno dbát o ochranu předmětů před prachovými a jinými nečistotami, co nejmenší námahu materiálu, maximálně zamezit přístupu světla a UV složky a ideálně průběžně kontrolovat předměty.



Obrázek 5-8 Hroty šípů a kroužek z hradu Cvilín. Stav po zásahu. Příklad uložení kovových archeologických nálezů v uzavíratelném boxu, ve speciálně vytvarované hmotě, se silikagelem E a indikátorem vlhkosti.

Literatura

- Amadori M. L., Del Vais C., Fermo P., Pallante P., Archaeometric researches on the provenance of Mediterranean Archaic Phoenician and Punic pottery, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 24, 13921–13949.
- Antonelli F., Lazzarini L., An updated petrographic and isotopic reference database for white marbles used in antiquity, *Rendiconti Lincei* 2015, 26, 399–413.
- Barker A., Dombrosky J., Chaput D., Venables B., Wolverton S., Stevens S. M., Validation of a Non-Targeted LC-MS Approach for Identifying Ancient Proteins: Method Development on Bone to Improve Artifact Residue Analysis, *Ethnobiol. Lett.* 2015, 6, 162–174.
- Barone G., Mazzoleni P., Spagnolo G. V., Raneri S., Artificial neural network for the provenance study of archaeological ceramics using clay sediment database, *J. Cult. Herit.* 2019, 38, 147–157.
- Benešová J., *Konzervování a restaurování kovů: ochrana předmětů kulturního dědictví z kovů a jejich slitin*. Vyd. 1. Brno: Technické muzeum v Brně, Metodické centrum konzervace 2011, str. 648 (ISBN 9788086413709).
- Brockbals L., Habicht M., Hajdas I., Galassi F. M., Ruhli F. J., Kraemer T., Untargeted metabolomics-like screening approach for chemical characterization and differentiation of canopic jar and mummy samples

- from Ancient Egypt using GC-high resolution MS, *Analyst* 2018, 143, 4503–4512.
- Bronk Ramsey C., Housley R. A., Lane C. S., Smith V. C., Pollard A. M., The RESET tephra database and associated analytical tools, *Quaternary Sci. Rev.* 2015, 118, 33–47.
- Buckland P. I., Eriksson E., Linderholm J., Viklund K., Engemark R., Palm F., Svensson P., Buckland P., Panagiotakopulu E., Olofsson J., Integrating human dimensions of Arctic palaeoenvironmental science: SEAD – the strategic environmental archaeology database, *J. Archaeol. Sci.* 2011, 38, 345–351.
- Calligaro T., PIXE in the study of archaeological and historical glass, *X-Ray Spectrometry* 2008, 37, 169–177.
- Cobean R. H., A World of Obsidian: The Mining and Trade of Volcanic Glass. In: *Ancient Mexico*. University of Pittsburgh Latin American Archaeology Publications, Pittsburgh 2002. (ISBN: 970-18-2508-X)
- Čiháková A., Richtmrová K., Konzervování archeologického nálezu ze Salmovského paláce – textil. Soubor archeologických textilií z odpadní jímky z poloviny 17. století. In: *Textil v muzeu. Soubor statí k problematice oděvní doplňky – péče – průzkum – prezentace*. Technické muzeum v Brně 2010 (ISBN: 978-80-86413-74-7).
- Součková Daňková A., Cílová Z., Knížová M., Jeníková L., *K metodice kresebných a hmotových rekonstrukcí historického skla*, In: *Fórum pro konzervátory-restaurátory*, Technické muzeum v Brně 2012 (ISBN: 978-80-86413-89-1).
- Devos Y., Near total and inorganic phosphorus concentrations as a proxy for identifying ancient activities in urban contexts: The example of dark earth in Brussels, Belgium, *Geoarchaeology* 2018, 33, 470–485.
- Domenech-Carbo A., Domenech-Carbo M. T., Valle-Algarra F. M., Gimeno-Adelantado J. V., Osete-Cortina L., Bosch-Reig F., On-line database of voltammetric data of immobilized particles for identifying pigments and minerals in archaeometry, conservation and restoration (ELCHER database), *Anal. Chim. Acta* 2016, 927, 1–12.
- Garnier N., Rolando C., Hotje J. M., Tokarski C., Analysis of archaeological triacylglycerols by high resolution nanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th century BC-4th century AD oil lamps from Olbia (Ukraine), *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 284, 47–56.
- Germinario L., Hanchar J.M., Sassi R., Maritan L., Cosio R., Borghi A., Mazzoli C., New petrographic and geochemical tracers for recognizing the provenance quarry of trachyte of the Euganean Hills, northeastern Italy, *Geoarchaeology* 2018, 33, 430–452.
- Goubitz O., *Stepping through times: Archeological Footwear from Prehistoric Times until 1800*. Zwolle 2001.
- Grew F., Neergaard M., *Shoes and Pattens*, Suffolk 2004.
- Hamilton D. L., *Methods for conserving archeological material from underwater sites*, Texas 1999.
- Harper C. S., Macdonald F. V., Braun K. L., Lipid Residue Analysis of Archaeological Pottery: An Introductory Laboratory Experiment in Archaeological Chemistry, *J. Chem. Educ.* 2017, 94, 1309–1313.
- Heckel C., Müller K., White R., Floss H., Conard N. J., Reiche I., Micro-PIXE/PIGE analysis of Palaeolithic mammoth ivory: Potential chemical markers of provenance and relative dating, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 2014, 416, 133–141.
- Hronek J., *Databázové systémy*, skripta Univerzity Palackého, Olomouc 2007.
- Janusová L., Komplexní konzervátorsko-restaurátorský zásah na hrotech šípů a kroužku z hradu Cvilín, In: *Ročenka 2013 Olomouc*. Archeologické centrum Olomouc 2014 (ISBN 978-80-86989-26-6).
- kach-database.upol.cz/anarbase/ (staženo dne 30. 3. 2021).

- Kite M., Thomson R., *Conservation of leather: and related materials*, Oxford 2006.
- Kopecká I., *Preventivní péče o historické objekty a sbírky v nich uložené*, Praha 2002 (ISBN:80-86234-28-2).
- Kosová L., Ondříková G., Slavíková A., Ženožičková I., Staněk P., *Konzervace kožené boty z druhé poloviny 14. století. In: Fórum pro konzervátory-restaurátory*, Technické muzeum v Brně 2014 (ISBN: 978-80-87896-08-2).
- Kucera L., Peska J., Fojtik P., Bartak P., Sokolovska D., Pavelka J., Komarkova V., Benes J., Polcerova L., Kralik M., Bednar P., Determination of Milk Products in Ceramic Vessels of Corded Ware Culture from a Late Eneolithic Burial, *Molecules* 2018, 23, 3247.
- Lee J., Ceglia A., Kim K.-J., Lee Y., Characterization of dyed textiles using TOF-SIMS and FT-IR, *Surf. Interface Anal.* 2012, 44, 653–657.
- Mateo M. P., Ctvrtnickova T., Nicolas G., Characterization of pigments used in painting by means of laser-induced plasma and attenuated total reflectance FTIR spectroscopy, *Appl. Surf. Sci.* 2009, 255, 5172–5176.
- Nixon R., *Learning PHP, MySQL & JavaScript – With jQuery, CSS & HTML5*, 4th Edition. O'Reilly Media, Inc., Sebastopol 2015. (ISBN: 978-1-491-91866-1)
- Ondříková G., Konzervace kovových předmětů ze Zelného trhu v Brně, In: *Zprávy Vlastivědného muzea v Olomouci. Supplementum Problematika sanační konzervace-restaurování*, č. 314, Olomouc 2017 (ISBN: 978-80-85037-87-6).
- Otavská V., Funerální textilie v konzervátorsko-restaurátorské praxi, In: *Fórum pro konzervátory-restaurátory*. Technické muzeum v Brně 2018 (ISBN: 978-80-87896-58-7).
- Otavská V., Průzkum a konzervování archeologických textilií z Nového města Pražského. In: *Fórum pro konzervátory-restaurátory*. Technické muzeum v Brně 2016 (ISBN: 978-80-87896-32-7).
- Otte L., *Databázové systémy*, Fakulta strojní, Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ostrava 2012.
- Pérez-Alonso M., Castro K., Madariaga J. M., Vibrational Spectroscopic Techniques for the Analysis of Artefacts with Historical, Artistic and Archaeological Value, *Curr. Anal. Chem.* 2006, 2, 89–100.
- Písek S., *HTML: Začínáme programovat*, 4. aktualizované vydání, Grada Publishing, Praha 2014 (ISBN: 978-80-247-5059-0).
- Polášek, P., *Dokumentace muzejní konzervace-restaurace*, Filozofická fakulta Masarykovy university, Ústav archeologie a muzeologie, Brno 2006.
- Porto I. M., Laure H. J., Tykot R. H., de Sousa F. B., Rosa J. C., Gerlach R. F., Recovery and identification of mature enamel proteins in ancient teeth, *Eur. J. Oral Sci.* 2011, 119 Suppl 1, 83–87.
- Richtera, L., Gregor, P., Zmrzlý, M. Falza nedatovaných černých penízů Ferdinanda I. Habsburského, NL 2014, 69, 63–71.
- Roumie M., Oggiano I., Reslan A., Srouf A., El-Morr Z., Castiglione M., Tabbal M., Korek M., Nsouli B., PIXE contribution for a database of Phoenician pottery in Lebanon, *Nucl. Instrum. Meth. B* 2019, 450, 299–303.
- Řezníková M., *Porovnání konzervačních postupů pro archeologické usně*. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Brno 2016.
- Santos J. O., Munita C. S., Valério M. E. G., Vergne C., S.O.P.M., Determination of Trace Elements in Ceramics and application of Kernel Density Estimates: Implications for the definition of production locations, *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 2006, 269, 441–445.
- Sharratt N., Golitko M., Williams P. R., Pottery production, regional exchange, and state collapse during the Middle Horizon (A.D.500–1000): LA-ICP-MS analyses of Tiwanaku pottery in the Moquegua Valley, Peru, *J. Field Archaeol.* 2015, 40, 397–412.

- Schwartz B., Zaitsev P., Tkachenko V., *High Performance MySQL*. O'Reilly Media, Inc., Sebastopol, CA, USA, 2012 (ISBN: 978-1-449-31428-6).
- Steinhauser G., Sterba J. H., Bichler M., Huber H., Neutron activation analysis of Mediterranean volcanic rocks – An analytical database for archaeological stratigraphy, *Appl. Geochem.* 2006, 21, 1362–1375.
- Stuijts I., O'Donnell L., Working with WODAN – an online charcoal database (staženo z <https://ojs.uv.es/index.php/saguntumextra/article/download/1545/919>, dne 30. 3. 2021).
- Szokmány G., Kasztovszky Z., Szilágyi V., Starnini E., Friedel O., Biró K. T., Discrimination of prehistoric polished stone tools from Hungary with non-destructive chemical Prompt Gamma Activation Analyses (PGAA), *Eur. J. Mineral.* 2011, 23, 883–893.
- Šimůnková E., Kučerová I., *Dřevo*. Praha 2008 (ISBN: 978-80-86657-10-3).
- Škrdlantová M., Víchová J., Restaurování-konzervování textilií v kombinaci s jiným materiálem. In: *Textil v muzeu. Soubor statí k problematice oděvní doplňky – péče – průzkum – prezentace*. Technické muzeum v Brně 2010 (ISBN: 978-80-86413-74-7).
- Štefcová P. (ed.), *Preventivní ochrana sbírkových předmětů*, první vydání, Národní muzeum, Praha 2000 (ISSN: 80-7036-114).
- Šulcová V., Konzervace archeologického nálezu ze Salmovského paláce – usně. In: *Textil v muzeu – oděvní doplňky*. Technické muzeum v Brně 2011.
- Tamburini D., Investigating Asian colourants in Chinese textiles from Dunhuang (7th-10th century AD) by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry – Towards the creation of a mass spectra database, *Dyes Pigments*, 2019, 163, 454–474.
- Vaňurová K., *Sklo z archeologických výzkumů a vývoj sklářství ve Slezsku ve středověku a raném novověku*. Brno 2021.
- van Haaster H., Brinkkemper O., RADAR, a Relational Archaeobotanical Database for Advanced Research, *Vegett. Hist. Archaeobot.* 1995, 4, 117–125.
- www.adminer.org (staženo dne 30. 3. 2021).
- www.cnr.it/en/bilateral-agreements/project/1753/establishment-of-phoenician-pottery-database-on-the-chemical-composition-of-terracottas-using-ion-beam-analysis-techniques-iba-and-application-to-the-study-of-artisanal-production-pottery-and-coroplastic-from-kharayeb-archeological-site-in-southern-lebanon (staženo dne 30. 3. 2021).
- www.jakpsatweb.cz/heslo.html (staženo dne 30. 3. 2021).
- www.mysql.com (staženo dne 30. 3. 2021).
- www.phpmyadmin.net (staženo dne 30. 3. 2021).
- www.york.ac.uk/inst/chumpal/ARH/ABCD-webpage.doc (staženo dne 30. 3. 2021).
- Zhu Z. Y., Yu C. L., Miao Y. F., Lu Z. Y., Yang J. C., Mass spectrometry identification of the liquor contained in the plum vase excavated from Jurou Li's Grave of the Jin Dynasty (1115-1234 CE) in Xi'an, Shannxi, China, *Herit. Sci.* 2018, 6, 45.

6

Vybrané lokality archeologického výzkumu a studie využívající chemické analýzy

6.1 Halštatská Býčí skála – 153 let přírodovědných analýz

Martin Golec, Zuzana Mírová

Na tomto místě si dovolíme krátce zmínit jednu z nejdůležitějších archeologických lokalit na našem území. Jeskynní lokalita Habrůvka – „Býčí skála“, okres Blansko v Jihomoravském kraji České republiky, známá zkráceně jako Býčí skála, je proslavena svými halštatskými nálezy Heinricha Wankela vyzvednutými v jeskynní části nazývané „Předsíň“ poprvé v roce 1868 (Wankel, 1868) a zejména pak roku 1872 (**obrázek 6-1**) (Wankel, 1882). V roce 1891–1892 Předsíň sondoval také M. Kříž (Kříž, 1892, Taf. XII 546/84), nálezy se ale nedochovaly. V letech 1937–1943 k nim přibyl nový soubor postupně získaný německými archeology (Oliva a kol., 2015). Od roku 2007 provádí systematické monitorování lokality M. Golec (Golec, 2017; 2019). Od roku 2017 M. Golec se Z. Mírovou (Mírová a Golec, 2018; Mírová, 2019) provádí opětovnou revizi nálezů a jejich cílem je zapojení „staré lokality“ do současného bádání o době halštatské na Moravě v evropském, zejména severoalpském prostoru (Golec a Mírová, 2020). Oba badatelé představují Býčí skálu jako *centrální místo* s abnormální koncentrací dokladů o *elitách*, a to ve fázích Ha D1b–D3=BS1–BS3=575–450 př.n.l. (Golec, 2019; Mírová, 2019; Golec a Mírová 2020; Golec a Fojtík, 2020). Lokalita má v moravském halštatě nezastupitelné místo a bez jejího zapojení do modelu společnosti by došlo ke značné chybě. **Býčí skálu považujeme za jeskynní svatyni, polyfunkční prostor se čtyřmi skupinami praktických funkcí: 1 – návštěvní/obytnou; 2 – výrobní; 3 – pohřební/obětní; 4 – votivní/obětní.** Klíčové pro pochopení je záměrná institucionalizace místa elitami, které se zde nechávaly pohřbívat – *funkce hrobky* – a opakovaně skládaly

vóta/depoty – *funkce pokladnice*. Jejími vlastníky/uživateli byla skupina sociálních hegemonů, kteří na sebe v průběhu 6. stol. př. n. l. strhli na velkém území Moravy rozhodující politicko-ekonomickou moc, a to jak v oblasti závěrečného vývoje horákovské skupiny na Brněnsku, tak i platěnické skupiny na Prostějovsku (Golec a Mírová, 2020). Obě skupiny řadíme do východohalštatské kultury.

Jeskynní svatyně v Býčí skále zahrnuje velmi obsáhlý a složitý soubor hmotných pramenů a publikovaných informací, které můžeme rozdělit na dvě základní skupiny podle zájmu vědních oborů: 1 – humanitní; 2 – přírodovědné. V případě Býčí skály se již od dob H. Wankela až po současnost prolínají. V tomto textu se autoři zabývají skupinou druhou. Četné přírodovědné analýzy v letech 1968–2020 výrazně zasáhly do interpretací halštatské situace. Zajímá nás nyní, zda analýzy řešily všeobecné, nebo lokální okruhy, a jejich celkové zužitkování pro pochopení významu dané lokality. Článek nastiňuje nové směry a potřeby dalšího výzkumu.

Zcela zásadní pro porozumění jeskyni je její chápání jako specifického prostoru z hlediska přírodních podmínek. Ty jsou velmi odlišné u lokalit v otevřené krajině a tato specifika je nutné brát v potaz. Díky nim vzniká unikátní kulturně-přírodní nastavení lokality. Na jedné straně evidujeme frekventovaný zájem lidí o jeskyni, nyní evidentně elit, a na druhé straně pozorujeme velmi specifické přírodní podmínky, které umožnily zpomalení až zastavení degradace materiálů z organických hmot. Některé ze všeobecných okruhů – jako *sinťová vrstva* „vypálené vápno“ (**obrázek 6-2**, Wankelova vrstva C) a *černá vrstva* „uhlí“ (**obrázek 6-2**; Wankelova vrstva D) – mají od roku 1872 až po současnost zásadní dopad na interpretaci celé halštatské lokality.

Přírodovědné okruhy spojené s halštatskou svatyní v Býčí skále můžeme rozdělit následně:

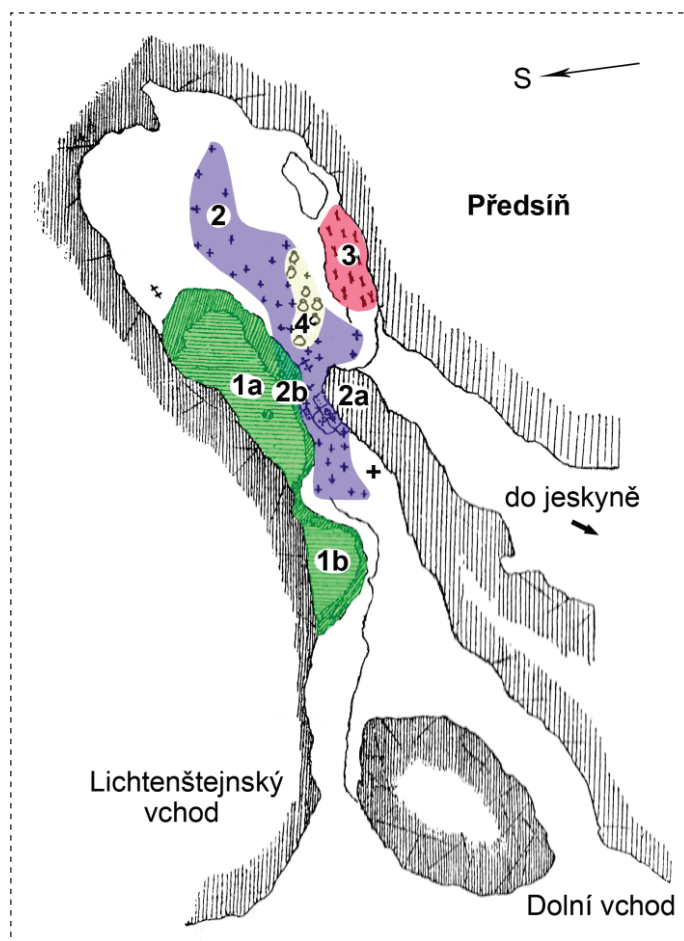
- ⇒ všeobecné okruhy X dílčí okruhy
- ⇒ okruhy související s procesy v jeskyni X okruhy související s procesy mimo jeskyni

Důležitým aspektem přírodovědných analýz je, jakým způsobem jsou využity pro celkový kulturní aspekt halštatského nálezů – jsou-li vůbec interpretovány, dále jsou-li interpretovány kriticky a správně, či zůstávají jako izolované posudky dílčích témat a jejich přínos pro celou nálezovou okolnost je minimální nebo žádný. Autoři mají za to, že teprve spolupráce přírodovědce a archeologa je nezbytným metodickým postupem. Archeolog má být aktivním (spolu)manažerem výzkumu.

6.1.1 Zájem přírodovědců v letech 1868–2019

První přírodovědnou analýzu z Předsíně Býcí skály datujeme do roku 1868, publikoval ji H. Wankel pět roků před jeho komplexním výzkumem v roce 1872 (obrázky 6-1, 6-2). Šlo o analýzu lidské kosti z Předsíně a kosti jeskynního medvěda ze Sloupské jeskyně salmovským knížecím chemikem E. Königem (Wankel, 1868). Wankelův záměr byl doložit časovou souběžnost člověka a vyhynulého zvířecího druhu, u kterého si je jistý dávným vymřením. V současnosti nás neza-ujme ani tak výsledek analýzy, ale fakt, že H. Wankel evidentně od počátku své archeologické kariéry použil přírodovědnou metodu pro datování, což je postup náležející nikoliv do pozdně romantické, ale do raně pozitivistické vědy. V desetiletí po rozsáhlém halštatském nálezu v letech 1872–1882 H. Wankel provedl chemický rozbor jednoho ze dvou zlatých náramků, který přiložil ke komentovanému soupisu své sbírky prodané v roce 1883 do Vídně (Skutil, 1972, 104). Zlatý náramek je dochovaný ve sbírce v NHM ve Vídni dodnes pouze jeden (Parzinger a kol., 1995, Taf. 13:121) a není jisté, zda jde právě o analyzovaný předmět. Nesporně **nejznámější Wankelovo přírodovědné téma, které řešily také následné generace specialistů, byl tzv. železný prsten** (Parzinger a kol., 1995, Taf. 21:228). Nálezce si jej cenil natolik, že si ho ponechal v držení až do své smrti. Později jej zdědil vnuk K. Absolon, až přešel do sbírek MZM Brno, kde se nachází dodnes. Předmětem dlouhé vědecké pře byla technologie zhotovení, zda šlo o předmět odlitý, či kovaný (Wankel, 1878; Wankel, 1879; Beck, 1880; Jareš a Absolon, 1920–1921; Píšek, 1947; Jareš, 1959; Stránský, 1973; 1985; Stránský a kol., 1973). H. Wankel dokonce nechal pro doložení svého názoru o odlitém výrobku zhotovit v blanenských železárnách kopie, čímž vlastně vstoupil na pole experimentální archeologie a předběhl vědu přibližně o sto roků. V případě prokázání odlitku by téma přesáhlo lokální zjištění a dokládalo by technologický postup známý až z novověku. K uzavření tématu došlo až v 90. letech 20. století (Stránský a kol., 1995). Žhavé téma tak nesehrálo pro interpretaci nálezů v Předsíni vůbec žádnou roli. Nález nicméně nesporně dokládá inovativní technologii výroby, která nebyla v této době ještě rozšířena. K ověření technologického postupu jiného předmětu, odlití bronzového býčka, došlo až v roce 2009 v rámci diplomové práce (Hřebíček, 2009). Nepublikovaná informace náleží do kategorie dílčích poznatků archeologií nezužitkovanou. Další přírodovědný počín H. Wankel dosáhl **pomocí mikroskopu, podařilo se detekovat zbytky nejspíše organických hmot, pravděpodobně potravin v obsazích nádob** (Wankel, 1882, 386) – „obsahovaly lehkou sušenou světlehnědou kompaktní hmotu, v níž se daly pod mikroskopem rozeznat kuličky velmi podobné škrobovým kuličkám; v mnohých ležely smolovité substance, jež, jak se zdá, pocházely ze zuhelnatělých krevních sraženin nebo zuhelnatělých částí masa“ (Wankel, 1988, 247).

Do kategorie přírodovědných analýz náleží Wankelův cenný nedokončený rukopis o halštatských lebkách z Předsíně Býčí skály. K jeho vydání došlo až v roce 2009 (Golec a kol., 2009). Autor v rukopise zevrubně popsal šest skeletů včetně původních poloh a uložených předmětů na kostrách a následně se podrobně věnoval rozboru šesti lidských lebek. Jde o dobový důkaz Wankelovy antropologické metody a dosažených výsledků.

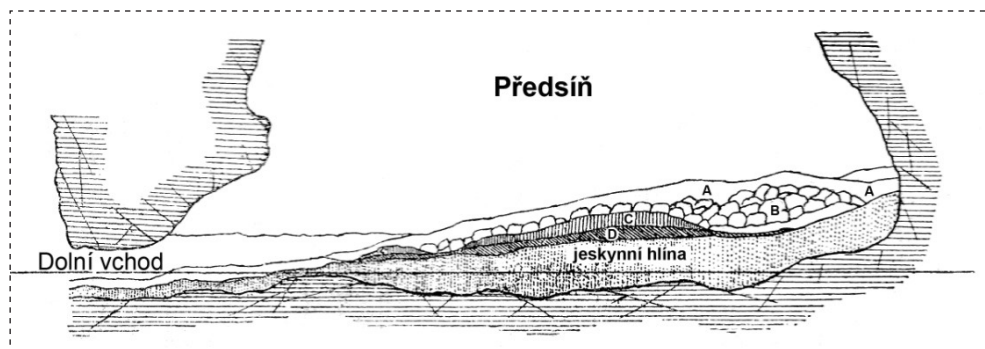


Obrázek 6-1

Mapa nálezové situace v „Předsíni“ z roku 1872 (prostor byl pravděpodobně rozčleněn a využíván různým způsobem /sloužil odlišným praktickým funkcím/): 1 – tzv. velké (1a) a malé (1b) žároviště (spíše „hnilobiště“), tj. místa uložených předmětů bez lidských skeletů, výjimkou je skelet Wankelova velmože uloženého pod/nad vozem s bronzovým pobitím korby v 1a; 2 – pohřebiště, prostor uložených samostatných artefaktů a artefaktů s lidskými skelety, popsáno také tzv. kamenné dláždění (2a) a tzv. oltář s okolní koncentrací skeletů velmožek s luxusními předměty včetně Wankelovy princezny (2b); 3 – tzv. kovárna odkazuje na řemeslnou dílnu nebo deponované zbytky po výrobě; 4 – velká koncentrace keramiky se zbytky výplní včetně lebky vyplněné prosem; ± podle popisu přibližně určené místo nálezů bronzového býčka v roce 1869 (Wankel, 1882, obr. na s. 383 a interpretace M. Golec).

Text mj. jasně dokládá pozitivistickou metodiku posudku doby vzniku v 70. letech 19. století (robustnost lebek užíval pro určení pohlaví a prořezání zubu moudrosti pro určení věku), nicméně nemohl dojít k identickým závěrům dnešní antropologie. Neznalost tohoto textu a jeho správného pochopení vedlo o sto let později ke zcela mylným představám antropologa M. Stloukala a archeologa J. Nekvasila o Wankelově postupu a jeho nepřijatelné dehonestaci coby romantika a falsifikátora (cf. Stloukal a Nekvasil, 2015). Umělé vygenerování Wankelovy badatelské nevěrohodnosti otevřelo cestu k obskurní interpretaci zříceného stropu v Předsíni (Stloukal a Nekvasil, 2015, 140), který by dle nového chronologického posudku M. Golce a Z. Mírové (Golec a Mírová, 2020) musel „padat nejméně 125 let“. Tomuto závěru otevřel dveře spekulativní fyzikálně-chemický posudek Z. Webera, založený na základní neznalosti vstupních parametrů Předsíně (Weber, 1982; 1985). Nejzajímavějším aspektem nastalé situace byla následná diskuze, kritika a obrana dehonestovaného H. Wankela ze strany dalších přírodovědců, kteří na charakteristiky Předsíně nahlíželi z pohledu přírodních oborů – geologie a speleologie (Slezák, 1985; Dvořák a Přichystal 1985; Dvořák, 1994; Přichystal, 1993; 1995a; 1995b; Přichystal a Náplava, 1995) nebo antropologie (Jelínek, 1985).

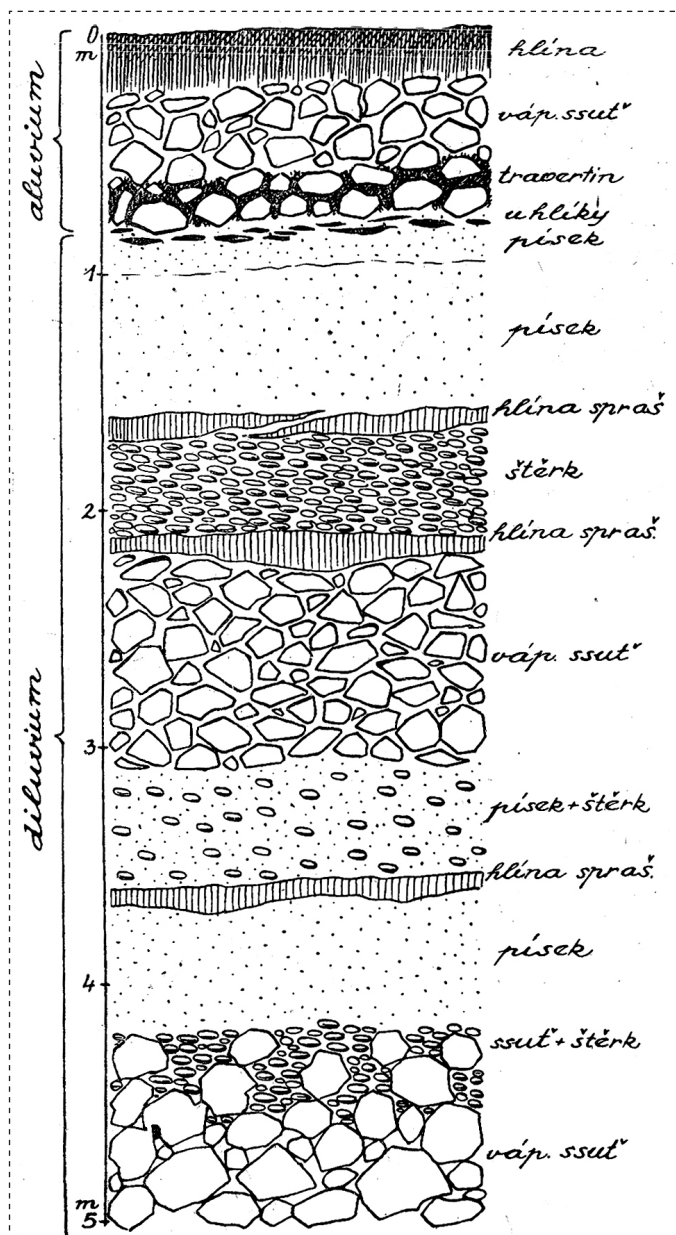
Nejvýznamnějším popudem k přírodovědným analýzám byla 90. léta 20. století a zejména pak vydání monografie o halštatské Býčí skále se souborným katalogem z roku 1995 (Parzinger a kol., 1995), s dodatky (Heinrich, 2000). V tomto období jsou rozporovány názory o „vypáleném vápnu“, které je posouzeno jako jeskynní sintr (též „nickamínek“). Poprvé téma představili J. Dvořák a A. Přichystal (Dvořák a Přichystal, 1985), dále samostatně A. Přichystal (Přichystal, 1995a; 1995b; Přichystal a Náplava, 1995). J. Dvořák k tématu poznamenal, že doba halštatská



Obrázek 6-2 Vertikální řez sedimenty Předsíně Býčí skály z roku 1872 (doložení pěti vrstev: na jeskynní hlínu bez lidských nálezů /jeskynní hlína/ nasedala vrstva rozprostřená po Předsíni označená D – obsahovala uhlíky obiloviny, halštatské artefakty, lidské a zvířecí skelety; její součástí byla také až půl metru mocná tzv. žárovíště se soustavně vrůstajícím sintrem, označená literou C; někdy později uložená mocná vrstva kamenů byla nazvána B; při povrchu jeskyně se nacházel písek se štěrkem pod písmenem A /Wankel, 1882, obr. na s. 383/).

náleží do subatlantiku s vlhkým oceanickým rázem s tvorbou sintru (Dvořák, 1994, 351). Připomeňme zde, že správné popsání sintrové vrstvy v Býčí skále učinil již H. Wankel v roce 1868 (Wankel, 1868), nicméně názor záhy změnil a **vrstvu posoudil jako „vypálené vápno“** (Wankel, 1871a, 1871b). Ovlivnil tím více než na století zásadní parametr nálezové situace. Zcela mimo zájem přírodovědných analýz však stála černá vrstva pod sintrem – **údajná vrstva „uhlí“ vzniklá snad hořením**.

Obrázek 6-3 Interpretace sedimentů pět metrů vysokého profilu z let 1937–1943 v zadní části Předsíně (v 50–80 cm od povrchu byly zachyceny pozůstatky po lidské činnosti s „uhlíky“ (Wankelova vrstva D) pod „travertinem“ – vrstvou tzv. sintru (Wankelova vrstva C). Tato situace odpovídá prvním Wankelovým údajům z roku 1872 /Pelíšek, 1949, obr. na str. 253/).



Tématu vzniku tzv. černé vrstvy se věnoval pouze J. Dvořák, který publikoval v souvislosti s analýzami sintru výsledek pyrolýzy provedené J. Urbánkem, jenž prokázal, že kosti ve vzorku neprošly velkým žářem, hoření bylo mírné za značné produkce kouře, jen tak se mohly dochovat organické hmoty (Dvořák, 1994, 351); chemická analýza V. Šimánka prokázala, že potraviny v keramických nádobách byly zbaveny těkavých látek (Dvořák, 1994, 352). Správné či chybné stanovení původu tzv. černé vrstvy má zásadní dopad na posouzení celého nálezu a v minulosti vedlo ke zcela klíčovým interpretacím výzkumného týmu J. Nekvasila, Z. Webera a M. Stloukala v 80. letech 20. století, založených na hoření a dokonce výbuchu v Předsíni (Nekvasil, 1982; Weber, 1982; Stloukal, 1982). Důležitý posudek přináší antropologie: starší rozborů a názorů (Rosensprung, 1936; Jelínek, 1959, 172–176) revidovali a komplexní analýzu provedli M. Stloukal a J. Szilvássy (Stloukal a Szilvássy, 1995), posudek opakovaně publikovali již v předchozích letech (Stloukal a Szilvássy 1980; 1984), M. Stloukal samostatně (Stloukal 1981; 1985), s komentářem J. Nekvasila (Nekvasil, 1980) a také následně M. Stloukal s J. Nekvasilem (Stloukal a Nekvasil 2015). Stloukalův rozbor je všeobecně akceptovaný. Jeho kontroverzní stránkou je jednostranný pohled na práci H. Wankela – vědce 70. let 19. století považuje za „romantika“. Nařkl jej z nepochopení souvislostí i z falšování údajů. Obranu pronesl již J. Jelínek (Jelínek, 1985), zcela nová fakta Wankelova seriózního přístupu pak vyplynula z jeho nepublikovaného rukopisu o lebkách z Býčí skály (Golec a kol., 2009). Antropologický posudek umožňuje poměrně komplexní interpretaci. Stloukalův posudek však dle našeho mínění vcelku odporuje nesmyslné interpretaci spadlého stropu, pod kterou se s J. Nekvasilem podepsal ještě v roce 2015 (Stloukal a Nekvasil, 2015). Upozorňujeme zde, že nejzajímavější fakta, která z posudku býčiskalské skupiny z Předsíně vyplývají, oba vědci pro své závěry nevyužívají. **Čtvrtinu lebek tvoří děti, což je na halštatské Moravě výjimečná situace** (děti na pohřebištích např. horákovské skupiny prakticky absentují; Čermáková a kol., 2007). Dalším faktem je téměř **vyloučení dospělých jedinců mezi 15. a 30. rokem**, což odporuje demografii pravěkých společenstev. Musel existovat mechanismus selekce jedinců deponovaných v jeskyni podle věku. Nově k těmto pozoruhodným údajům připojujeme názor, že býčiskalská skupina náležela k elitám, které se staly politicko-ekonomickými hegemony na halštatské Moravě. Předsíň Býčí skály sehrávala roli prestižní jeskynní hrobky. Ze Stloukalova posudku jasně vyplývá, že nelze odvodit opakovanou předčasnou smrt zkoumané skupiny podporující interpretaci jeskynního obětiště v pojetí H. Parzinger (Parzinger a kol., 1995). S antropologickým materiálem se pojí chemická analýza R. Bindera kompletně zelené lebky muže ve věku 30–40 let č. 2336. Experimentem bylo prokázáno, že zbarvení lebky je zapříčiněno mědí a ne nějakým umělým barvivem. Lebka byla uložena v bronzové nádobě, z jejíhož povrchu se ve vlhkém

prostředí jeskyně mohla měď uvolňovat a následně vnikat do materiálu lebky. Přítomnost mědi v nálezu lebky je tedy racionální (Stloukal a Szilvássy, 1995, 129; Stloukal a Nekvasil, 2015, 39; Wankel, 1882, 385; 1988, 247). Je vhodné rovněž podotknout, že na nálezech řady dalších lebkek jsou přítomny lokální zelené skvrny pocházející zřejmě od kovových šperků obsahujících měď. Přenos mědi z kovových objektů do kostních tkání je tedy v dlouhodobém kontextu poměrně snadný, závisí ovšem na okolním prostředí. Dalším okruhem je zoologický náhled na soubor z Býčí skály. Jako první byla zhodnocena podoba bronzové plastiky býka, která nese znaky domestikovaného zvířete (Beninger, 1932–1933; Bauer, 1969). K posouzení rozsáhlého zoologického fondu došlo později E. Pucherem (Pucher, 1995). Nálezy rozdělil na domestikovaná a divoká zvířata. Posoudil vzorky, které evidentně prošly procesem zpracování, jako je porcování nebo řezání. Určení druhů vzorků dřevin a výplet košíků z Předsíně provedl E. Opravil (Opravil, 1980; 1995). Rostlinné makrozbytky kulturních a divokých rostlin určil F. Kühn (Kühn, 1972; 1995), který dospěl k závěru, že **spektrum rostlin je natolik pestré, že pochází z více typů krajín**. První archeobotanické rozborů z halštatských nálezů v Býčí skále pochází již z předválečného období od A. Klečky a J. Skutila (Klečka a Skutil, 1937), nález česneku publikoval A. Fietz (Fietz, 1941). Následovaly práce Z. Tempíra (Tempír, 1961; 1968), podrobně od F. Kühna (Kühn, 1972; 1995), a nejnověji je lokalita uvedena u P. Kočára a D. Dreslerové (Kočár a Dreslerová, 2010, 227). F. Kühn shrnul seznam pěstovaných plodin, plevelů a zbytků stromů. Uvedl, že toto spektrum nepochází z jednoho prostředí, a dále, že roční průměrná teplota byla o 1,5 °C vyšší než dnes (tj. k roku 1995). Pylovou analýzu vzorku sintru provedla H. Svobodová (Svobodová, 1993). Uvedla, že okolí Býčí skály bylo vlivem lidské činnosti pozměněno, rozšířily se luční porosty v údolních polohách a stepní porosty na skalních stanovištích. Tento stav značně kontrastuje se současným stavem s kompaktním lesním pokryvem. Rozborů vlněných přaden/klubek nití, vlněné plsti, březových košíků, lýkových a travových rohožových výpletů a výrobků z kůry provedla A. Rast-Eicher (Rast-Eicher, 1995); plsti z Býčí skály se později věnovala také K. Grömer (Grömer, 2010). Stanovení možného původu zdrojů železné rudy u halštatských železných nálezů z okolních zdrojů poblíž Býčí skály se věnovala v magisterské diplomové práci K. Buriánková (Hrdličková) pod vedením A. Přichystala (Buriánková, 1997). Dosažené výsledky jsou zatíženy faktem, že pro porovnání s okolními ložisky železných rud neměla K. Buriánková k dispozici odpovídající vzorky rudy, které nebyly mezi železnými předměty v souboru z Býčí skály obsaženy (význam referenčních vzorků). Chemická podstata železa se tavbou a kovářským zpracováním mění. Obecnými kulturními otázkami počátků technologie výroby železa se zahrnutím poznatků o Býčí skále se opakovaně zabýval R. Pleiner (Pleiner, 1958; Pleiner a kol., 1984, 15).

6.1.2 Současnost a budoucnost lokality Býčí skála

Jeskynní lokalita Býčí skála zachovala díky svým specifickým podmínkám velké množství materiálů, které by jinak podlehly zkáze. Jeskyně zpomalila až zastavila proces jejich rozkladu. Takové lokality z doby halštatské „pod otevřeným nebem“ se již na Moravě neobjevily. Tím si uchovala svoji unikátnost. Z prostředí jiných jeskyní je fenomén zachování organického materiálu vzácně popisován, v pohřební jeskyni z doby bronzové Cova des Pas (ostrov Menorca, E) se například dochovaly relikty měkkých tkání (Prats-Muñoz a kol., 2013), v další pohřební jeskyni Cova des Carritx (ostrov Menorca, E) z téhož období pak četné relikty dřev (Whitehouse, 1997–1998) či rostlinných makrozbytků (Stika, 1999), dřeva známe i z jeskyně Aspicio (E) z doby laténské (Del Castillo a kol., 2020). Býčí skála se odlišuje dalším parametrem – využíváním elitami v dlouhém úseku 575–450 př. n. l., pohřbívání v rámci jeskynní svatyně z ní činí unikát. Sociální postavení uživatelů/vlastníků svatyně bylo předmětem nedávného výzkumu (Golec a Mírová, 2020).

Sbírkové fondy v NHM ve Vídni a MZM v Brně skýtají určité množství předmětů a odebraných vzorků ekofaktů, které stále mohou pomoci objasnit procesy, které se v době halštatské v Předsíni udály, nebo uchovaly informace postdepozicičních procesů. Mnohé *dílčí okruhy* související s jednotlivými předměty či materiály již byly hodnoceny. Mezi nimi také *všeobecné okruhy*, které hodnotí procesy uvnitř jeskyně a mají vztah k celé situaci v Předsíni. Na zásadní okruhy se zaměříme, protože jejich osvětlení je klíčové pro celkové pochopení nálezů nebo alespoň pro redukci zásadního množství nesprávných závěrů. Vymezujeme dva okruhy, z nichž *A* souvisí se specifickými *procesy v jeskyni*, náleží sem částečně i B1 – zelená lebka č. 2336 (**obrázek 6-4**, 23); černě zabarvená čelist č. 2379 (**obrázek 6-4**, 13). Mnohé předměty z Předsíně jsou stmeleny sintrem, nachází se na nich černá vrstva, jsou na nich a v nich přichyceny plodiny. Okruh *B* souvisí s *kulturními procesy mimo jeskyni*, kde byly nakonec uloženy:

A okruhy související s procesy v jeskyni

- A1 sintrová vrstva (Wankelova vrstva C)
- A2 černá vrstva či „uhlí“ pod sintrovou vrstvou (Wankelova vrstva D)
- A3 „zuhelnatělé“ předměty a plodiny
- A4 obsahy nádob

B okruhy spojené s procesy mimo jeskyni

- B1 antropologický materiál
- B2 zoologický materiál
- B3 archeobotanický materiál
- B4 dendrologie/antrakologie

- B5 palynologický materiál
- B6 petrografický materiál
- B7 železný materiál a zdroje železných rud
- B8 předměty a suroviny související s dílnou/dílnami
 - B8a železo
 - B8b bronz
 - B8c jantar
 - B8d sklo
 - B8e kost/paroh
 - B8f kámen

Okruh A – je závislý na posouzení geologických poměrů v Předsíni Býčí skály, které čerpáme ze tří archeologických výzkumů. Popisy profilů známe od H. Wankela ze 70. a 80. let 19. století (Wankel, 1968; 1871a; 1871b; 1872; 1875a; 1875b; a poslední Wankelova nepublikovaná monografie uložená v Muzeu Blanenska v Blansku). V roce 1882 H. Wankel publikoval půdorys a profil s vrstvy (obrázky 6-1 a 6-2; Wankel, 1882, obr. na str. 383). Popis profilu pochází také od M. Kříže z 90. let 19. století (Kříž, 1892). Profil sedimentů v Předsíni z období výzkumu z let 1937–1943 publikoval J. Pelíšek (obrázek 6-3; Pelíšek, 1949, obr. na str. 253). Komentář k sedimentům v Předsíni publikoval V. Peša (Peša, 2006).

Čtyři (pod)okruhy A1–A4 jsou všeobecné, mají díky unikátním parametrům při postdepozičních procesech Předsíně zásadní dopad na posouzení celé nálezové situace z let 575–450 př.n.l. (Golec, 2019, 103; Golec a Mírová, 2020). Zájem o ně je prioritní a měly by být postupně analyzovány vzorky ze všech částí. Nejlépe prozkoumán je díky J. Dvořákovi a A. Přichystalovi dílčí okruh A1. Není pochyb, že v Předsíni po uložení halštatských nálezů došlo k přirozenému růstu sintrové vrstvy, díky atmosférickým (skapovým) vodám mohutněji v mocnosti několika decimetrů při severní straně v místě tzv. velkého a malého žároviště (obrázek 6-1, obrázek 6-4, 10–11, 15; Dvořák a Přichystal, 1985; Přichystal, 1993; 1995a; 1995b). Opomenutý se zatím jeví dílčí okruh A2, kde je podezření na chybné intuitivní stanovení původu tzv. černé vrstvy, známé z mnoha prací jako „uhlí“. Pro stanovení procesů v Předsíni má však zásadní význam. Černá vrstva se zachovala na pestré skupině nálezů, jako je řada artefaktů, lidské kosti, tkaniny, plst' ad. (obrázek 6-4, 1-5, 7-14, 17-18, 20-22). Ověřuje se předpoklad, že původně šlo o přirozený jev anaerobního hnití. Díky tomuto procesu pravděpodobně došlo k uchování značného množství organických materiálů (obrázek 6-4, 1-12, 16, 22), což je jev popsán i v jiných jeskyních (viz výše). Černé zabarvení bylo na kostech popisováno jako opálení/spálení (obrázek 6-4, 13, 17), stejně tak tomu bylo i v jiných jeskyních Moravského krasu (např. jeskyně Jestřábka: Tvrdý, 2018, obr. 3),

tento názor je v dnešní době revidován. Stejně opomenutý zůstává dílčí okruh A3 pro stanovení původu „zuhelnatělého“ obilí (**obrázek 6-4, 5, 7**), které nejspíše nevzniklo hořením. Množství nových informací může přinést také dílčí okruh A4, který cílí na výplně nádob, ve kterých se dochovalo množství vzorků původních výplní. Některé z nich jsou dodnes uloženy ve vídeňském muzeu (**obrázek 6-4, 5-6, 8**). Toto téma je v současné době opět předmětem výzkumu i našeho týmu (Kučera a kol., 2020).

Okruh B – dílčí (pod)okruhy B přinášejí významné informace, které hodnotíme odděleně od okruhu A, nicméně v některých případech došlo k jejich sloučení. Jde o vzorky, které se zachovaly díky procesu vzniku sintrové (A1) a/nebo černé (A2) vrstvy. Jde o artefakty a přírodniny.

Pro jejich výzkum využíváme katalog z roku 1995 s dodatkem z roku 2000 (Parzinger a kol., 1995; dodatek Heinrich, 2000). Množství přírodních vzorků, mnohdy s fragmenty artefaktů, leží dodnes v NHM ve Vídni a MZM v Brně. Často jsou nekatalogizovány. Nejlépe popsáný je soubor antropologický (B1), jehož posudek zhotovili M. Stloukal a J. Szilvássy (Stloukal a Szilvássy, 1980; 1984; 1995; Stloukal, 1981; 1985; Stloukal a Nekvasil, 2015; Nekvasil, 1980). Posudek se bohužel stal součástí nesmyslné interpretace spadlého stropu v Předsíni (Nekvasil, 1981a; 1981b; 1982; 1985; Stloukal, 1982; 1985; Weber, 1982; 1985; Stloukal a Nekvasil, 2015), což je nutné v současnosti striktně oddělit. Významným doplňkem antropologického posudku bylo publikování Wankelova nevydaného rukopisu o lebkách z Předsíně Býčí skály v roce 2009 (Golec a kol., 2009), kde se dochoval pramen dokládající popis celých koster i s uloženými předměty na tělech. Antropologie nálezů ještě nevydala svá veškerá tajemství, doposud nebyl osvětlen mechanismus výběru věkových skupin v nálezů (1/4 dětí, dominantní absence zemřelých mezi 15 a 30 rokem). Svůj podíl na objasnění dalších aspektů mohou sehrát stronciové analýzy nebo analýzy DNA, které mohou prokázat původ či příbuznost pohřbených. Taktéž jev uložení separované a zeleně zabarvené lebky č. 2336 (**obrázek 6-4, 23**) nebyl vědecky vytěžen, separované lebky se nacházejí i v moravských halštatských kontextech mimo Býčí skálu (např. předběžně publikovaný kontext H828 ve velmožském hrobu Modřice H827–H828 – „Sádky“; Kos, 2004, obr. 2:1, 8:827–828; 2015, 21–22). Taktéž zoologický posudek (B2) osvětlil řadu nových poznatků a nastolil nové otázky (Pucher, 1995). Opětovně archeobotanický posudek (B3; Tempír, 1961; 1938; Kühn, 1995; Rast a Eicher, 1995) otevírá možnosti rekonstrukce mnoha mechanismů spojených se zemědělstvím a výrobou předmětů z organických hmot. Doposud neproběhl výzkum dendrologický/antrakologický ve vztahu k nalezeným artefaktům (B4; **obrázek 6-4o, 12, 16, 22**). Palynologický



Obrázek 6-4

Artefakty a přírodniny z Předsíně Býčí skály z Wankelova výzkumu z roku 1872 (1 – plst se splétaným řemínkem; 2 – příze; 3 – organický materiál; 4 – organický materiál; 5 – proso; 6 – materiál uložený v keramické misce se zataženým okrajem; 7 – prosem a organickým materiálem obalený železný polotovár (č. 462); 8 – obsah keramické nádoby; 9 – fragment proutěného předmětu; 10–11 – sintrový vzorek s bronzovým fragmentem korby vozu V4; 12 – bronzové kování paprsku vozu V2 se železnou objímkou a dřevěnou výplní; 13 – lidská spodní čelist č. 2379, ležela v kontextu vozu V1; 14 – kamenná bulava (č. 480); 15 – sintrem obalený bronzový spirálovitý náramek (č. 146); 16 – železné kování náboje kola V2–V4 se zbytky dřev a kostí (?); 17 – fragment lidského femuru, ležel v kontextu vozu V1 nebo V2; 18 – náhrdelník z mořských korálů; 19 – bronzový osový kolík vozu V3 s přisintrovaným mořským korálem (kolík č. 399); 20 – keramický soudkovitý pohárek (č. 669); 21 – kostěná střenka na železném noži s trnem (č. 405); 22 – železná dýka v železné pochvě se zbytky dřeva (č. 295); 23 – měděnkou z bronzové nádoby zabarvená lidská lebka č. 2336 (©NHM Wien; foto: M. Golec a Z. Mírová; pořadová čísla podle Parzinger a kol., 1995; dělení vozů dle Mírová, 2019).

posudek (B5) opět spíše otevřel další environmentální a klimatické otázky v okolí jeskyně (Svobodová, 1993). Nové výsledky přinesl posudek petrografický (B6) (Přichystal, 2017; 2019). Díky potenciálu prostorové identifikace zdrojů kamených surovin prokázal, že jeskyně ležela na křižovatce dálkových komunikací a přichází v jeskyni ukládali artefakty ze zdrojů ze všech možných směrů, včetně zdrojů přímo z jeskyně nebo blízkého okolí. Na počátku je bohužel stále výzkum původu možné těžby a zpracování železa (B7; **obrázek 6-4, 7, 16, 19**) v okolí Býčí skály (Buriánková, 1997). Prokázání tohoto tématu by mělo všeobecný dopad na halštatské téma z Býčí skály. Doposud roztržštěný okruh v dílčích směrech analýz je otázka existence dílny/dílen. Do tohoto okruhu zapadá problematika tzv. kovárny (**obrázek 6-1**), nicméně jde o okruh mnohem pestřejší. Autoři slučují lokální směry výzkumu pod jednotící okruh (B8). M. Golec a Z. Mírová považují existenci tohoto okruhu pro řešení nálezů z Předsíně za zásadní, má potenciál přerůst v okruh všeobecný (Golec a Mírová, 2020). Již v minulosti byl tento aspekt nálezů dle našeho názoru oprávněně vyzvedáván u J. Nekvasila, nicméně ten otázku existence dílny spojil s jednorázovou a navíc nelogickou událostí spadlého stropu (Nekvasil, 1982; 1985; Stloukal a Nekvasil, 2015). Elity využívaly Předsíň jako svatyni v dlouhém rozmezí nejméně 125 let (Ha D1b–D3 = BS1–BS3) pro opětovné ukládání zemřelých (funkce hrobky) a depotů/vót (funkce pokladnice). Využívaly pro svoji potřebu práci výrobců se znalostí vyšší úrovně řemesel, než která byla obvyklá v halštatské kultuře na Moravě. Tuto dílnu/dílny můžeme dle našich dosavadních znalostí pracovně nazvat – *italsko-bádensko-württembersko-moravská dílna* (přičemž nemusí jít o dílnu jako takovou, ale spíše o řemeslníky z různých oblastí). Bude záležitostí dalšího výzkumu tento model rozpracovat a dále diskutovat. Jeho obsahem je zpracování množství materiálů, ke kterým se badatelé v minulosti již různým způsobem vyjádřili – železo (B8a; Buriánková, 1997), bronz (B8b; Zeman, 2015), jantar (B8c; Chytráček a kol., 2017), sklo (B8d; Haevernick, 1979; 1995; M. Hložek v Kršová, 2017), kost (B8e; Golec, 2017; 2019; Mírová, 2019), kámen (B8f; Přichystal, 2017; 2019). Tyto dílčí okruhy se pak musí porovnávat s celou Moravou s cílem dílnu/dílny pracující pro elity v Býčí skále správně posoudit.

6.1.3 Závěr

Přírodovědné analýzy halštatských nálezů z let 575–450 př. n. l. v Předsíni Býčí skály (**obrázek 6-1**) mají zásadní dopad pro interpretaci celého nálezů. Můžeme je rozdělit na dva okruhy – *všeobecný* a okruh *dílčích* témat, které mohou přerůst v témata všeobecná, nebo naopak přinést pouze poznatky bez dopadu na celkovou interpretaci. Druhým typem dělení pramenů jsou dva okruhy rozlišené dle procesů – první souvisí se *specifickými jeskynními procesy* (A) a druhý se odkazuje

na procesy *před uložením v jeskyni* (B). Zejména zájem o okruh A je zcela zásadní. Dominují zde otázky Wankelových vrstev C a D (**obrázek 6-2, 6-3**). V rámci okruhu A dnes dobře dokážeme popsat existenci sintrové vrstvy (Wankelova vrstva C), nicméně chybou je nejspíše dodnes zatížena černá vrstva, stále chápána jako vrstva „uhlí“ (Wankelova vrstva D). Doposud nebyl popsán vznik černé zabarvených artefaktů a ekofaktů (**obrázek 6-4, 1-5, 7-14, 17-18, 20-22**). Právě černá vrstva mohla vznikat anaerobním hnitím, nikoliv hořením, což je otázka nového výzkumu. Černá vrstva uchovala velké množství předmětů a produktů z organických hmot, což lze chápat jako *formu „mumifikace“*, tedy zpomalení až zastavení degradačních procesů. Možnosti výzkumu jsou široké, doposud lze pracovat ještě se vzorky získanými předchozími výzkumy, ale ty mají své omezené možnosti a pro další pokrok bude nutné získat vzorky nové revizním výzkumem v Předsíni Býčí skály. K tomuto počínu směřovala již Nadace Býčí skála v roce 1994 pod vedením V. Podborského a A. Přichystala, ale k výzkumu nakonec nedošlo. Před samotným výzkumem je však klíčové uvést, jaké možnosti analýzy vzorků přinášejí a jaké *výzkumné otázky* se s nimi pojí. V tomto textu shrnujeme celou dosavadní problematiku přírodovědných analýz provedených v Býčí skále a vytyčujeme nové směry výzkumu. Jejich vyhodnocení však musí zahrnovat: 1 – znalost všech předchozích informací o lokalitě; 2 – odůvodněnou kritiku předchozích postupů a stavby interpretací; a 3 – kritické posouzení nových faktů. Analýzy však musí již předem zapadat do uceleného výzkumného záměru zahrnujícího spojení humanitních a přírodovědných oborů.³⁸

³⁸ Zpracování kapitoly bylo umožněno díky účelové podpoře: Fond podpory vědecké činnosti UPOL č. SPP 452101601/30.

Literatura

- Bauer K., Zoologische Stellungnahme zur Stierbronze von Býčí skála. In: Angeli, W., Hallstatt und Byčí skála, *Annalen des Naturhistorischen Museums Wien* 1969, 73, 401–416 (407–408).
- Beck L., Antwort auf die Replik des Herrn Dr. Wankel, *Archiv für Anthropologie* XII, 92–93. Braunschweig 1880.
- Beninger E., Der Bronzestier aus der Býčí skála-Höhle und die Urrindplastiken von Hallstatt, *Jahrbuch für prähistorische und ethnographische Kunst*, 1932–1933, 8, 80–99.
- Buriánková K., *Ověření nejstarší těžby a zpracování železných rud v ČR (okolí Býčí skály v Moravském krasu)*. Nepublikovaný rkp. magisterské diplomové práce Katedry geologie a paleontologie PřF MU Brno 1997.
- Del Castillo R.B., Oriol López-Bultó O., Cuba M., Wooden technology during the Iron Age: The Aspicio Cave (Ruesga, North Spain), *Oxford J. Archaeol.* 2020, 39, 89–106.
- Čermáková E., Golec M., Trubačová T., Tvrdý Z., Kam zmizely horákovské děti?, *Študijné zvesti Archeologického ústavu Slovenskej akadémie vied* 2007, 42, 23–56.
- Dvořák J., Obětiště lidu horákovské kultury (halštát) v jeskyni Býčí skála u Adamova, *Vlastivědný věstník moravský* 1994, 46/4, 349–353.
- Dvořák J., Přichystal A., Je možné vysvětlení halštatského nálezu v Býčí skále pomoci katastrofy? In: Němec, C., Šalé, F. (eds.), *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko, 1985, 72–77.
- Fietz A., Bronzetzeitliche Pflanzenreste aus der Stierfelsenhöhle bei Brünn, *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn* 1941, 72, 71–75.
- Golec M., The Phenomenon of the Býčí Skála Cave. Landscape, Cave and Mankind, *Archaeologica Olomucensia I*. Olomouc 2017.
- Golec M., *Fenoménu Býčí skála. Krajina, jeskyně a člověk*. Praha 2019.
- Golec M., Fojtík P., Centrum východohalštatské kultury na střední Moravě, *Archaeologica Olomucensia – Tomus V*. Olomouc 2020.
- Golec M., Mírová Z., Hallstatt Period in Moravia. Elites, centralisation and social model in Ha D1–D3. In: Chvojka O., Chytráček M., Gruber H., Hustý L., Michálek J., Sandner R., Schmotz K., Traxler S. (eds.), *Fines Transire* 29/2020. Rahden/Westf 2020.
- Golec M., Grolich V., Tvrdý Z., Urban J., Lebky z Býčí skály, *Acta Musei Moraviae – Scientiae sociales XCIV*, 2009, 163–200.
- Grömer K., *Prähistorische Textilkunst in Mitteleuropa*. Wien 2010.
- Haevernick T. E., Die Glasperlen der Býčí skála-Höhle, *Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien* 1979, 109, 113–119.
- Haevernick T. E., Die Glasperlen. In: Parzinger, H., Nekvasil, J., Barth, F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54. Mainz am Rhein 1995, 93–97.
- Heinrich A., Ergänzung zum Fund aus der Býčí skála-Höhle, *Archäologisches Korrespondenzblatt* 2000, 30, 61–64.
- Hřebíček L., *Ověřování původních technologií pro výrobu uměleckých odličků*. Nepublikovaný rkp. magisterské diplomové práce FSI VUT v Brně, 2008.
- Chytráček M., Golec M., Chvojka O., Metlička M., Michálek J., Novotná M., Frolíková D., Jantar starší doby

- železné a průběh jantarové stezky ve střední Evropě, *Památky archeologické* CVIII, 2017, 121–256
- Jareš V., K otázce prehistorického prstenu z Býčí skály, *Vlastivědné zprávy z Adamova a okolí* 1959, III/2, 8–10.
- Jareš V., Absolon K., Praehistorický železný prsten z Býčí skály na Moravě, *Časopis Moravského musea zemského* 1920–1921, XVII–XIX, 314–336.
- Jelínek J., Anthropologická pozorování z výzkumů na Cezevách u Blučiny, okr. Židlochovice, *Časopis Moravského musea* 1954, XXXIX, 217–231.
- Jelínek J., Anthropologie der Bronzezeit in Mähren. Anthropos – studie z oborů antropologie, paleontologie a kvartérní geologie 10. Brno, 1959.
- Jelínek J., Interpretace halštatského obětiště z Býčí skály a otázka osobnosti J. Wankela. In: Němec C., Šalé F. (eds.), *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko 1985, 65–69.
- Klečka A., Skutil J., Moravské příspěvky k výzkumu pravěkých obilnin, *Věstník československého zemědělského musea* 1937, 1, 19–25.
- Kočár P., Dreslerová D., Archeobotanické nálezy pěstovaných rostlin v pravěku České republiky. *Památky archeologické* CI, 2010, 203–242.
- Kos P., Pohřby žen z doby halštatské v Modřicích u Brna. In: Chvojka, O. (ed.), *Popelníková pole a doba halštatská*. Příspěvky z VIII. konference, České Budějovice 22.–24. 9. 2004, Archeologické výzkumy v jižních Čechách, Supplementum 1. České Budějovice 2004, 271–292.
- Kos P., *Halštatská nekropole Modřice 2. Hroby z tratí „Sádky“ a „Rybínky“*. Nepublikovaný rkp. ÚAPP Brno 2015.
- Kršová M., *Skleněné korálky z pohřebišť doby halštatské na Moravě*. Nepublikovaný rkp. magisterské práce ÚAM FF MU Brno 2017.
- Kříž, M. Die Höhlen in den mährischen Devonkalken und ihre Vorzeit II., *Jahrbuch der k. k. geologischen Reichsanstalt* 1892, XLII, 463–626.
- Kučera L., Bednář P., Golec M., Fojtík P., Chemické analýzy prosa a tuku z doby halštatské na Moravě. In: Golec M., Fojtík P., Centrum východohalštatské kultury na střední Moravě. *Archaeologica Olomucensia – Tomus V.*, Olomouc 2020, 178–183.
- Kühn F. Obilí z halštatské doby z Býčí skály u Adamova, *Vědecké práce Zemědělského musea* 1972, 12, 9–22.
- Kühn F., Die Pflanzenreste. In: Parzinger, H., Nekvasil, J., Barth, F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54. Mainz am Rhein 1995, 160–166.
- Mírová Z., The horse in the Bronze and Iron Ages in Moravia. *Archaeologica Olomucensia – Tomus III.* Olomouc 2019.
- Mírová Z., Golec M., Hallstatt Magnate Graves from Brno-Holásky 1 and 2 in Central European Context. *Archaeologiae Regionalis Fontes* 13. Olomouc 2018.
- Nekvasil J., Několik poznámek k antropologickému rozboru, *Zprávy antropologické společnosti při ČSAV* 1980, XXXIII/1, 7–8.
- Nekvasil J., Eine neue Betrachtung der Funde aus der Býčí skála-Höhle, *Anthropologie* 1981a, XIX/2, 107–110.
- Nekvasil J., Revisions od Wankels Observations in the Cave of Býčí skála, cadastral territory of Habrůvka, district of Blansko: In: Nouvelles archéologiques dans la République Socialiste Tcheque. X. Congr. Internat. Sciences Préhist. et Protohist, Mexico 1981. Praha, Brno 1981b, 75–78.
- Nekvasil J., Pravda o Býčí skále II, *ABC* 1982, 27/2, 28–29.

- Němec C., Šalé F., (eds.) *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko 1985.
- Oliva M., Golec M., Kratochvíl R., Kostrhun P., Jeskyně Býčí skála ve svých dějích a pradějích. *Anthropos. Studies in Anthropology, Palaeoethnology, Palaeontology and Quaternary Geology* 39, Brno 2015.
- Oprail E., Dřeviny z moravských archeologických nálezů II, *Zprávy Krajského vlastivědného muzea v Olomouci* 1980, 205, 23–29.
- Oprail E., Die Holzreste. In: Parzinger H., Nekvasil J., Barth, F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54, 167, Mainz am Rhein 1995.
- Parzinger H., Nekvasil J., Barth F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen – Band 54. Mainz am Rhein 1995.
- Pelíšek J., K charakteristice jeskynních sedimentů Býčí skály v Moravském krasu, *Československý kras* 1949, 2, 249–254.
- Peša V., Jižní boční síň a halštatské využívání Býčí skály v Moravském krasu, *Archeologické rozhledy* 2006, LVIII, 427–446.
- Píšek F., Is the Prehistoric Ring from the Bull's Cave made of Cast-Iron? *Hutnické listy* 1947, 2/1, 9–10.
- Pleiner R., Základy slovanského železářského hutnictví v českých zemích, Vývoj přímé výroby železa z rud od doby halštatské do 12. věku. *Monumenta archaeologica* 6. Praha 1958.
- Pleiner R., Kořán J., Kučera M., Vozár J., *Dějiny hutnictví železa v Československu 1. Od nejstarších dob do průmyslové revoluce*. Praha 1984.
- Prats-Muñoz G., Galtés I., Armentano N., Cases S., Pedro Luis Fernández P. L., Malgosa A., Human soft tissue preservation in the Cova des Pas site (Minorca Bronze Age), *J. Archaeol. Sci.* 2013, 40, 4701–4710.
- Přichystal A., Pohled geologa na nález z doby halštatské v Býčí skále, *Speleofórum* 1993, 12, 73–74.
- Přichystal A., Der Höhlensinter. In: Parzinger H., Nekvasil J., Barth F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54. Mainz am Rhein 1995a, 174–178.
- Přichystal A., Geschichte des Fundes aus der Býčí skála-Höhle und die neuesten Erkenntnisse, *Pravěk – nová řada* 1995b, 5, 11–24.
- Přichystal A., *Náplava M., Záhada Býčí skály aneb Jeskyně plná otazníků*. Třebíč 1995.
- Přichystal A., Stone Artefacts from Býčí Skála Cave. In: Golec, M. 2017., The Phenomenon of the Býčí Skála Cave. Landscape, Cave and Mankind. *Archaeologica Olomucensia – Tomus I.* Olomouc 2017, 98–100.
- Přichystal A., Kamenné artefakty Býčí skály. In: Golec, M. 2019, *Fenomén Býčí skály. Krajina, jeskyně a člověk*. Praha 2019, 132–136.
- Pucher E., Die Tierknochen. In: Parzinger H., Nekvasil J., Barth F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54. Mainz am Rhein 1995, 146–160.
- Rast-Eicher A., Die Filze und Geflechte. In: Parzinger H., Nekvasil J., Barth F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54. Mainz am Rhein 1995, 167–174.
- Rosensprung L. M., Die menschlichen Skelettreste der Bejčí skála-Höhle, Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien 1936, LXVI, 338–442.
- Slezák L., Předstín jeskyně Býčí skála očima geologa a speleologa. In: Němec, C. – Šalé, F. (eds.), *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko 1985, 37–40.

- Stika H. P., Los macrorestos botánicos de la Cova des Càrritx. In: Lull V., Micó R., Rihuete-Herraday C., Risch R. (eds.), *Ideología y sociedad en la prehistoria de Menorca – La Cova des Càrritx y la Cova des Musol*. Barcelona 1999, 521–531.
- Skutil J., Wanklova Býčiskalská nálezová zpráva z roku 1872 v přepise Josefa Skutila z roku 1933, *Vlastivědná ročenka Okresního archivu Blansko* 1972, 98–104.
- Stloukal M., Anthropologische Funde aus der Býčí skála-Höhle. *Antropologie* 1981, XIX/2, 111–114.
- Stloukal M., Pravda o Býčí skále I, *ABC* 1982, 27/1, 28–29.
- Stloukal M., Antropologický rozbor kosterních pozůstatků z Býčí skály. In: Němec C., Šalé F. (eds.), *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko 1985, 27–36.
- Stloukal M., Nekvasil J., *Věčné tajemství Býčí skály*. Praha 2015.
- Stloukal M., Szilvássy J., Výzkum lidských koster z jeskyně Býčí skála, uložených ve vídeňském muzeu, *Zprávy antropologické společnosti při ČSAV* 1980, XXXIII/1, 1–7.
- Stloukal M., Szilvássy J., Sammlung Wankel in der anthropologischen Abteilung des Naturhistorischen Museum in Wien, *Anthropologie* 1984, 22/1, 51–71.
- Stloukal M., Szilvássy J., Die menschlichen Skelettreste. In: Parzinger H., Nekvasil J., Barth F. E., Die Býčí skála-Höhle. Ein hallstattzeitlicher Höhlenopferplatz in Mähren. Römisch-Germanische Forschungen 54. Mainz am Rhein 1995, 128–145.
- Stránský K., Mystérium halštatského prstenu z jeskyně Býčí skála, *Sborník vlastivědného musea v Blansku* 1973, 5, 87–94.
- Stránský K., Novodobá historie železného prstenu z Býčí skály. In: Němec C., Šalé F. (eds.), *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko 1985, 45–54.
- Stránský K., Rek A., Münsterová E., Ptáček L., What the Prehistoric Ring from the Bull's Rock Cave in Moravia was of? *Slévárenství* 1973, 21/9, 360–366.
- Stránský K., Rek A., Ustohal V., The Metallography of the Prehistoric Ring from the „Bull's Rock“ Cave, *Pravěk – nová řada* 1995, 5, 51–56.
- Svobodová H., Pylová analýza vzorku vypáleného vápna z jeskyně Býčí skála v Moravském krasu, *Acta Musei Moraviae – Scientiae sociales* 1993, LXXVIII, 87–90.
- Tempír Z., Archeologické nálezy obilnin na území Československa, *Vědecké práce ústředí pro studium vývoje v zemědělství ČSAZV – Zemědělské muzeum v Praze* 1961, 157–200.
- Tempír Z., Archeologické nálezy zemědělských rostlin a plevelů v Čechách a na Moravě, *Vědecké práce Československého zemědělského muzea* 1968, 15–87.
- Tvrď Z., Lidské kosti s antropogenními zásahy z jeskyně Jestřábí skála v Moravském krasu, *Acta Musei Moraviae – Scientiae sociales* 2018, CI, 3–13.
- Wankel H., Schreiben an Herrn Hofrat und Prof. Hyrtl, Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, mathematisch-naturwissenschaftliche Classe, Band 58, Abteilung, 1868, 1, 7–9.
- Wankel H., Der Menschenknochenfund in der Býčí skála-Höhle, *Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien* 1871a, 1, 101–105.
- Wankel H., Prähistorische Alterthümer in den mährischen Höhlen, *Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien I* 1871b, 266–281, 309–314, 329–343.
- Wankel H., Kleinere Mittheilungen. II., *Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien II* 1872, 307–312.
- Wankel H., Die Höhle bei Býčí skála, *Tageblatt der 48. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Graz* 1875a, 5, 169–175.
- Wankel H., Über die Gleichzeitigkeit der Menschen mit dem Mammuth und über des Fundes in der Býčí

- skála-Höhle in Mähren, *Tageblatt der 48. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Graz* 1875b, 6, 190–192.
- Wankel H., Prähistorische Eisenschmeltz- und Schmiedestätten in Mähren, *Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien* 1878, VIII, 289–324.
- Wankel H., Replik auf das Referat des Herrn Dr. Beck in Biebrich über meine Schrift Prähistorische Eisenschmeltz- und Schmiedestätten in Mähren, *Archiv für Anthropologie* 1879, XII, 270–271. Braunschweig.
- Wankel H., *Bilder aus der Mährischen Schweiz und ihrer Vergangenheit*. Wien 1882.
- Wankel J., *Obrazy z Moravského Švýcarska a jeho minulosti*. Brno, Blansko 1988.
- Weber Z., *Pravda o Býčí skále III*, ABC 1982, 27/3, 28–29.
- Weber Z., Fyzikální aspekty nálezu z doby halštatské v Předsíni jeskyně Býčí skála u Habrůvky, okres Blansko. In: Němec C., Šalé F. (eds.), *Wankelův nález v Býčí skále ve světle nejnovějších objevů*. Blansko 1985, 41–44.
- Whitehouse R. D., Sa Cova d'es Carritx: a new prehistoric cult cave on Menorca. *Archaeol. Int.* 1997–1998, 20–22.
- Zeman J., *Doklady metalurgie bronzu na halštatských lokalitách na Moravě*. Nepublikovaný rkp. bakalářské diplomové práce ÚAM FF MU Brno 2011.

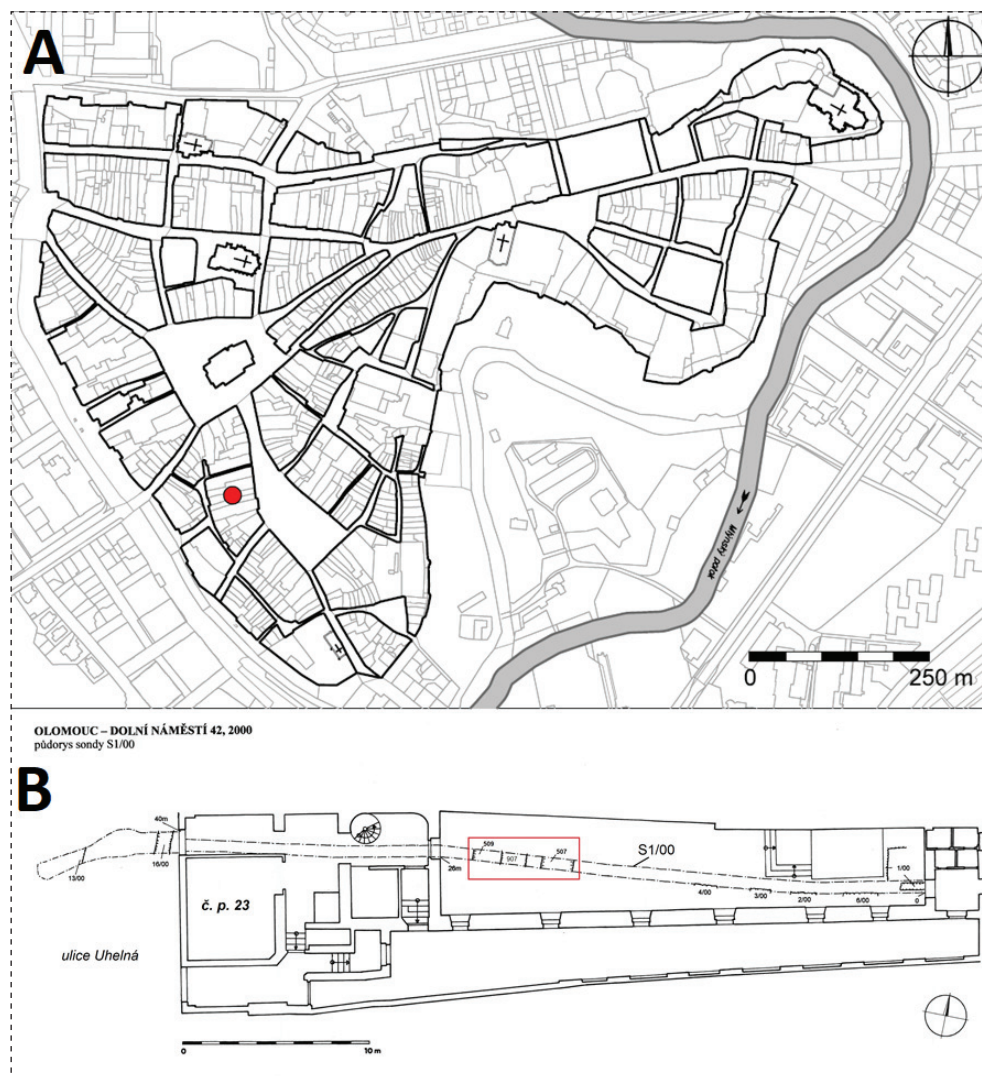
6.2 Středověké nálezy a analýza obsahu středověkých nádob

Pavel Šlězár, Hana Dehnerová, Petr Bednář, Lukáš Kučera

Středověké nálezy jsou často velmi bohaté, zejména v městských lokalitách. Zajímavým objektem, který byl nalezen při záchranném archeologickém výzkumu v Olomouci na Dolním náměstí v roce 2000 (17. května až 29. června), je **hmota uvnitř keramické nádoby ze 14. století** (vzorek s označením 19/00-15/12). Nádobu byla nalezena v odpadní jámě v horizontu vrcholně středověkého osídlení. Jde o hrnec s výškou 130 mm, průměrem okraje 105 mm a průměrem výduti 110 mm. Výzkum byl proveden olomouckým pracovištěm Národního památkového ústavu (tehdy Památkového ústavu v Olomouci) a byl vyvolaný realizací nové přípojky kanalizace v suterénu domu č.p. 23 na Dolním náměstí v Olomouci (č.o. 42, parc. č. st. 446, k. ú. Olomouc-město) s napojením na hlavní stoku v Uhelné ulici (**obrázek 6-5 a 6-6**).

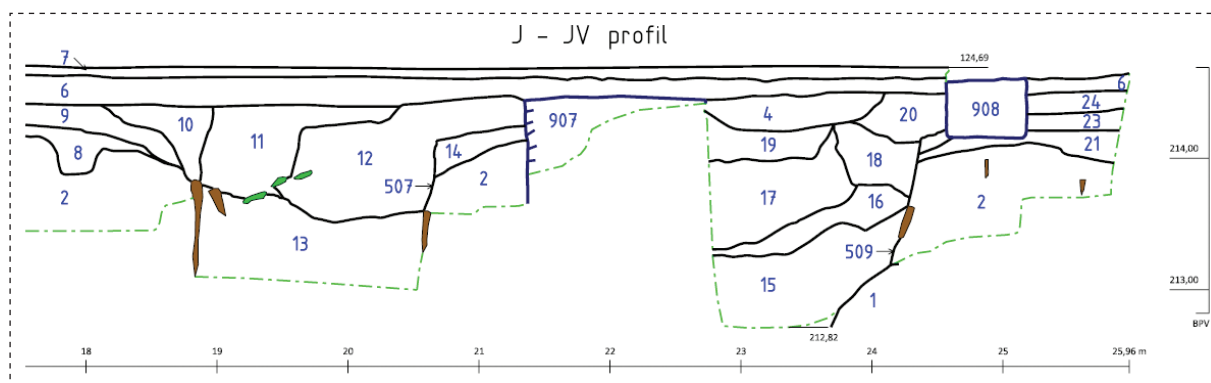
Lokalita se nachází v jižní části historického jádra Olomouce, samotný dům č.p. 23 stojí v jihozápadní frontě Dolního náměstí, zadním traktem sahá do ulice Uhelné. Výkopové práce v suterénu budovy probíhaly za umělého osvětlení a průsaku spodní vody. Samotný liniový výkop byl pracovně rozdělen na úseky o délce 1 m se začátkem na východním konci; celková délka dosáhla 48 m, šířka se

v suterénu pohybovala mezi 0,6–0,7 m. Hloubka výkopu klesala z 0,8 m na začátku u bodu 0 až na 2,3 m na čtyřicátém metru. Poměrně jednoduchý sled uloženin narušily v úseku 18,8 m až 24,4 m dva zahluobené odpadní objekty, z nichž východní byl interpretován jako suchý záchod (objekt 507) a západnější jako odpadní jímka (objekt 509). Přesné rozměry jímky nebylo možné zjistit. Na východní straně ji porušovalo kamenné zdivo, nicméně minimální šířka dosáhla 1,6 m; při západní stěně objektu byly zachovány zbytky bednění. Od hloubky 1,5 m stěnu objektu, mírně svažitou, tvořil jíl, zachycený také v dalších úsecích výkopu. Přesto ale ani



Obrázek 6-5 Plánek Olomouce s vyznačeným místem výzkumu (A) a půdorys sondy s umístěním jímek (B)

Keramická nádoba s analyzovaným vzorkem (19/00-15/12) byla vyzvednuta z hloubky 1,7–1,95 m, z vrstvy 15, jejíž horní hranice se nacházela v úrovni 1,1–1,4 m. Jednalo se o uhlou, šedočernou strukturovanou organogenní uloženinu s fragmenty dřev. **Kromě keramiky obsahovala dřevěné artefakty** (tři rekonstruované dýhové misky, jednotlivé dýhy, vařečku, louč, kolíky, zlomky prkének i jinak opracovaných dřevek), zlomky gotického skla, útržky kůže se stopami sešívání, zvířecí kosti, fragmenty mazanice, zbytky provazu, uhlíky. Pokud bylo možno určit, palivové dříví/dřevěné uhlí (uhlíky) pocházelo zejména z buku, dubu, javoru a břízy; konstrukční dřevo naopak z jedle a smrku (vodorovné konstrukční prvky a řezivo) a topolu/vrby a lísky (pletené konstrukce) (Kočárová a Kočár, 2009). **Mezi hmotnými nálezy z odpadní jímky lze dále vyzvednout zlomek luxusní misky s kolkovanou výzdobou nebo dřevěný soustružený šálek.** V následujících kapitolách jsou blíže popsány širší historické souvislosti vztahující se k nálezu (kap. 6.2.1) a postup chemické analýzy materiálu nalezeného v nádobě, objek-



Obrázek 6-6 Řez situací s latrínou (507) a odpadní jímkou (509) (507 – suchý záchod fošnové bedněné konstrukce; 10–12 – zánikový horizont, vrstvy s uhlíky, zlomky dřev a skvrnkami jílu, v k. 11 navíc četně fragmenty mazanice; 13 – výplň záchodové jámy, obsahující četné organické zbytky, převážně zbytky dřev, mechy, pecky apod., dochovány zbytky dřevěného bednění; 14. stol.; 509 – odpadní jímka; vrstvy 15–19 velmi podobného charakteru – organogenní uloženina hnědé až šedočerné barvy se skvrnkami uhlíků, dřevek, jílu a organických zbytků; 2. pol. 13. až průběh 14. století; 907 – smíšené zdvo pojené maltou, založené na dřevěných pilotech; novověk; 908 – recentní cihlový kanál; 1 – jílové podloží; 2 – tmavě šedá jílovitá hlína s ojedinělými fragmenty dřev; pravěk a raný středověk; 6 – kyprá písčitá hlína s maltovým prachem a zlomky cihel; recent; 7 – betonová podlaha; Sídlíštní vrstvy vrcholného středověku: 9 – šedohnědá jílovitá hlína s uhlíky a fragmenty dřeva, 8 – tmavá šedá jílovitá hlína, 14 – žlutý jíl, 4 – žlutohnědý jíl, 20 – šedohnědá hlína se skvrnkami uhlíků a organických zbytků, 21 – hnědošedá hlína prokládaná jílem, 23 – uhlíkatý prach, 24 – šedá jílovitá hlína se skvrnkami uhlíků, dřeva a malými kamínky, hnědá – dřevo, zelená – kámen)

tu morfologicky připomínajícího pecku, přischnutého k vnitřní stěně nádoby, č. 19/00-15/12 (kap. 6.2.2).

6.2.1 Podrobnější popis historických souvislostí nálezů

Odpadní jímky byly spolu se záchody ukazatelem úrovně středověké hygieny. V Olomouci lze datovat nejstarší odpadní jímky do doby sklonku 13. století, jejich podoba se v mírných obměnách udržuje až do 18. století. Bývaly situovány v zadních částech parcel, na jejich množství měl vliv i počet obyvatel domu, někdy byly používány i pro více domů společně (při archeologických výzkumech bylo na některých parcelách zjištěno jímek více, na některých žádná). Jímky či záchody podle dobových předpisů nesměly být umístěny u struh, v blízkosti studní, od zdi sousední parcely měly být vzdáleny minimálně 1 m a nesměly být pod okny souseda.

Jímku tvořila buď jen prostá jáma, do které se vyhazoval odpad (plocha mezi 1 až 4 m²), nebo byla podle charakteru podloží prováděna úprava stěn. U jam čtvercového nebo lichoběžníkovitého půdorysu se úprava podobala studním, fošnová bedněná konstrukce byla vně izolována jílem. Bednění mohly nahradit na sebe postavené sudy. Jímky vyzděné (kámen, cihly) jsou častější až od novověku. Hloubka se řídila zpravidla úrovní spodní vody, mohla dosáhnout až 10 m, kvůli snadnějšímu čištění to však bývalo většinou méně.

Čištění jímek, stok i veřejný úklid patřily mezi ponižující práce, mohly být udíleny za trest, běžně je prováděl kat a jeho pomocníci. Archeologický výzkum středověkých odpadních jam patří k těm, které přináší nejčetnější hmotné nálezy a díky mezioborové spolupráci je možno získat široký obraz o běžném životě uživatelů jímek. Kromě častých nálezů keramiky pochází z jímek také předměty z organických materiálů (dřevo, kůže), které se jinak špatně dochovávají. Ve specifickém prostředí bez přístupu vzduchu se zachovaly také zbytky mechů a útržků textilu používané k očištění nebo zbytky potravy – odpady z kuchyně i jídelny – zvířecí kosti, škeble, rybí šupiny, semena, skořápky ořechů, vajec, které svědčí o jídelníčku lidí i rozšíření rostlinných i živočišných druhů. Obsahy jímek také vypovídají o onemocněních (výskyt parazitů).

Olomouc je z hlediska archeologie unikátní tím, že v prostoru dnešního města je doloženo nepřetržité osídlení od poloviny 7. století až do současnosti. Nejstarší časně slovanská osada s nálezy keramiky pražského typu se rozkládala na severním úpatí Michalského vrchu, v dnešní Pekařské ulici. Na sklonku velkomoravského období byl na Olomouckém kopci vybudován raně středověký hrad s akropolí na Václavském návrší a předhradím v prostoru Petrského návrší. Rozkvět osídlení nastal v Olomouci v 1. polovině 10. století, tedy po zániku Velké Moravy, kdy se po opuštění velkých jihomoravských aglomerací stala Olomouc novým centrem

Moravy s návazností na správní a církevní struktury Velké Moravy. Poprvé olomoucký hrad zmiňuje v písemných pramenech kronikář Kosmas k roku 1055. V 11. století se Olomouc stává sídlem olomouckých přemyslovských knížat. Ti také zakládají roku 1078 klášter Hradisko, které se stává rodovým pohřebištěm olomouckých Přemyslovců. Významnou událostí bylo znovuoobnovení moravského biskupství u kostela sv. Petra roku 1063 (Bláha, 2001, 129, 137; Šlězár, 2018).

Nejpozději v poslední třetině 10. století vzniká v podhradí olomouckého hradu na severovýchodním úpatí Michalského vrchu (Pekařská ulice) řemeslnicko-kupecká osada s tržištěm, která se časem rozrůstá a spojuje s pozdější osadou u kostela sv. Mořice (Bláha, 2001, 129, 137; Šlězár, 2018). V 11. a 12. století postupně v podhradí vznikají další malé sídelní útvary, např. Michalská osada, Blažejská osada, které se staly základem velkého městského organismu 13. věku (Bistrický, 2009, 103; Šlězár, 2018).

K lokaci institucionálního vrcholně středověkého města došlo někdy mezi lety 1239–1246 (Kohout, 2009, 140–141). Byl vyměřen veřejný prostor (náměstí, ulice) i jednotlivá městiště, došlo k nivelizačním terénním úpravám a zařazení pozemků do daňové stupnice. Archeologicky jsou doloženy úpravy terénu – zpevnění povrchu říčním pískem a oblázky – v prostoru dnešního Dolního i Horního náměstí. V Olomouci vyměření města navázalo na starší stav využívání plochy. Parcely kolem náměstí byly nejdražším místem ve vyměřeném městě. Zvláštní charakter měla tzv. Krámská ulice, tvořící přechod mezi Dolním a Horním náměstím (ve 14. stol. označován „mezi krámy“), neboť v domech kolem východního rohu Dolního a Horního náměstí sídlili kramáři a kroječi sukna, kteří patřili k nejbohatším měšťanům (Kohout, 2009, 139–140). Zatímco Horní náměstí soustředilo správní funkce, na náměstí Dolním byly zastoupeny funkce, které souvisely se základními potřebami života města – potravinářská řemesla, textilní řemesla, výroba užitkových předmětů, obchod (Bláhová, 1993, 50). Na městské domy řemeslníků (řezníci s masnými krámy, soukeníci, hrnčíři) v jihozápadním prostoru Dolního náměstí navazovalo zázemí při zadních stranách parcel a na přilehlých plochách (porážka dobytka, sklad dříví – Kutelhof, Romhof) (Bláhová, 1993, 50). Na počátku 16. stol. se stavebně uzavřela řada městských domů obklopujících náměstí a v zásadě je ukončena urbanizace. Tehdy byly nově řešeny i hygienické poměry, dosud otevřené stoky odvádějící odpad do řeky Moravy byly překrývány a náměstí bylo vydlážděno v celé ploše. Vrcholu stavebního vývoje dosáhl prostor Dolního náměstí při obnově po třicetileté válce na přelomu 17. a 18. století, kdy vznikají i dominanty barokních kašen a Mariánského sloupu (Bláhová, 1993, 51).

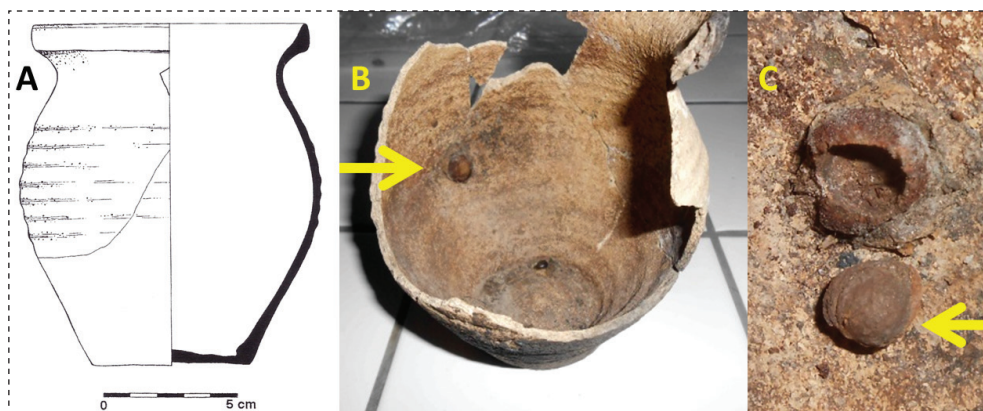
Zástavba jednotlivých parcel byla postupná, v závislosti na dispozičním vývoji městského domu i konstrukčního materiálu. Doložena je pestrost stavebních technik, půdorysných dispozic domů i zástavby městišť (Bláha, 1999, 210). Až

do poloviny 14. století převažovala dřevěná zástavba, později měšťané staví své domy více z kamene a cihel. Vývoj dispozice městského domu v Olomouci byl ukončen na přelomu 15. a 16. století (Bláhová, 1993, 51).

6.2.2 Chemická analýza materiálu nalezeného v keramické nádobě

Typickým problémem chemické analýzy archeologických nálezů je fakt, že látky původně přítomné ve vzorku jsou do značné míry rozloženy a/nebo přeměněny na látky jiné. **Pro získání relevantní informace jsou nezbytné dva předpoklady: i.) znalost procesů probíhajících při degradaci/přeměně původně přítomných látek a ii.) dostupnost vysoce citlivé analytické techniky, která umožní analýzu i velmi malých koncentrací ve vzorku.** První předpoklad bude jen částečně splnitelný a jsme tak odkázáni na detailní studium souvislostí mezi různými objekty a materiály a na studie modelující procesy přeměn látek – na postupy umělého staření (vycházející obvykle z předpokladu, že zvýšená teplota, působení záření a další uplatněné vlivy nahradí působení dlouhého času). Druhý předpoklad je s ohledem na velký rozvoj instrumentální chemické analýzy snadněji splnitelný. Zejména spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií (GC/MS a LC/MS), které je podrobněji popsáno v kapitolách 3.2.2.1 a 3.2.2.2, tento předpoklad splňuje velmi dobře. Obě tyto techniky byly použity pro analýzu materiálu nalezeného v diskutované keramické nádobě (Bednář a kol., 2018). Předmětem analýzy byl malý objekt přišchnutý ke stěně nádoby (**obrázek 6-7**). Podle tvaru předmětu by mohlo jít o vysušený malý ovocný plod (například třešeň).

Příprava vzorku k analýze: Vnitřní část (vizuálně jádro nebo pecka) byla opatrně oddělena od okolní materie a z části, která byla plně skryta v okolní materii,



Obrázek 6-7 Objekt přišchnutý k vnitřní stěně nádoby (19/00-15/12) (A – kresba nádoby, B – keramická nádoba, C – detail objektu; objekt označen šipkami)

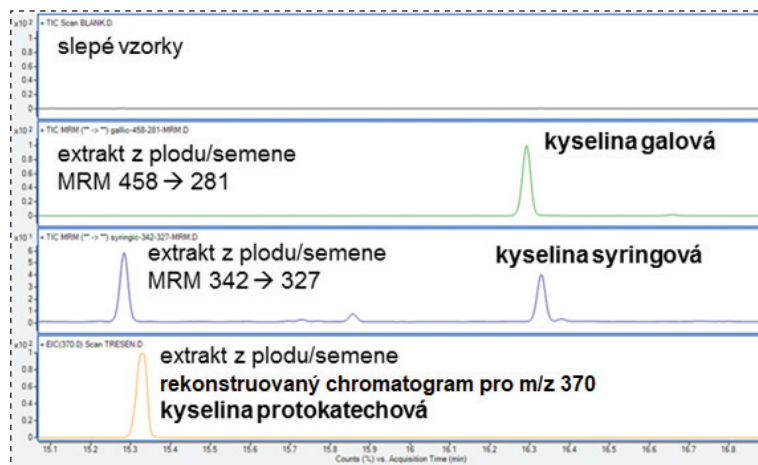
bylo odškrábáno malé množství povrchových vrstev (hmotnost 5 mg). Oškrábané kousky byly rozmělněny pro zvětšení povrchu a extrahovány 0,5 ml 5% roztoku kyseliny mravenčí ve směsi methanolu a vody (50:50, v/v/v). Extrakt byl následně rozdělen na dvě části a z obou částí byla jemným proudem dusíku odpařena extrakční směs. První část byla silanizována N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidem v pyridinu (30 min/70 °C). Druhá část byla přečištěna extrakcí tuhou fází s využitím SPE kolonky Strata SDB-L (100 µm, 260 Å, 100 mg/1 ml). Odpovídajícím způsobem byly připraveny kontrolní slepé vzorky.

Analýza spojením plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií: Analýza byla provedena na GC/MS systému Agilent 7010 Triple Quadrupole GC/MS system. Chromatografická separace byla provedena na dvou kolonách 5%-phenyl-methylpolysiloxane capillary HP-5ms Ultra Inert (15 m × 0.25 mm × 0.25 µm) on-line zapojených v sérii. Parametry měření byly následující: teplotní program 70 °C (5 min), 240 °C (5 minut, krok 15 °C/min), 300 °C (5 minut, krok 15 °C/min), 320 °C (5 minut, krok 15 °C/min), doba analýzy 36,7 min, nástřik 1 ml, mód splitless, teplota inletu 250 °C, průtok plynu (helium) 0,9 ml/min.

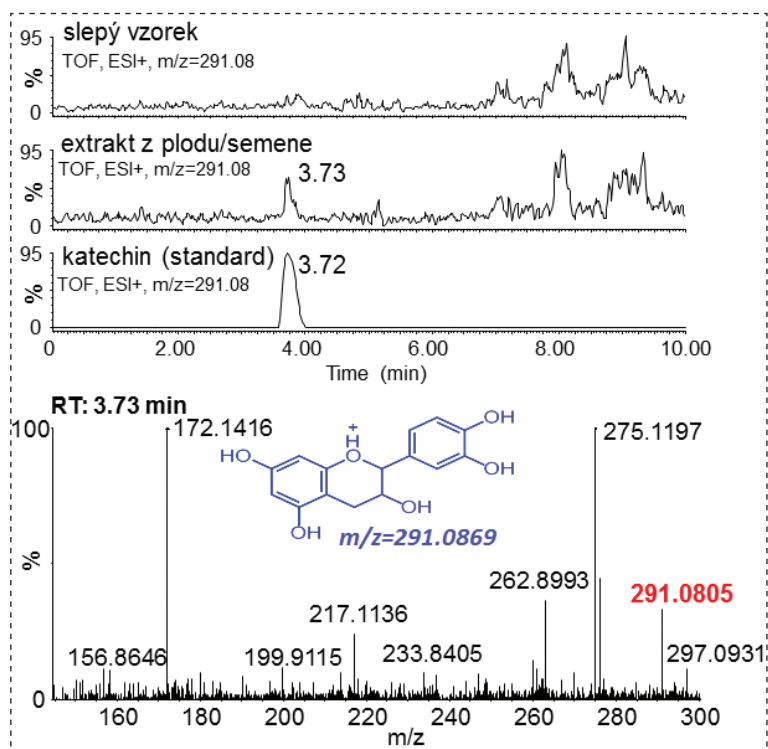
Analýza spojením kapalinové chromatografie s vysokorozlišující tandemovou hmotnostní spektrometrií: Pro analýzu byl použit chromatograf Acquity UPLC H-Class spojený s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier (Waters). Separace byla provedena na koloně Ascentis Express C-18 (100 × 2,1 mm, $d_p = 2,7 \mu\text{m}$) binární gradientovou elucí s využitím 5% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě (v/v, mobilní fáze A) a 5% roztoku kyseliny mravenčí v acetonitrilu (v/v, mobilní fáze B). Pro hmotnostně spektrometrickou detekci byl jako iontový zdroj použit elektrosprej v pozitivním módu (sprejovací napětí +3 kV). MS sken byl nastaven v rozsahu m/z 100–1200 a doba skenu na 0,2 sekundy.

Výsledky: Analýzy oběma technikami prokázaly přítomnost reziduí jednoduchých polyfenolických látek. Pomocí spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byly ve vnitřní části objektu přischlého ke stěně nádoby nalezeny tři fenolické kyseliny, jmenovitě kyselina galová, syringová a protocatechová (**obrázek 6-8**).

Spojením kapalinové chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií byl ve studovaném vzorku detekován flavonoid katechin (**obrázek 6-9**). V rekonstruovaném chromatogramu pro hodnotu m/z 291,08 je pozorovaný pík, jehož retenční čas (RT) odpovídá retenčnímu času katechinu při analýze standardu katechinu. V MS spektru vzorku průměrovaném přes chromatografický pík s $RT = 3,73$ je patrný signál s m/z 291,0805, který odpovídá katechinu (odchylka od teoretické m/z hodnoty činí 6,4 milidaltonu, mDa). Tyto výsledky potvrzují, že přítomný objekt je skutečně rostlinného původu. Semena a plody používané v lidské stravě obsahují fenolické kyseliny i flavonoidní látky a provedené che-



Obrázek 6-8 Detekce fenolických kyselin ve studovaném objektu pomocí GC/MS



Obrázek 6-9 Detekce katechinu ve studovaném objektu pomocí LC/MS (horní část: rekonstruované chromatogramy pro m/z 291.08; dolní část: MS spektrum průměrované přes chromatografický pík katechinu ve vzorku, m/z = 291.0805 odpovídá katechinu)

mické analýzy tedy podporují hypotézu, že studovaný objekt je semeno/zbytek plodu. Vzhledem k tomu, že všechny čtyři zachycené látky se vyskytují ve větší koncentraci v řadě plodů a semen, nelze na základě provedených analýz zatím přesněji určit, o jaký plod se přesně jedná. Z pohledu analytického je velmi zajímavé, že tyto látky přecházely v měřitelném obsahu dlouhá staletí. Tyto látky patří mezi přírodní antioxidanty, jejichž stabilita není příliš vysoká (oxidují se kyslíkem, přeměňují se na složitější látky, polymerují atd.). Snad právě podmínky pod zemí, kde je nižší teplota a nepřítomnost vzduchu, umožnily jejich zachování. Výsledky ukazují, že analýza reziduí fenolických látek metodami GC/MS a LC/MS může být dobrým vodítkem při analýze výplní v keramických nádobách nacházených při archeologickém průzkumu, pomáhajícím přiblížit původ studovaného materiálu.

Literatura

- Bednar P., Kucera L., Peska J., Kurka O., Bartak P., Cechova M., Sokolovska D., Kralik M., Pavelka J., Study of organic residues and artefacts in archaeological findings by separation techniques and mass spectrometry, Book of Abstracts, KL11, str. 39, 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018), Jasná, Slovensko 2018,.
- Bistřický J., Město. In: Schulz, J. (ed.): *Dějiny Olomouce 1*, Olomouc 2009, 103–106.
- Bláha J., Archeologické poznatky ke stavební konstrukci nejstarších měšťanských domů v Olomouci, *Archaeologia historica* 1999, 24/99, 189–213.
- Bláha J., Slovanská a středověká Olomouc v archeologických pramenech. In: Bém, M. (ed.): *Archeologické zrcadlení*, Olomouc 2001, 121–151.
- Bláhová Z., Historická analýza Horního a Dolního náměstí v Olomouci, Památkový ústav v Olomouci 1992, *Výroční zpráva*, 1993, 49–66.
- Dehnerová H., Olomouc (okr. Olomouc) Dolní náměstí č. o. 42, parcela č. 446, 116/8, *Přehled výzkumů*, 2000, 42, 223–224.
- Dehnerová H., Michna P., Útvar archeologických výzkumů, Důležitější záchranné archeologické výzkumy, Památkový ústav v Olomouci, *Výroční zpráva* 2000, Olomouc 2001, 81–86.
- Kočárová R., Kočár P., Olomouc, č. o. 42. Nálezová zpráva o analýze dřev a uhlíků. Č. analýzy 50/09, uloženo v knihovně NPÚ ÚOP v Olomouci pod č. D-780, 2009.
- Kohout Š., Územní vývoj a výstavba opevnění. In: Schulz, J. (ed.): *Dějiny Olomouce 1*, Olomouc 2009, 138–141.
- Schulz J., (ed.) *Dějiny Olomouce 1*, Olomouc 2009.
- Šlészár P., Olomouc between the Great Moravian and Přemyslid Duchies. In: P. Kouřil – R. Procházka et al.: *Moravian and Silesian Strongholds of the Tenth and Eleventh Centuries in the Context of Central Europe*, Spisy Archeologického ústavu AV ČR Brno 57, Brno 2018, 115–135.
- Zatloukal R., Dehnerová H., Šlészár P., Olomouc, Dolní náměstí. Rešerše archeologických pramenů. Rukopis, uloženo v knihovně NPÚ ÚOP v Olomouci pod č. D-772, 2009.

6.3 Studium chemického složení zbytků v keramických nádobách z Orlové (sirné mléko)

Jindřich Hlas, Barbara Marethová, Lukáš Kučera

V roce 2017 proběhl v Orlové na náměstí 28. října záchranný archeologický výzkum, během kterého byla nalezena celá keramická nádoba obsahující **pozůstatky sirného mléka (obrázek 6-10)**.

Zkoumaná plocha se nachází na místě původní Horní (Polské) Lutyně, zmiňované v písemných pramenech k roku 1365, kdy byla společně s Dolní (Německou) Lutyní prodána knížetem Přemkem za 400 hřiven Paškovi z Barutswerde (Hosák 2004, 931). Osídlení zde představovala až do druhé poloviny 20. století rozptýlená vesnická zástavba kopírující hřbet Orlovské plošiny. Hlavní osu vsi tvořila severojižní komunikace zachycená na mapě stabilního katastru (1836), která byla prozkoumána během archeologického výzkumu. V sousedství cesty se nacházel objekt o. 652 obdélného půdorysu (2,2×3,2 m) s téměř kolmými, 1,8 m hlubokými stěnami. Na dně se dochovaly pozůstatky dřevěné konstrukce. Celá situace je interpretována jako sklípek, jenž byl součástí obytného stavení zobrazeného ve stabilním katastru. V zásypu objektu se mezi zlomky kachlů a keramických nádob z 18. století našel vcelku dochovaný baňatý hrnek s uchem a vnitřní světle hnědou glazurou obsahující bělavou hmotu později identifikovanou jako sirné mléko (Anlauf a Marethová, 2018).

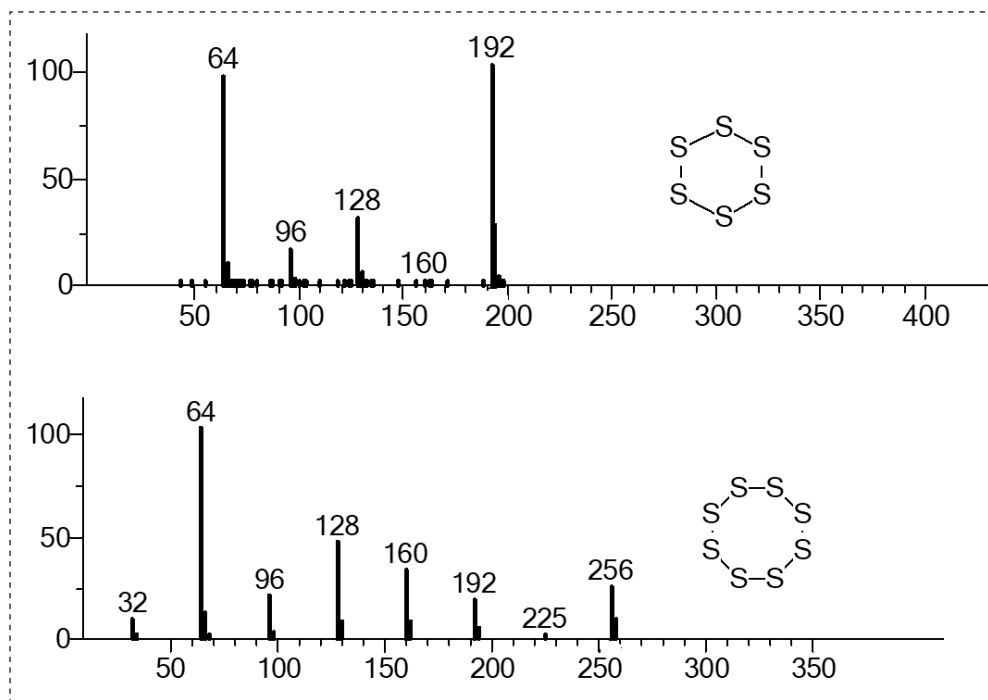
Příprava vzorku a jeho analýza: Z vnitřní stěny nádoby bylo odebráno 0,5 g „přiškvařené“ hmoty, která byla následně extrahována 2 ml acetonu p. a. Tak-



Obrázek 6-10 Vzorek sirného mléka nalezený na dně nádoby

to připravený vzorek byl po centrifugaci při 14000 RPM (5 minut) nastříknut do plynového chromatografu Agilent 7010 Triple Quadrupole GC/MS system. Chromatografická separace byla provedena na dvou kolonách 5%-phenyl-methylpolysiloxane capillary HP-5ms Ultra Inert (15 m × 0.25 mm × 0.25 μm) on-line zapojených v sérii. Parametry měření byly následující: teplotní program 70 °C (5 min), 240 °C (5 minut, krok 15 °C/min), 300 °C (5 minut, krok 15 °C/min), 320 °C (5 minut, krok 15 °C/min), doba analýzy 36,7 min, nástřik 1 μl, mód splitless, teplota inletu 250 °C, průtok plynu (helium) 0,9 ml/min.

Výsledky a závěr studie: GC/MS analýza prokázala přítomnost cyklické síry tvořené šesti a osmi atomy (**obrázek 6-11**). Tyto sloučeniny se využívají velmi často pro přípravu lékařských preparátů srážením síry z roztoků nebo ochlazením horké kapalné síry z teploty okolo 400 °C. Nejznámější přípravek je sirné mléko. Vlastní nález zbytku sirného mléka v keramické nádobě je ojedinělým případem bez známých archeologicky získaných analogií. Vzhledem k využití síry, respektive kyseliny sírové již od středověku v lékárnictví k medicínalním účelům lze předpokládat, že i u nálezu z Orlové se jedná o doklad medicínských praktik spojených s léčbou kožních problémů nebo veterinárního využití.



Obrázek 6-11 MS spektrum dvou píků (cyklické síry S₆ a S₈) detekovaných v acetonovém extraktu hmoty pocházející z vnitřní části nádoby.

Literatura

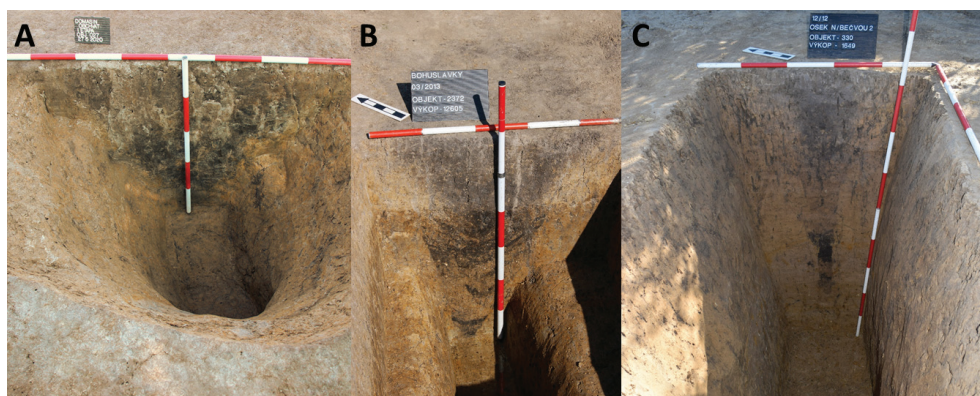
Anlauf O., Marethová B., Orlová, *humanizace náměstí*.
Nálezová zpráva ze záchranného archeologického výzkumu
č. akce 03/17, Opava 2018.

Hosák L., *Historický místopis země Moravskoslezské*. Brno
2004.

6.4 Úzké žlábký s „V“ profilem (Schlitzgruben)

Jaroslav Peška, Martina Beková, Lucie Maříková, Lukáš Kučera

Na nejednom pravěkém sídlišti odkrývají archeologické výzkumy menší nebo větší počet úzkých krátkých žlábků nejrůznější orientace. Umístěné jsou na okrajích sídlišť, ale i mezi ostatními objekty včetně domů, a objevují se ojediněle nebo ve skupinách na chronologicky různých osadách neolitu (Lenneis, 2009; 2013; 2017), eneolitu (Vladár a Lichardus, 1968), doby bronzové (Hüser a Döhle, 2011) a dále. Jde většinou o **šterbinovitě úzké a krátké žlábký se stěnami ke dnu se zužujícími s hrotitým profilem ve tvaru písmene V (obrázek 6-12A)**. Jejich výplň je tvořena jednou nebo naopak mnoha drobnými vrstvami, nezřídka pozorujeme u dna tenké mnohonásobné zvrstvení až proplástky vytvořené působením vody.



Obrázek 6-12

Ukázka úzkého žlábký se stěnami ke dnu se zužujícími s hrotitým profilem ve tvaru písmene V – (A) lokalita Domašín, objekt 27; (B) sídliště lineární keramiky v Bohuslávkách 1, Foto M. Paulus; © lokalita Osek nad Bečvou 2, Foto A. Tajer.

Délka se pohybuje mezi 2–4 m, šířka 10–50 cm, výjimečně kolem 1 m (1,0–1,2 m), nápadná je hloubka dosahující až 1,5 m od horní hranice podloží.

Takové jámy byly na střední Moravě odkryty na stavbě dálnice D1 (stavba 0137 Přerov-Předmostí – Lipník nad Bečvou), například na neolitickém sídlišti kultury s lineární keramikou v Bohuslávkách 1 (6. tis. př. n. l.), na lokalitě Trnávka 4 s osídlením ze závěru neolitu, pozdního eneolitu a starší doby bronzové nebo na polykulturním nalezišti v Oseku nad Bečvou 2, kde převažuje rozsáhlé sídliště lužické kultury z mladší doby bronzové (1300–1000 př. n. l.). Datování znemožňuje fakt, že jsou tyto jámy většinou zcela bez nálezů. **Jejich účel není dodneška objasněn.** E. Lenneis (2013, 148) je dělí do 2 skupin: žlábků v blízkosti vstupů do sídelních areálů (brány, mosty; koncentrace v lineární kultuře v západní části střední Evropy) a na žlábků uvnitř sídlišť mezi stavebními areály domů, často v řadách nebo skupinách, typické spíše pro zbytek východní části střední Evropy (není náš případ). Další skupina 9 žlábků byla v roce 2020 prozkoumána v rámci záchranného výzkumu na obchvatu Domašína (okr. Rychnov n. Kn.), kromě jednoho se koncentrovala na pásu širokém 20 m (šíře staveniště) a dlouhém 50 metrů. Nacházely se v mírném svahu, orientovány šikmo nebo kolmo na vrsťevnice. Velmi podobné byly nejen rozměry, ale i charakterem výplně, která byla u všech stejná, objekty zanikly stejným, jednorázovým způsobem (žlábků byly pouze u dna vybarveny několika velmi slabými proplástkami, jinak je celá výplň tmavě šedá hlinitá, jednorázově zaházená). Všechny byly akeramické, ale v jejich okolí se nalézaly kulturně zařaditelné komponenty – silo únětické kultury (vzdálenost 70 m východně) a o něco dále (120, resp. 150 m západně) pak polozemnice patrně lengyelského kulturního okruhu a pozůstatek jámy kultury s lineární keramikou. Obecně však lze říci, že byly součástí velkého polykulturního sídliště se stovkami kúlových jamek, spíše pozůstatky ohrazení než jasných půdorysů domů. Z většiny žlábků byly odebrány vzorky na fosfátovou analýzu a podle výsledků byly následně vytipovány 3 z nich pro podrobnější chemický rozbor. K jednomu z analyzovaných objektů (č. 27/2020) bylo provedeno i datování C14 (Ústav jaderné fyziky AV ČR v. v. i.), kalibrované stáří jednoho ze vzorků bylo 4488–4353 2 sigma cal. BC, druhého z téhož objektu 4410–4257 2 sigma cal. BC.

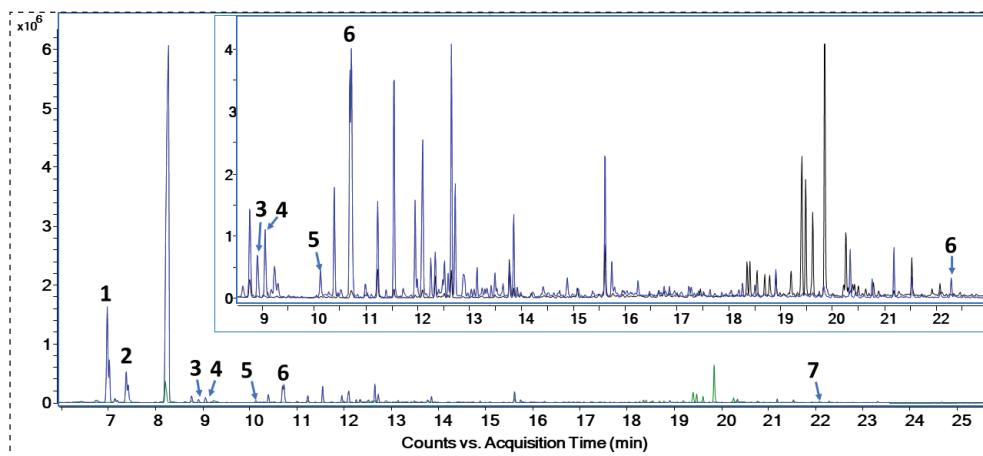
Tyto poněkud zvláštní objekty, známé z literatury již více než 100 let (Wolff, 1911, 21 ad., Abb. 3; Lehner, 1912, 280 ad., 295; Bremer, 1913, 389 ad.), jsou interpretovány dost různorodě jako jámy na hlínu, tkaní, koželužství, chytání zvířat, ke chlazení masa, obětní nebo kultovní jámy, ochranné stěny proti nepřízni počasí (Lenneis, 2009, 50–54; Hüser a Döhle, 2011, 35 ad.). V poslední době se objevuje názor o funkci žlábků jako chladících jam nebo dokonce „lednic“ k uchovávání ledu (Struck, 1984, 6; Lenneis, 2009, 50–54; 2013, 157; 2017, 85), a to především na základě drobných vrstviček (proplástek) na dně objektů, které pozorujeme i na našich

sídlíštích (**obrázek 6-12B,C**). Proti této interpretaci hovoří jiné známé způsoby skladování a uchovávání ledu a také např. rozměry jednoho ze žlábků na sídlišti münchshöfenské kultury (4600–4200 př. n. l.) v Murr (Bádensko-Württembersko), kde byla nalezena jáma jen 20 cm široká a 2 m hluboká (Neumair, 1996, 26, 32, 39 ad.; Hüser a Döhle, 2011, 36). Za obětní jámy byly považovány především díky zvířecím lebkám (Vladár a Lichardus, 1968, Abb. 17, 36–37) nebo skeletům jeleních mláďat (3 měsíce starých) z pozdní doby bronzové s absolutním datováním 1311–1113, příp. 1124–970 př. n. l. v Kalzendorf (Hüser a Döhle, 2011, 36 ad., Abb. 2–4) nebo dokonce zvláštnímu dvoj Pohřbu na již zmíněném sídlišti v Murr (Neumair, 1996, 26, 32, 39 ad.). Stejně pohřby (jelen, člověk) v úzkém žlábků jsou známy i z dolnorakouského Maissau (Schmitsberger, 2009). Zatímco u mláďat můžeme předpokládat, že do jámy zkrátka spadla, v Maissau se v jednom případě jedná o jelena ve věku 9–11 let s doklady uzdění (součást koňského postroje), kde už se představě o záměrném pohřbu nevyhneme. Přesto půjde spíše o výjimky než o pravidlo, neboť lze díky počtu a tvaru žlábků (ve srovnání se skutečnými obětními jámami pravěku) usoudit, že toto nebude běžná funkce zkoumaných objektů.

Vzorky hlíny z různých hloubek byly před chemickou analýzou extrahovány sérií rozpouštědel s různou polaritou. Pořadí solventů bylo – voda, 0,05 % hydroxid amonný v metanolu, 1 % kyselina mravenčí v metanolu a aceton (poměr hlína: rozpouštědlo bylo 1:1, tj. 50 g hlíny: 50 ml solventu). Získané extrakty byly následně 100x zakoncentrovány a analyzovány pomocí GC/MS systému Agilent 7010 Triple Quadrupole GC/MS system. Chromatografická separace byla provedena na dvou kolonách 5%-phenyl-methylpolysiloxane capillary HP-5ms Ultra Inert (15 m × 0.25 mm × 0.25 μm) on-line zapojených v sérii. Parametry měření byly následující: teplotní program 70 °C (5 min), 240 °C (5 minut, krok 15 °C/min), 300 °C (5 minut, krok 15 °C/min), 320 °C (5 minut, krok 15 °C/min), doba analýzy 36,7 min, nástřik 1 ml, mód splitless, teplota inletu 250 °C, průtok plynu (helium) 0,9 ml/min. Vzorky hlíny z oblasti Moravy obsahovaly látky náležící do skupiny sfingolipidů, vyskytující se v živočišných a rostlinných buňkách. Vyloučit nelze ani přítomnost plísní, jejichž buňky řadu sfingolipidů produkují. Zmíněné látky poukazují na přítomnost zbytků rostlinných pletiv a/nebo živočišných tkání bez bližšího určení. Detekován byl miliacin (proso), mastné kyseliny a diterpen – kyselina abietová/dehydroabietová – ukazující na přítomnost rostlinných pryskyřic (dřeva). Většina identifikovaných látek ukazuje na živočišný tuk (asi mléko a máslo), z rostlinných pak na obiloviny. Úzké žlábků tak mohly být opatřeny dřevěnou výztuhou (jehličnaté dřevo?) a byl v nich zpracováván nebo skladován materiál bohatý na tuky. Uvedená přítomnost sfingolipidů v souvislosti s plísněmi (které jsou spolu s bakteriemi prvotními rozkladači bioodpadu) nás přivádí k velice odvážné myšlence o využívání žlábků k jistému druhu kompostování ve smyslu

zbavení se části odpadu a získání zemědělského hnojiva. Analýza vzorků z lokality Domašín prokázala přítomnost ethylen glykolu, propylen glykolu a kyselin, kapronové, glykolové, levulinové a 3-hydroxymáselné a inositolu (**obrázek 6-13**). Detekce propylen- a ethylen-glykolu poukazuje na anaerobní fermentaci materiálů obsahujících cukry (Altaras a kol., 2001). Otázkou však zůstává, zda by pro tuto činnost nebylo vhodnější použít rozměrově jiné, resp. daleko jednodušší objekty, nebo skladovat odpad prostě na zemi, podobně jako naši předkové a my „na hnoji“, a zda již od starších fází prvotně zemědělské společnosti bylo nějakým způsobem hnojivo vůbec využíváno. Je nasnadě, že přímý důkaz funkce a využívání žlábků jsme ani chemickou analýzou nezískali.

Jednou z možností je tedy využívání „vyztužených“ koryt na kompostování – účinná metoda výroby zemědělského hnojiva (Kučera a Bednář, 2014). Na základě analýzy tedy můžeme předpokládat nakládání s organickou složkou, a to s rostlinami – jejich kompostování nebo snad dočasné zakládání. Nesporná je všude přítomnost nebo práce s vodou. Na sídlišti starší fáze kultury s lineární keramikou v německém Köln-Lindenthalu (van der Velde, 1973) byla z jednoho žlábků získána srst nebo kůže a dubová kůra, která je mimo jiné podstatnou surovinou při získávání tzv. třísla v koželužství. Výchovu (avšak z jehličnanů) máme doloženou jak archeologicky (objekt 234 z Oseku nad Bečvou 2), tak chemicky (viz dříve). Gronenborn (1989) se přiklání k funkci žlábků coby tkalcovských jam pro tkaní lnu a zobrazení takového zařízení spatřuje na halštatské amfoře ze Šoproně (Gronenborn 1989, Abb. 2). Ačkoliv přímé a jednoznačné důkazy funkce



Obrázek 6-13 Chromatogram acetonového extraktu vzorku hlíny (modrá) a referenčního vzorku (zelená) z lokality Domašín z hloubky 60 cm, objekt 27... (1 – ethylen glykol, 2 – propylen glykol, 3 – kyselina kapronová, 4 – kyselina glykolová, 5 – kyselina levulinová, 6 – kyselina 3-hydroxymáselná, 7 – inositol)

úzkých žlábků chybí, je zřejmé, že činnost se žlábkou spojená musela probíhat opakovaně a po značně dlouhou dobu (doklady minimálně od starší lineární keramiky po dobu halštatskou a asi i dále). Jednalo se tedy o univerzální nadčasovou aktivitu po staletí neměnnou.

Literatura

- Altaras N. E., Etzel M. R., Cameron D.C., Conversion of sugars to 1,2-propanediol by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* HG-8, *Biotechnol Prog.* 2001, 17(1), 52–56.
- Bremer W., Eberstadt, ein steinzeitliches Dorf der Wetterau, *Prähistorische Zeitschrift* 1913, 5, 366–435.
- Gronenborn D., Neue Überlegungen zur Funktion von Schlitzgruben, *Archäologisches Korrespondenzblatt* 1989, 19, 339–342.
- Hüser A., Döhle H. J., Hirschkälber in bronzezeitlichen Schlitzgruben – zwei nicht alltägliche Befunde aus Mitteleuropa, *Beiträge zur Archäozoologie und Prähistorischen Anthropologie* Band 2011, VIII, 35–44.
- Kučera L., Bednář P. Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review. *Waste Forum* 2014, 3, 123–136.
- Lehner H., Prähistorische Ansiedlungen bei Plaidt an der Nett., *Bonner Jahrbücher* 1912, 122, 271–310.
- Lenneis E., Beobachtungen zu frühneolithischen Schlitzgruben. In: Anders, A. – Kulcsár, G. (eds.) *Monuments in Time. Papers Presented to Pál Raczky of his 60th Birthday. Prehistorical Studies I.* Budapest, 2013, 147–158.
- Lenneis E., Frühneolithikum – Kultur der Linearbandkeramik (LBK). In: Lenneis, E. (Hrsg.) *Erste Bauernhöfe – älteste Kultbauten. Die frühe und mittlere Jungsteinzeit in Niederösterreich. Archäologie Niederösterreichs*, Wien – Stockerau 2017, 85–86.
- Lenneis E., Rosenberg im Kampthal, Niederösterreich. Ein Sonderplatz der älteren Linearbandkeramik. *Universitätsforschungen zur prähistorischen Archäologie* 164. Bonn 2009.
- Neumair E., Murr – eine bedeutende Zentralsiedlung der jungsteinzeitlichen Münchshöfener Kultur, *Archäologie im Landkreis Freising* 1996, 5, 9–89.
- Schmitzberger O., Ausgrabungen auf der Trasse der Ortsumfahrung Maissau 2008/Fläche „1-Süd“. Befunde vom Altneolithikum bis zum Frühmittelalter, *Fundberichte aus Österreich* 2009, 47, 438–500.
- Struck W., Schlitzgräbchen im Kaiserstuhlgebiet, *Archäologische Informationen* 1984, 7.1, 13–17.
- Van der Velde P., Rituals, Skins and Homer: The Danubian „Tan-Pits“, *Annalecta Praehistorica Leidensia* 1973, VI, 51–65.
- Vladár J., Lichardus J., Erforschung der frühneolithischen Siedlungen in Branč, *Slovenská Archeológia* 1968, XVI, 263–352.
- Wolff G., Neolithische Brandgräber in der Umgebung von Hanau, *Prähistorische Zeitschrift* 1911, 3, 1–51.

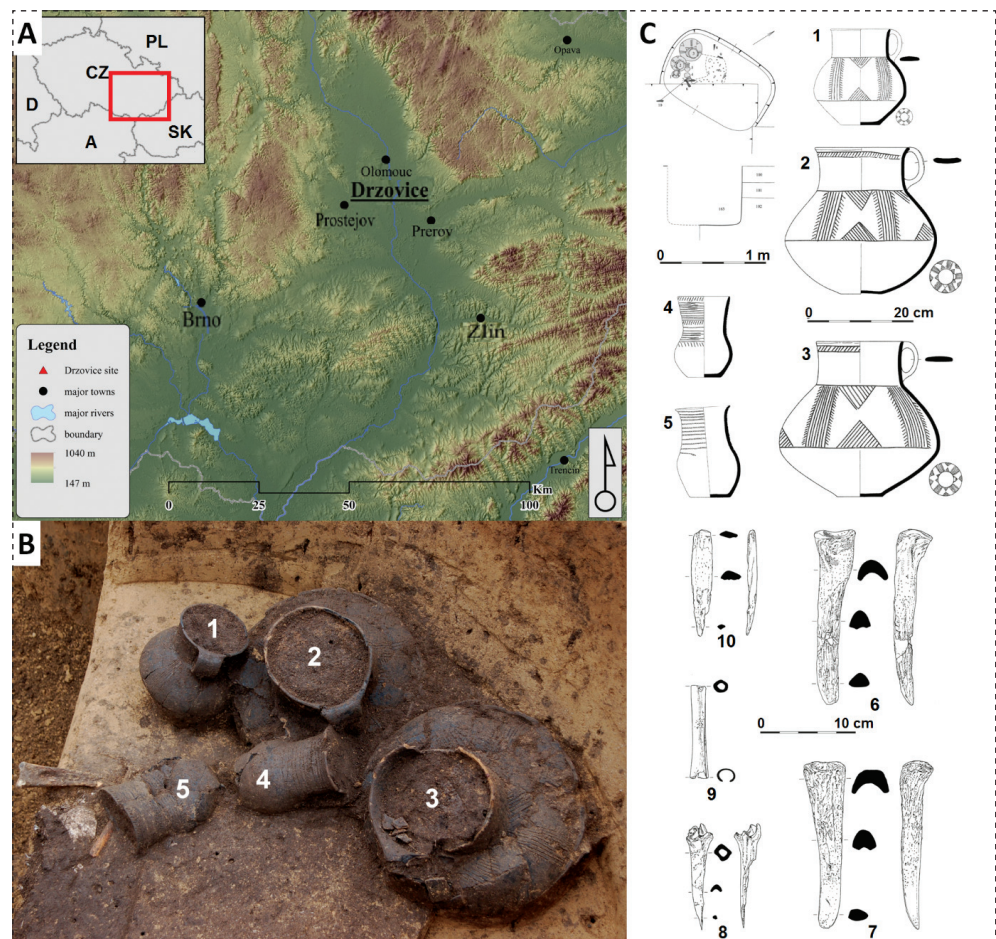
6.5 Nejstarší proso v pravěku střední Evropy z Držovic na Prostějovsku

Lukáš Kučera, Jaroslav Peška, Pavel Fojtík, Jaromír Beneš,
Pavla Kučerová, Petr Bednář

Během záchranného výzkumu (2014–2015) byla na katastru obce Držovice, v trati Pastvíska, na Prostějovsku (střední Morava) odkryta část birituálního pohřebiště moravské skupiny kultury se šňůrovou keramikou čítající prozatím 6 hrobů ve značných vzdálenostech od sebe (interval 17–48 m). Hroby byly rozloženy na mírném JZ svahu nad terasou Českého potoka (vzdálenost 100–200 m) v nadmořské výšce 220–228 m (Fojtík, 2016; Peška a Fojtík, 2018). Byly orientovány v ose S–J, příp. SV–JZ a datovány jsou do staršího období lokálního vývoje moravské šňůrové keramiky (MŠK IIIa) (rámcově 2600/2500–2300/2200 př. n. l.). Absolutní datum z hrobu (vzorek z kostěného dláta; Beta-487621: 4100 ± 30 BP, 2707–2571 2 sigma cal. př. n. l.) a další ze spodního pohřbu H 6 (Poz-98508: 3850 ± 40 BP, 2481–2204 2 sigma cal. př. n. l.) jen potvrzují rámcové datování. **Předmětem našeho bližšího zájmu se stal jediný žárový hrob (H 4)** na pohřebišti narušený cca z 1/3 výkopem kanalizační šachty (**obrázek 6-14**). Do obdélné jámy ($212 \times 140 \times 50$ cm) byly uloženy přísně ohraničené spálené ostatky ze dvou individuí, z nichž jeden pohřbený byl ve věku cca 18 let. Kremace byla vymezena skupinou 5 keramických nádob (od Z) a dvěma kumulacemi kostěných nástrojů (od S a J). Keramický inventář tvořila trojice džbánů dřevohostického typu (CD1 – varianta Dřevohostice) nestejně velikosti (obsah 8,5; 7,5 a 1,85 l) se shodným výzdobným motivem a dvojice šňůrových pohárů (obsah 0,8 a 0,6 l) s otisky šňůry, resp. kombinací obvodových rýh a pásů šikmých záseků na hrdle (obr. 1). Početná kostěná industrie je zastoupena dvojicí masivních dlát (*radius/metapodium?* *Bos taurus*), kostěným hrotem, šídlem (holenní kost středně velkého savce ovce/koza) a opracovanou kostěnou trubičkou (*radius* ovce/koza).

Nejzajímavějším hrobovým přídatkem je drobná kostěná trubička ($d = 94,75$; $\delta = 14,02$; vnější průměr 14–15; vnitřní průměr 7,45–8,92 mm) objevující se ve střední Evropě v hrobech několika skupin kultury se šňůrovou keramikou (Malopolsko, Čechy, Dolní Rakousko), přes celý epišňůrový kulturní komplex (zdobené rytými motivy) starší doby bronzové, včetně kultury strzyžovské (sídliště Strzyżów) s největším výskytem a koncentrací v nitranské kultuře až po protoúnětickou kulturu na Moravě (Moravská Nová Ves–Hrušky). K dispozici jsou rovněž ojedinělé sídlištní nálezy z období klasické fáze únětické kultury (Šatov III, jáma 57) nebo poklasické fáze z Křižanovic–Zámečku (s vyřezávanými žebírky – artefakt mohl plnit jinou funkci). Předlohy musíme hledat ve starších eneolitických kulturách

jižní Ukrajiny a Přibajkalí (kultura dněpro-doněcká, jámová, srubová). Nedávný nález poškozené, nedokončené (?) trubičky s náznakem ryté výzdoby z pozdně jevišovického sídliště v Kroměříži 3-Miňůvkách (Peška, 2011, obr. 6:18) by mohl potvrzovat vztahy k V, příp. JV Evropě. Nejasná je funkce trubiček, které jsou interpretovány jako ozdoby oděvu, šperky, rukojeti nožů, jehelníky či solníčky, pomůcky při rituálním dojení nebo jako součásti hudebních nástrojů (tzv. Panova flétna jen v případě kolekce několika kostí nestejně velikosti: Batora a Staššíková-Štukovská, 1993; Šmíd, 2000) nebo píšťalky/vábničky pro lákání divoké zvěře (Batora, 1999, 36–39; 2006, 171–175; 2009, 246–247; Stuchlík a Stuchlíková, 1996, 114–115; Hårde, 2006, 349; Kern a Lobisser, 2010, 28). V této souvislosti je nutno



Obrázek 6-14 Fotografie uložení zbytků keramiky a nádob v žárovém šňůrovém H 4 v Držovicích (foto P. Fojtík) a kresebná dokumentace hrobové jámy a výbavy žárového H 4 z Držovic (kresby J. Molčíková).

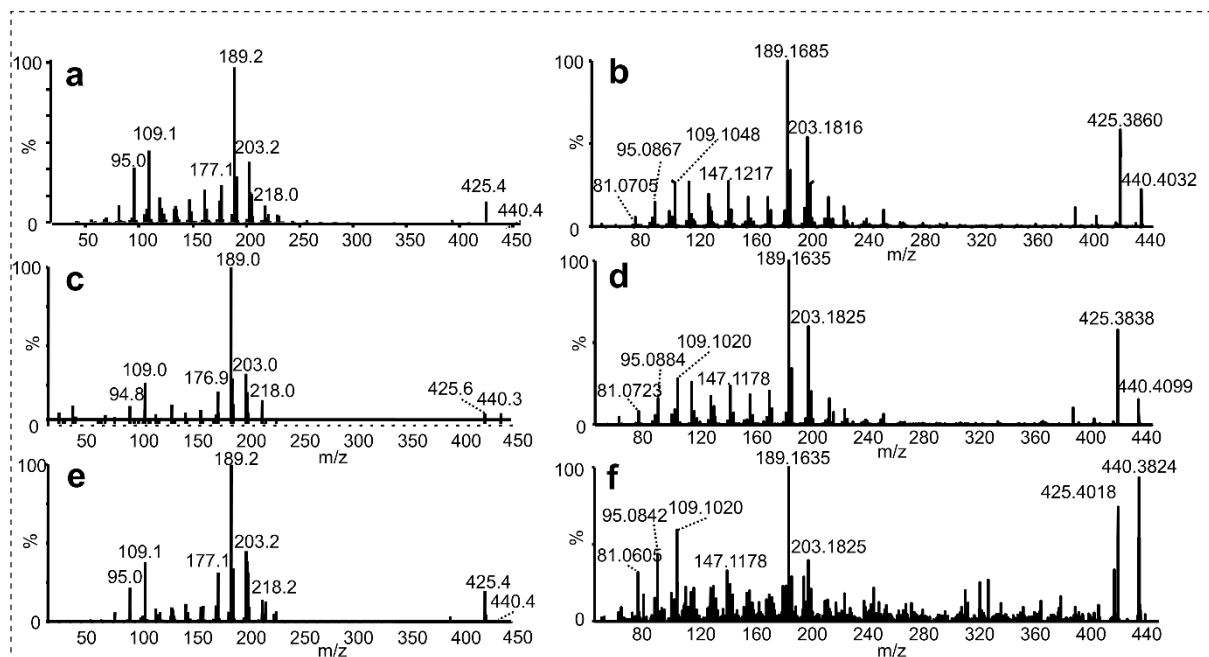
upozornit na silnou vazbu opracovaných trubiček na pohřby mužů s patričním inventářem (zejména ve starobronzové nitranské kultuře), kde často dominuje výbava lovce-bojovníka, čímž by interpretace jako vábnička nabývala na důležitosti.

Není tedy vyloučeno, že alespoň jeden z pohřbených byl muž. Hrobový celek byl podroben komplexnímu interdisciplinárnímu výzkumu, jehož některé pozoruhodné výsledky předkládáme. **Na chemickou analýzu byl odebrán sediment z obsahu obou pohárů (nádob č. 4 a 5) a dvou menších dřevohostických džbánů (nádob č. 1 a 2),** když obsah největšího džbánu (č. 3) nebyl k dispozici.

Hlína z vnitřní části nádoby byla vertikálně rozdělena na pět přibližně stejných dílů. Každá vrstva byla extrahována sérií rozpouštědel s různou polaritou. Pořadí solventů bylo – voda, 0,05 % hydroxid amonný v metanolu, 1 % kyselina mravenčí v metanolu a aceton (poměr hlína: rozpouštědlo bylo 1:1, tj. 50 g hlíny: 50 ml solventu). Získané extrakty byly následně 100x zakoncentrovány a analyzovány pomocí MALDI-MS, ASAP-MS a GC/MS. Vzorky pro GC/MS byly před analýzou silanizovány pomocí 50 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 50 µl pyridinu (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Následně byly vzorky analyzovány pomocí přístroje Agilent 7010 Triple Quadrupole GC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Separace probíhala na dvou v sérii zapojených kolonách (5%-Phenyl)-methylpolysiloxan HP-5 ms Ultra Inert (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm, každá) s konstantním průtokem 1,0 a 1,2 ml/min. Teplotní gradient začínal na 70 °C, kde teplota byla udržována po dobu 5 minut, poté došlo k zahřívání na 300 °C s krokem 15 °C/min (teplota držena po dobu 10 minut). Nástríkový objem byl 0,5 µl metodou splitless. MRM (multiple reaction monitoring) metoda byla použita pro cílenou analýzu miliacinu, hlavního markeru prosa (přechod m/z 440 → 189). Dále byl použit také mód SIM pro analýzu dalších pentacyklických triterpenů (SIM sken m/z 189, 204, 218). Jako komplementární technika ke GC/MS byla použita technika ASAP-MS (součást přístroje Synapt G2S, Waters), která poskytuje informaci o přesné a správné hmotnosti (hodnotách m/z) sledovaných iontů. Analýza probíhá bez předběžné chromatografické separace. Parametry metody byly: iontový zdroj APCI, pozitivní mód, doba analýzy 3 min (0–1 min, $T=100$ °C, 1–2 min, $T=250$ °C, 2–3 min, $T=400$ °C), skenovací oblast m/z 50–1000, Trap kolizní energie 4 eV, transfer kolizní energie 2 eV. Při MS/MS experimentech byla použita kolizní energie 20 eV (vložená na první kolizní celu, Trap). Izolována byla hodnota m/z 440,4. Princip ASAP-MS techniky je popsán v kap. 3.2.1.3. Třetí použitou technikou bylo MALDI-MS (součást Synapt G2S), kdy byl na vzorkovací destičky nanesen 1 µl vzorku a překryt roztokem matrice 2,4,6-trihydroxyacetophenon (THAP, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, rozpuštěný ve směsi acetonitril/voda (1:1, v/v), koncentrace 25 mg/ml). Parametry měření: rozsah měření m/z 50–2000, pozitivní ionizační mód, laser Nd:YAG 1 kHz, vlno-

vá délka laseru 355 nm, energie laseru 450 (arbitrární jednotka). **Plynová chromatografie prokázala současně s technikou ASAP-MS přítomnost miliacinu v nádobě č. 2 (obrázek 6-15)** (Kučera a kol., 2019).

V dalších dvou nádobách (č. 4 a č. 5) byly pomocí techniky MALDI-MS nalezeny výrazné signály triacylglycerolů. Konkrétně se jednalo o látky s m/z 829,7618; 855,7787; 925,7029; 939,7148; 953,7241; 967,7419 v acetonovém extraktu hlíny z nádoby č. 4 a m/z 829,7870; 835,5690; 879,5928; 923,6188; 951,6760; 967,6469 v extraktu hlíny z nádoby č. 5. Na základě srovnání profilu signálů včetně jejich zastoupení v živočišných tucích uváděných v odborné literatuře by se mohlo jednat o tuky pocházející z mléčných produktů (Picariello a kol., 2007). **Vzorky byly tedy dále analyzovány pomocí imunochemické analýzy (ELISA) za využití testu pro stanovení β -laktoglobulinu a kaseinu** (ELISA technika je vysvětlena a její aplikační možnosti jsou uvedeny v kap. 4.8.3). Vzorky z obou nádob prokázaly pozitivní reakci na přítomnost kaseinu, avšak pouze jeden (nádobka č. 5) pozitivní reakci na hovězí β -laktoglobulin. Na základě výsledků můžeme tedy konstatovat, že v obou nádobách byl přítomen mléčný produkt, ale pouze v nádobě č. 5 byl tento produkt vyroben z kravského mléka (Kučera a kol., 2018).



Obrázek 6-15 Fragmentační spektra miliacinu ve vzorku standardu (a. GC/MS, b. ASAP-MS), miliacin nalezen ve vzorku prosa (c. GC/MS, d. ASAP-MS), a miliacin nalezený v extraktu hlíny z nádoby č. 2 (e. GC/MS a f. ASAP-MS)

Literatura

- Bátora J., Gräber mit Totenhäusern auf frühbronzezeitlichen Gräberfeldern in der Slowakei (Beitrag zu Kulturverbindungen zwischen Mittel-, West- und Osteuropa), *Prähistorische Zeitschrift* 1999, 74, 1–57.
- Bátora J., *Štúdie ku komunikácii medzi strednou a východnou Európou v dobe bronzovej*. Bratislava 2006.
- Bátora J., Hroby s dýkami na pohrebisku zo staršej doby bronzovej v Ludanicach-Mýtnej Novej Vsi, *Slovenská Archeológia* 2009, LVII, 221–260.
- Bátora J., Staššíková-Štukovská D., Einzellängsflöten aus der Frühbronzezeit in der Slowakei? In: *Actes du XII^e Congrès International du Sciences Préhistoriques et Protohistoriques*, Bratislava, 1–7 Septembre 1991, Bratislava, 370–375.
- Fojtík P., Držovice (k. ú. Držovice na Moravě), okr. Prostějov, „Pastviska“. KŠK. Pohřebiště. Záchranný archeologický výzkum, *Přehled výzkumů* 57-1, Brno 2016, 186–187.
- Hårde A., Funerary Rituals and Warfare in the Early Bronze Age Nitra Culture of Slovakia and Moravia. In: Otto T., Thrane H., Vandkilde H., (eds.) *Warfare and Society – Archaeological and Social Anthropological Perspectives*. Aarhus 2006, 341–382.
- Kern D., Lobisser W., Pupperl und Pfeiferl – Zu einer schnurkeramischen Kinderbestattung von Franzhausen, Niederösterreich, *Mitteilungen der Anthropologischen Gesellschaft in Wien* 2010, 140, 23–28.
- Kučera L., Peška J., Fojtík P., Barták P., Kučerová P., Pavelka J., Komárková V., Beneš J., Polcerová L., Králík M., Bednář P., First direct evidence of broomcorn millet (*Panicum miliaceum*) in Central Europe, *Archeol. Anthropol. Sci.* 2019, 11, 4221–4227.
- Kučera L., Peška J., Fojtík P., Barták P., Sokolovská D., Pavelka J., Komárková V., Beneš J., Polcerová L., Králík M., Bednář P., Determination of Milk Products in Ceramic Vessels of Corded Ware Culture from a Late Eneolithic Burial, *Molecules* 2018, 23, 3247.
- Peška J., Nové poznatky o jevišovickém osídlení v regionu střední Moravy, In: M. Popelka, R. Šmidtová, (eds.), *Otázky neolitu a eneolitu našich zemí*. Sborník referátů z 28. zasedání badatelů pro výzkum neolitu a eneolitu (nejen) Čech, Moravy a Slovenska, Mělník 28. 9. – 1. 10. 2009, *Praehistorica* XXIX, Praha, 2011, 297–322.
- Peška J., Fojtík P., Zajímavý následný pohřeb ze závěru eneolitu v Držovicích na Prostějovsku. In: Kršková, M. – Peška, J. (eds.) *Ročenka* 2017, Olomouc 2018, 80–101.
- Picariello G., Sacchi R., Addeo F., One-step characterization of triacylglycerols from animal fat by MALDI-TOF MS. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007, 109, 511–524.
- Stuchlík S., Stuchlíková J., *Pravěká pohřebiště v Moravské Nové Vsi-Hruškách*. Studie Archeologického ústavu AV ČR Brno 1996, XVI/1.
- Šmíd M., Hudební nástroj jako součást výbavy hrobu kultury se šňůrovou keramikou z Kostelce na Hané, *Pravěk* NŘ 9, 1999, Brno 2000, 197–209.

6.6 Fosfátová analýza – jedinečný pomocník (na pohřebištích Přerov-Předmostí 5 /KZP/ a Olomouc-Slavonín, Arbesova ulice /MŠK a ÚK/)

Jaroslav Peška, Jakub Smetana, Lukáš Kučera

Na řadě pravěkých pohřebišť se archeologové setkávají s tím, že v některých hrobech není ani stopy po kosterních ostatcích zemřelých, zatímco v jiných jsou dochovány lidské skelety více nebo méně dobře (**obrázek 6-16**). Odpovědět na otázku, zda se v takovém případě jedná o tzv. symbolický hrob (kenotaf – pohřeb s milodary, avšak bez uložení ostatků člověka), nebo zde původně kostrový pohřeb uložen byl, ale agresivním složením a chemickými reakcemi v půdě došlo během dlouhé doby k jeho celkovému strávení, slouží fosfátová analýza. Při fosfátové analýze měříme absorbanci vybarveného roztoku (viz dále), na základě které vypočítáme pomocí příslušné kalibrace koncentraci fosforečnanů v půdě.



Obrázek 6-16 Příklad hrobu (H 30) KZP se zachovalou kostrou. Foto M. Kalábek.

Většinou se tak děje odběrem velkého množství vzorků půdy ze dna hrobové jámy (např. v síti 20 × 20 cm) po vyzvednutí hrobové výbavy. **Zapomenout samozřejmě nelze na tzv. referenční vzorek podloží odebraného blízko hrobové jámy**, abychom znali obsah fosfátů v panenské půdě a mohli tak spolehlivě prokázat rozdílné hodnoty na dně hrobu. Rozložení koncentrace fosfátů je na fotografiích půdorysu hrobů graficky odstupňováno odstíny šedé a černé barvy (nejvyšší koncentrace). Z jejich rozložení jsme pak schopni zjistit, zda se v hrobě původně nacházely lidské ostatky nebo organický materiál živočišného původu i jejich předpokládanou pozici.

V prvním kroku je nutné připravit půdní extrakty postupem podle Mehlicha 3. Principem metody je extrakce extrakčním roztokem dle Mehlicha, vybarvovací reakce a následné spektrofotometrické měření. Extrakční roztok dle Mehlicha obsahuje fluorid amonný pro zvýšení rozpustnosti různých forem fosforu vázaných na hlinitokřemičitany a kyselinu dusičnou a octovou. K připraveným extraktům je přidáno vybarvovací činidlo Spectroquant (Merck KGaA, Německo) a vzorky jsou ihned analyzovány pomocí UV-VIS spektrometru (v našem případě UV-1601, Shimadzu, Japonsko) při vlnové délce 690 nm. Jako slepý vzorek pro vynulování základní linie je použita destilovaná voda s činidlem Spectroquant. Kvantifikace probíhala s využitím regresní rovnice získané měřením absorbance kalibračních roztoků o známé koncentraci PO_4^{3-} iontů (0,10; 0,15; 0,20 a 0,25 mg/l). Pro lepší názornost jsou výsledky znázorněny namísto konkrétních hodnot koncentrace PO_4^{3-} iontů pomocí čtyřbarevného schématu, kdy nejnižší koncentrace je označena bílou barvou a nejvyšší černou. Druhá a třetí koncentrační hladina je zobrazena různými odstíny šedé.

V prvním kroku byla fosfátová analýza testována na příkladu hrobu, v němž je zachovalá kostra ve skrčené poloze na levém boku (vzorek z nálezů v lokalitě Přerov-Předmostí 5, H 38). Výsledkem bylo stanovení nejvyšší koncentrace fosfátů přesně v pozici uložení skeletu a také na dvou místech za hlavou a za nohama (v blízkosti keramických nádob), kde lze předpokládat patrně další milodary živočišného původu, které se zcela rozložily (**obrázek 6-17**). Na zmíněném pohřebišti kultury zvoncovitých pohárů ze závěru eneolitu (2500–2200 BC) v Předmostí 5, trati Široký, byla mezi 56 hrobů provedena fosfátová analýza v 8 případech a odebráno bylo na analýzu celkem 133 vzorků. S výjimkou H 11 všechny měřené objekty bez znatelných reliktních kostí poskytl v určitých oblastech výrazně vyšší koncentrace fosfátů než v referenčním vzorku a je tak zřejmé, že původně hroby obsahovaly skrčené kostry nebožtíků a někde také hrobové přídavky živočišného původu. Díky agresivitě prostředí uložení se však do doby výzkumu nezachovaly. V H 5 zaznamenáváme největší koncentraci fosfátů podél celé severní stěny jámy, v místech uložení keramických nádob, kde se mimo ně mohly nacházet

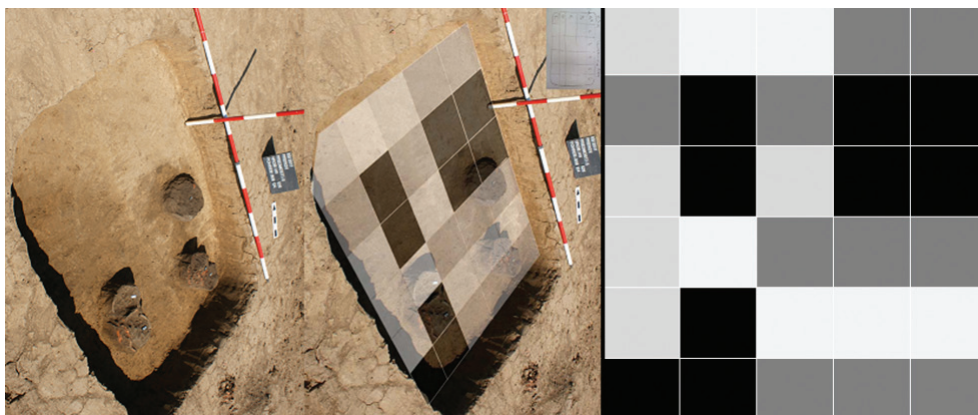
další organické přídavky, i když právě v této kultuře s častým zvykem masitou potravu ukládat na poměrně velké mísy. Zemřelý pak byl uložen jižně od nádob ve skrčené poloze s podélnou osou jámy. U západní stěny pak místo s podobně vysokou koncentrací může značit alokaci organického živočišného materiálu (**obrázek 6-18**). V H 9 se kostra nejspíše nacházela mezi nádobami, zvýšený obsah fosfátů v blízkosti keramických nádob (opakuje se) může být důsledkem jistého průsaku obsahu nádob tlakem zeminy často fragmentované anebo skutečné kumulace dalších organických milodarů živočišného původu do těchto míst (**obrázek 6-19**). Na pohřebišti kultury s moravskou šňůrovou keramikou z konce eneolitu (2600–2300 př. n. l.) a kultury únětické ze starší doby bronzové (2200–1800 př. n. l.) v Olomouci-Slavoníně na ulici Arbesova se ve vzájemné superpozici nacházely H 7 a 10 (**obrázek 6-20**). Starší šňůrový hrob se 4 oválnými žlábkami na dně a početnou keramickou kolekcí (6 nádob), párem měděných šroubovitých záušnic a pazourkovou čepelí byl bez kostry, zatímco v mladším únětickém H 10 ležela skrčená kostra na pravém boku, před tělem byla objevena kovová dýka a v klíně dvě silicitové šipky. Fosfátová analýza (61 vzorků) ze dna obou hrobových jam prokázala zcela jednoznačně přítomnost kostry v mladším hrobě (tu ostatně zachytil i výzkum), ale hlavně pozici nebožtíka, původně s vysokou pravděpodobností ve skrčené poloze, na dně staršího šňůrového hrobu, a to mezi žlábkami, kde tak pohřbený zaujímal centrální pozici. Vyšší koncentrace fosfátů uprostřed severovýchodní stěny hrobové jámy a v jejím západním rohu může vypovídat o umístění organických látek jako hrobových přídavků. Vše tak ukazuje na skutečnost, že většina studovaných pravěkých hrobových jam původně obsahovala živočišný materiál (někdy i zcela bez milodarů) a „prázdné“ jámy, resp. jámy jen s milodary a bez kostí, nejsou reálným odrazem pravěké skutečnosti. Tento fakt bychom si však bez fosfátové analýzy stěží dovedli představit, příp. jej správně interpretovat. Je tedy do budoucna žádoucí ještě větší míra využívání této přírodovědné metody archeology při výzkumech nekropolí. Alternativní rychlou technikou je RFA, která však nedisponuje dostatečnou spolehlivostí pro obsahy fosforu pod 1% hm. (viz. kap. 3.2.1.2).



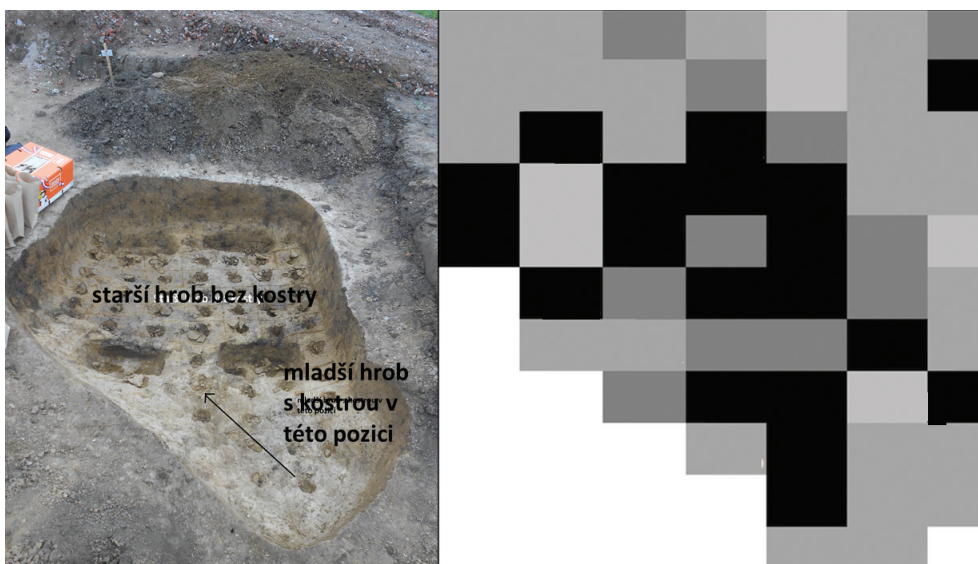
Obrázek 6-17 Přerov-Předmostí 5, Široký. Půdorys H 38 a výsledek fosfátové analýzy



Obrázek 6-18 Přerov-Předmostí 5, Široký. Půdorys H 5 s výsledkem fosfátové analýzy



Obrázek 6-19 Přerov-Předmostí 5, Široký. Půdorys H 9 s výsledkem fosfátové analýzy



Obrázek 6-20 Olomouc-Slavitín, Arbesova ulice. Superpozice hrobů šňůrové keramiky (H 7) a únětické kultury (H 10) s promítnutým výsledkem fosfátové analýzy do jejich půdorysu

6.7 Kultovní vozík nebo závěsná nádoba s labutí protomou z doby popelnicových polí ze Slovenska

Filip Ondrkál, Jaroslav Peška, Klára Jagošová,
Diana Sokolovská, Lukáš Kučera

Kultovní symboly, jako je slunce, kolo nebo vodní ptactvo, provází dobu bronzovou minimálně v celé Evropě. Nedávno byla škála těchto předmětů obohacena náhodným objevem bronzové skulptury labutě se svrchním otvorem do dutého těla a odříznutými končetinami, bohatě zdobená rytými ornamenty (**obrázky 6-21, 6-22**) s lokací do oblasti Liptovské kotliny (Liptovský Hrádok-Vislavce) na středním Slovensku (Ondrkál a kol., 2020), který byl podle všeho součástí mimořádného depotu bronzových předmětů (přilba typu Lúčky, spirálovité diadémy, bronzové nádoby, komponenty kultovního vozíku ve formě kol se zesílenými paprsky) v úctyhodné nadmořské výšce (902 m. n. m.). Tyto artefakty nás nechávají nahlédnout poměrně hluboko do náboženských představ a myšlení tehdejšího obyvatelstva. Ve snaze pochopit funkci a poslání artefaktu v kontextu nositele sociálně kulturního fenoménu své doby bylo přistoupeno k podrobné multidisciplinární analýze spočívající kromě typologicko-chronologické také

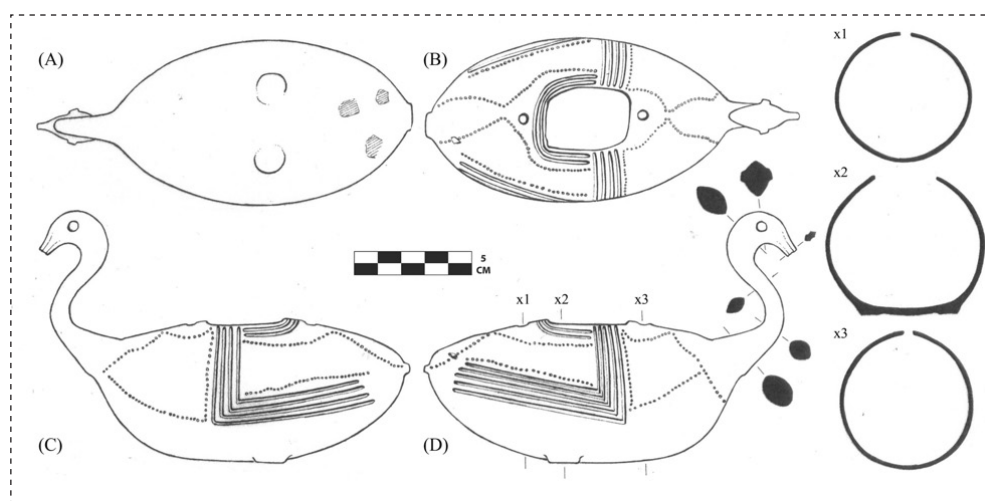


Obrázek 6-21 Liptovský Hrádok – Vislavce. Bronzová ornitomorfní nádoba ve tvaru labutě zdobená rytými ornamenty. Na těle jsou patrné reparační a odřezání, včetně odřezání nohou vodního ptáka. Foto F. Ondrkál.

v paleometalurgické analýze složení kovu a chemickém rozboru vnitřního obsahu nádoby (pokus o získání nepatrného množství původního sedimentu v jinak již „prázdné“ nádobě).

Rentgeno-fluorescenční analýza (Delta Dynamic pXRF Bas Rudice s. r. o., Česká republika) prokázala pozoruhodnou materiálovou heterogenitu, včetně sekundární manipulace, úmyslné deformace a reparace předmětu. Ve střední břišní části jsou jasně patrné stopy po úmyslném odřezání obou nohou ptáčích postavy a místo původního spojení s jinou kovovou součástí blíže zadní partie břicha nasvědčuje primárnímu umístění na bronzový vozík. Jednoznačné je také oddělení původní hlavy ptáka a nahrazení novým technologicky náročným a složitým procesem spojení obou kovů za pomoci vysokých teplot a retušování kontaktních ploch (přední část těla byla vystavena extrémním teplotám). Nádoba byla vyrobena z bronzu se zvýšeným obsahem cínu (10,20 a 10,24 %) v oku a v oblasti krku (jinde koncentrace cínu mezi 3,86–6,62 %), což poukazuje na fakt, že **oko a krk byly vyrobeny z jiné slitiny než zbytek těla**. Příměs minerálu gersdorffitu (NiAsS), vyskytujícího se v České republice, na Slovensku, ale také v Rakousku v okolí Salzburgu, nám bohužel jednoznačnou odpověď na otázku provenience suroviny nedá.

Vnitřní obsah nádoby byl analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Před samotnou analýzou bylo 200 mg materiálu extrahováno 1 ml roztoku aceton:chloroform v poměru 1:1 (v/v), po centrifugaci (5 min, 4400 RPM) byl kapalný podíl přepipetován do 1,5 ml skleněné vialky a od foukán proudem dusíku do sucha. Následně byl vzorek silanizován pomocí



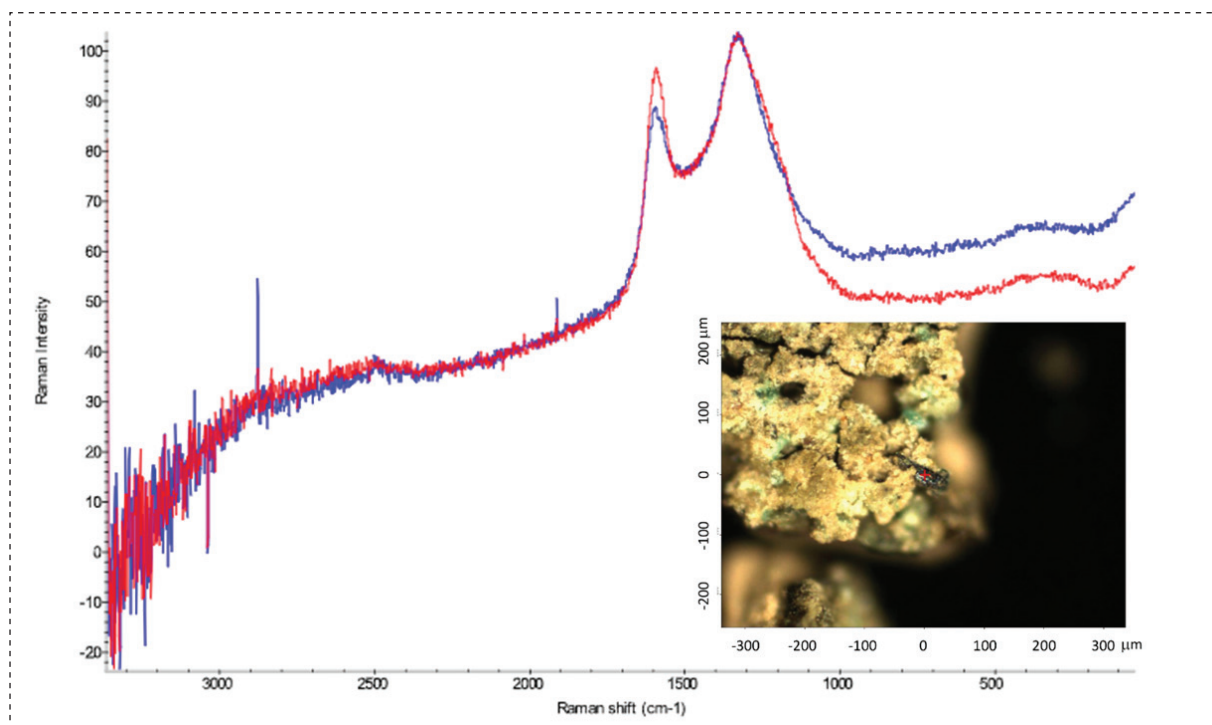
Obrázek 6-22

Liptovský Hrádok – Vislavce. Kresebná dokumentace závěsné nádoby s vodním ptákem, původně patrně součást ceremoniálního vozíku. Kresba A. Pešková.

50 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 50 µl pyridinu (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pro necílenou analýzu všech látek ve vzorku. Pro cílenou analýzu mastných kyselin bylo 10 mg pevného podílu hydrolyzováno a methylováno 20 µl roztoku MetPrep (Sigma Aldrich). Vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Agilent 7010 Triple Quadrupole GC/MS (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Separace probíhala na dvou v sérii zapojených kolonách (5%-Phenyl)-methylpolysiloxan HP-5 ms Ultra Inert (15 m × 0,25 mm × 0,25 µm, každá) s konstantním průtokem 1,0 a 1,2 ml/min. Teplotní gradient začínal na 70 °C, kde byla teplota udržována po dobu 5 minut, poté došlo k zahřívání na 320 °C s krokem 15 °C/min. Nástríkový objem byl 1 µl metodou splitless. **Analýza vzorku po methylaci prokázala přítomnost signálů mastných kyselin:** methyl isomyristát (retenční čas, RT 15.7 min.), methyl palmitát (RT 17.8 min.), methyl oleát (RT 19.5 min.) a methyl stearát (RT 19.7 min.). U silanizovaných vzorků byly detekovány látky: monomyristin, RT 20.6 min.; monopalmitin, RT 23.3 min, monostearin, RT 25.0 min a cholesterol (RT 28.2 min.). Z těchto výsledků lze dovodit, že **artefakt obsahoval živočišný tuk**, který mohl sloužit jako „palivo“ pro využití artefaktu jako závěsné nádoby – lampy. To by ostatně korespondovalo s makroskopickým pozorováním vnitřku nádoby, kde byly zaznamenány drobné černé útvary. Analýza pomocí Ramanova mikroskopu DRX2 (Thermo Scientific, parametry – laser 785 nm, energie laseru 1 mW, čas jedné expozice 2 s, počet expozic 128) prokázala, že se jedná o **amorfní uhlík, pravděpodobně saze (obrázek 6-23)**. Tyto výsledky jsou ve shodě s myšlenkou využití předmětu nejdříve jako součásti kultovního vozíku, ovšem nejspíše již sloužícího jako lampa, vezoucí očištný oheň. Vzácný artefakt byl sekundárně z vozíku odstraněn a využit jako samostatná závěsná nádoba – opět jako lampa. Analogie využití v pravěku Evropy najdeme (Novotná, 1991; Müller-Karpre, 2002). **Rovněž detekce živočišných tuků byla prokázána ve smyslu paliva pro lampy ve Středomoří i Egyptě**, včetně dokladů použití včelího vosku, ryb nebo tuku skotu (Evershed a kol., 1997; Colombini a kol., 2005; Copley a kol., 2005).

V průběhu doby bronzové dochází ke zviditelnění role ptáka v rámci zvířecího kultu, když např. ornitomorfní nádoby převládají po dlouhé období až po dobu halštatskou. Ke konci doby bronzové se stává jejich aplikace více standardizovanou a zejména vodní ptactvo dominuje. To je vnímáno jako symbol pohybující se ve více kosmologických sférách (voda, země, vzduch), takže se mýtický vodní pták mohl stát podstatnou součástí prehistorické kosmologie (Pásztor, 2017). Symbolické propojení mezi vozy, nádobami a vodním ptactvem se objevuje již s počátkem doby bronzové a ve Středomoří přežívá až do 3. tis. př. n. l. (Pare, 1989; 1992). Ornitomorfní kultovní vozy se poprvé objevují v Karpatské kotlině v kultuře Wietenberg v Rumunsku (Pare, 2004) se 2 typy zobrazení: stylizované

ptačí protomy zakomponované do těla vozů nebo volně stojící skulptury ptáků ve formě ornitomorfních nádob (Boroffka, 1994). Náš nález lze považovat za jakéhosi genetického předchůdce figurálních nádob typu Čičarovce, kdy plastika labutě byla původně umístěna na slavnostním kultovním vozíku, od kterého byla násilně oddělena a upravena tak, aby sloužila jako závěsná lampa. Tím se potvrzují starší úvahy o praktickém využití kultovních vozíků v sepulkrální kultuře a ceremoniální činnosti jako lampy (GC/MS analýza, relikty sazí a spálených usazenin). Figurální ornitomorfní nádobka z Liptovského Hrádku je mimořádně důležitou součástí kultovní symboliky pozdní doby bronzové v Evropě a je důkazem vysoké úrovně metalurgie té doby v severní části Karpatské kotliny, která byla schopna produkovat takto jedinečné, nestandardní a neopakovatelné výrobky, do nichž výrobce vložil nejen své technické dovednosti, ale také možná silné náboženské cítění. Vodní pták společně s vozem, ohněm, sluncem a vodou patřil k vedoucím symbolickým elementům doby bronzové. Je dost pravděpodobné, že primární součástí artefaktuálního kontextu byla také kolečka z kultovního vozíku (nalezená v depotu), vyjadřující mobilitu kultovního modelu v rámci dynamiky náboženských představ a rituálů.



Obrázek 6-23 Analýza černých zrn z vnitřní stěny bronzového artefaktu (červená linie), aktivního uhlí jako standardu (modrá linie) pomocí Ramanovy mikroskopie a fotografie analyzované oblasti.

Literatura

- Boroffka N., Die Wietenberg-Kultur. Ein Beitrag zur Erforschung der Bronzezeit in Südosteuropa. Universitätsforschungen zur prähistorischen Archäologie 19. Bonn 1994.
- Colombini M. P., Modugno F., Ribechini E., Organic mass spectrometry in archeology: evidence for Brassicaceae seed oil in Egyptian pramic lamps, *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 890–898.
- Copley M. S., Bland H. A., Prose P., Horton M., Evershed R. P., Gas chromatographic, mass spectrometric and stable carbon isotopic investigations of organic residues of plant oils and animal employed as illuminants in archaeological lamps from Egypt, *Analyst* 2005, 130, 860–871.
- Evershed R. P., Vaughan S. J., Dudd S. N., Soles J. S., Fuel for thought? Beeswax in lamps and conical cups from Late Minoan Crete, *Antiquity* 1997, 71, 979–985.
- Müller-Karpe H., Zum bronzenen Vogelgefäß von Čičarovce. Studie of the Ancient World in Honour of Mária Novotná. ANODOS 2002, 2, 213–215.
- Novotný M., Die Bronzegefäße in der Slowakei, *Prähistorische Bronzefunde* 2/11. Stuttgart 1991.
- Ondrkál F., Peška J., Jagošová K., Sokolovská D., Kučera L., The Cult-Wagon of Liptovský Hrádok: First evidence of using the Urnfield cult-wagons as fat-powered lamps, *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2020, 34, 102579.
- Pare C. F. E., From Dupljaja to Delphi: the ceremonial use of the wagon in later prehistory, *Antiquity* 1989, 63, 80–100.
- Pare C. F. E., *Wagons and Wagon-Graves of the Early Iron Age in Central Europe*. Oxford 1992.
- Pare C. F. E., Der Wagen der Bronzezeit in Mitteleuropa. In: Fansa, M. – Burmeister, S. (eds.) *Rad und Wagen. Der Ursprung einer Innovation – Wagen im Vorderen Orient und Europa*. Mainz 2004, 355–372.
- Pásztor E., Comments on bird symbolism of the Bronze Age Carpathian Basin and its possible relation to shamanism. In: Gheirghiu D., Bender H., Nash G. (eds.) *Archaeological Approaches to Shamanism: Mind-Body, Nature and Culture*. Newcastle 2017, 193–227.

KATALOGIZACE V KNIZE – NÁRODNÍ KNIHOVNA ČR

Moderní chemická analýza v archeologii. I. díl / Petr Bednář, Lukáš Kučera (eds.). — 1. vydání. — Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2021. — 1 online zdroj
Obsahuje bibliografie a bibliografické odkazy

ISBN 978–80–244–5949–3 (online ; pdf)

* 902.2 * 543.6 * 543.06 * 543.9 * 543.05 * 004.652 * (048.8:082)

- archeologické výzkumy
- aplikovaná analytická chemie
- analytické metody
- bioanalýza
- vzorkování
- databáze
- kolektivní monografie

543 – Analytická chemie [10]

Petr Bednář, Lukáš Kučera (eds.)

Moderní chemická analýza v archeologii I. díl

Odpovědný redaktor Jiří Slavík

Jazyková korektura Jiří Slavík

Návrh obálky a layout Lenka Wünschová

Sazba Jitka Bednaříková

Vydala Univerzita Palackého v Olomouci, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc
vydavatelstvi.upol.cz

1. vydání

Olomouc 2021

Neprodejná publikace

DOI: 10.5507/prf.21.24459486

ISBN 978-80-244-5948-6 (print)

ISBN 978-80-244-5949-3 (iPDF)

VUP 2021/0133 (print)

VUP 2021/0134 (iPDF)



Kniha je zaměřena na využití moderních technik a metod chemické analýzy v archeologickém výzkumu. Popisuje analytické postupy od odběru vzorku přes jeho úpravy až po analytickou koncovku a zpracování dat v kontextu spolupráce analytika s archeologem. Ačkoli jsou uváděny i klasické techniky, těžištěm knihy je využití moderních instrumentálních analytických technik.

Vzhledem k nezastupitelnosti bioanalytických metod v moderním archeologickém výzkumu obsahuje kniha i obsáhlou kapitolu zaměřenou na analýzu biomakromolekul s přesahem do archeogenetiky a analýzy proteinů. Kniha reflektuje multidisciplinaritu výzkumu v archeologii a oblasti kulturního dědictví a naznačuje potenciál využití propojení výsledků z oblastí metabolomiky, proteomiky a genetiky. Každá tato kapitola je syntézou přehledu informací z původní časopisecké literatury, vlastní práce autorů a kritického zhodnocení stavu poznání v dané oblasti.

Kniha ukazuje příležitosti uplatnění systematického přírodovědného výzkumu v řadě aplikačních a kauzálních kapitol, vycházejících ze zkušeností autorů a z jejich minulého a současného výzkumu, i s výhledem do nejbližší budoucnosti. Je určena archeologům, kterým poskytne podrobné informace o možnostech, ale i úskalích současných analytických postupů a chemikům – analytikům se zájmem o výzkum v oblasti historie, archeologie a kulturního dědictví.



The book is devoted to the utilization of modern techniques and methods of chemical analysis in archaeological research. It describes analytical procedures in the context of cooperation between analyst and archaeologist – starting from sampling, further through sample preparation and up to the analysis itself. Although classical techniques are also presented, the book is focused on the use of contemporary instrumental analytical techniques. Due to the irreplaceability of bioanalytical methods in modern archaeological research, the book also contains an extensive chapter focused on the analysis of biomacromolecules with an overlap into archaeogenetics and protein analysis. The book reflects the multidisciplinary nature of research in archaeology and heritage science and indicates the potential of utilization of linking results from the fields of metabolomics, proteomics and genetics. Each of these chapters represents a synthesis of an overview of information from the original journal literature, the authors' own work and a critical evaluation of the state of research in the field.

The book presents the opportunities for application of systematic scientific research in a number of applications and causal chapters, based on the experience of the authors and their past and current research and with a prospect to the near future. It is intended for archaeologists to provide them with detailed information on the possibilities as well as the pitfalls of current analytical procedures and for analytic chemists interested in research in the field of history, archaeology and cultural heritage.