

MOLEKULÁRNĚ-SPECIFICKÁ RADIOUHLÍKOVÁ ANALÝZA

VERONIKA BRYCHOVÁ^a, LUCIE DAVIDOVÁ^b, IVO SVĚTLÍK^a,
KATEŘINA PACHNEROVÁ BRABCOVÁ^a, MARKÉTA PETROVÁ^{a,c} a GABRIELA FLORESCU^d

^a Oddělení dozimetrie záření, Ústav jaderné fyziky AV ČR v.v.i., Husinec-Řež 130, Řež 250 68, ^b Department of Chemistry-BMC, Uppsala University, 751 23 Sweden, ^c Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze, Břehová 7, 115 19 Praha, ^d Department of Geography, Stefan cel Mare University of Suceava, Universitatii 13, 720229, Romania
brychova@ujf.cas.cz

Došlo 30.11.22, přijato 6.1.23.

Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza hraje důležitou roli v nových metodických postupech radiouhlíkového datování. Díky moderním analytickým možnostem lze molekulárně-specifickým přístupem určit stáří u vzorků, které by jinak byly, ať už kvůli své heterogenní povaze či vlivu sekundární kontaminace, nedatovatelné. Cílem tohoto příspěvku je přiblížit problematiku molekulárně-specifického přístupu v radiouhlíkovém datování a ukázat některé konkrétní aplikace, které již byly v rámci této metodiky vyzkoušeny a zavedeny.

Klíčová slova: molekulárně-specifická radiouhlíková analýza, preparativní plynová a kapalinová chromatografie, AMS, radiouhlíkové datování, lipidy

Obsah

1. Úvod
2. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza
3. Preparativní plynová chromatografie v molekulárně-specifické radiouhlíkové analýze
4. Preparativní kapalinová chromatografie v molekulárně-specifické radiouhlíkové analýze
5. Hlavní aplikace molekulárně-specifické radiouhlíkové analýzy
 - 5.1. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza lipidů v archeologické keramice
 - 5.2. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza sedimentárních vrstev
 - 5.3. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza při datování kostního kolagenu
6. Závěr

1. Úvod

Metoda radiouhlíkového datování využívá přeměny radioaktivního izotopu ^{14}C k určení stáří materiálů složených z uhlíku a jeho sloučenin. Díky poločasu přeměny ^{14}C ($T_{1/2} = 5700 \pm 30$ let)¹ lze určit stáří uhlíkatých materiálů vytvořených v časovém horizontu posledních 55 tisíc let¹. Vhodné vzorky pro radiouhlíkové datování musí splňovat princip uzavřenosti, což znamená, že výměna datované chemické formy uhlíku mezi vzorkem a okolním prostředím musí být zanedbatelná². Vzorky jsou však často

tvořeny směsí organických látek³ a v některých případech pocházejí tyto látky z různých zdrojů a rezervoárů³ a datování celkového vzorku by tak nepřineslo relevantní výsledek, jelikož není jasné, jaká událost ve vzorku je vlastně datována. V takových případech je nutné zvážit, zda by k přesnějšímu určení stáří zkoumaného vzorku nemohl přispět molekulárně-specifický přístup, ve kterém je možné tyto rušivé vlivy odstranit^{3,4}.

2. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza

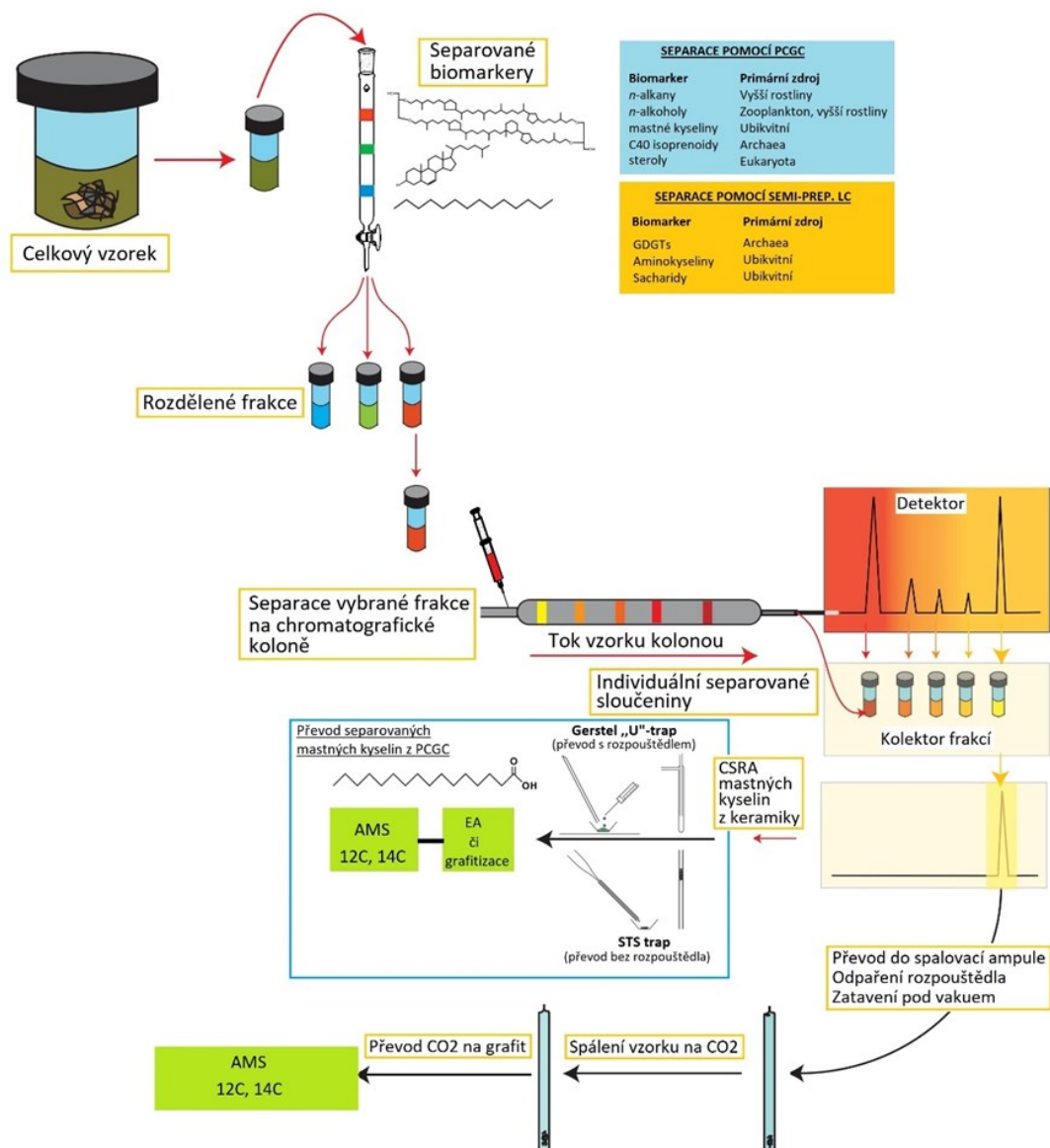
Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza (Compound Specific Radiocarbon Analysis, CSRA) patří mezi relativně nové metodické postupy v problematice radiouhlíkového datování⁵. Rozvoj této aplikace umožnil v polovině 90. let minulého století zejména technický vývoj potřebného přístrojového vybavení v oblasti kapalinové a plynové chromatografie, a možnost koncového určení množství atomů ^{14}C v datovaném vzorku metodou urychlovačové hmotnostní spektrometrie (accelerator mass spectrometry, AMS)⁶, díky které lze v relativně krátkém čase s vysokou přesností měřit i mikrogramy uhlíku obsaženého ve zpracovaném vzorku^{1,7}.

Klasické předúpravy vzorků za účelem radiouhlíkového datování zahrnují přečištění a izolaci dílčí frakce ze vzorku, např. izolaci bílkovinné frakce z kostí či zubů⁸. Princip CSRA spočívá v rozdělení heterogenní směsi izolované ze vzorku přímo na jednotlivé reprezentativní mo-

lekuly, tzv. biomarkery, které mají přímou souvislost se vzorkem a mohou být následně datovány^{3,7}. Přístup CSRA zároveň vyžaduje technicky i finančně nákladné přístrojové laboratorní vybavení³.

V přírodních vzorcích jsou většinou biomarkery přítomny v relativně malých koncentracích (typicky v řádu jednotek až desítek $\mu\text{g g}^{-1}$ celkového vzorku), CSRA přístup je proto spojen se složitějšími úpravami vzorků^{3,9}. Vzorky jsou nejprve extrahovány nebo hydrolyzovány, následně je celkový extrakt chromatograficky (na přístroji či kolonovou chromatografií) separován na třídy sloučenin (obr. 1). Pokud je požadována jen třídní specifita, mohou

se datovat pouze tyto frakce^{9–11}. Datováním frakcí, v nichž je přítomno potenciálně vyšší množství datovatelného uhlíku, však ve většině případů nelze získat relevantní výsledek stáří. Důvodem je, že měření je zatíženo vyšší chybou (kontaminace „mladším“ „starším“ uhlíkem pocházejícím z různých zdrojů a rezervoárů), než když je separována pouze jedna individuální sloučenina reprezentující konkrétní zdroj^{3,12}. Pro separaci individuálních sloučenin v čistotě a množstvích dostatečných pro AMS jsou celkové extrakty či dílčí frakce dále separovány metodou kapilární plynové chromatografie (preparativní capillary gas chromatography, PCGC) nebo semi-preparativní kapa-



Obr. 1. Schéma průběhu CSRA (upraveno podle cit. 5,19,23)

linové chromatografie (preparative liquid chromatography, PLC), propojené se sběračem frakcí⁷ (obr. 2). Izolované sloučeniny jsou poté spáleny na oxid uhličitý a měřeny přes přímý vstup CO₂ či po redukcii na grafit pomocí AMS⁵. Množství taktó separovaných molekul se obvykle pohybuje od desítek mikrogramů po maximálně 1 miligram (cit.^{3,11}), což klade další nároky na výslednou čistotu vzorku i jeho zpracování před samotným měřením metodou AMS.

Birkholz a spol.¹³ ve své studii uvedli, že pro relativně přesné určení stáří vzorku pomocí CSRA přístupem ve spojení s AMS je zapotřebí získat alespoň 25 µg uhlíku, přičemž grafitizační krok, následující po izolaci a spálení vzorku na CO₂, je hlavním limitujícím faktorem s ohledem na možnou další ztrátu uhlíku ze vzorku a zvyšující se hodnoty požadových vzorků⁷. Největší potenciál, co se týče hmotnosti izolovaného vzorku, má spojení elementárního analyzátoru přímo s urychlovačem (EA-AMS)¹⁴ – tak lze vynechat proces grafitizace a snížit tím i nároky na množství původního vzorku (automatické měření vzorků o množstvích pod 100 µg uhlíku)^{7,15}. V některých případech lze však stále pozorovat problém vyšších hodnot pozadí (plynoucích i z křížové kontaminace mezi jednotlivými měřeními vzorky)¹⁵. Vyčíslení možného přídavku cizorodého uhlíku během extrakčních a preparačních kroků, které CSRA zahrnuje, je zásadní pro správnou interpretaci radiouhlíkových dat³. Tento přídavek lze vyhodnotit pouze důsledným používáním procesních standardů a požadových vzorků^{16–18}, které by měly monitorovat celý proces CSRA od extrakce po AMS měření a dokládat i reprodu-

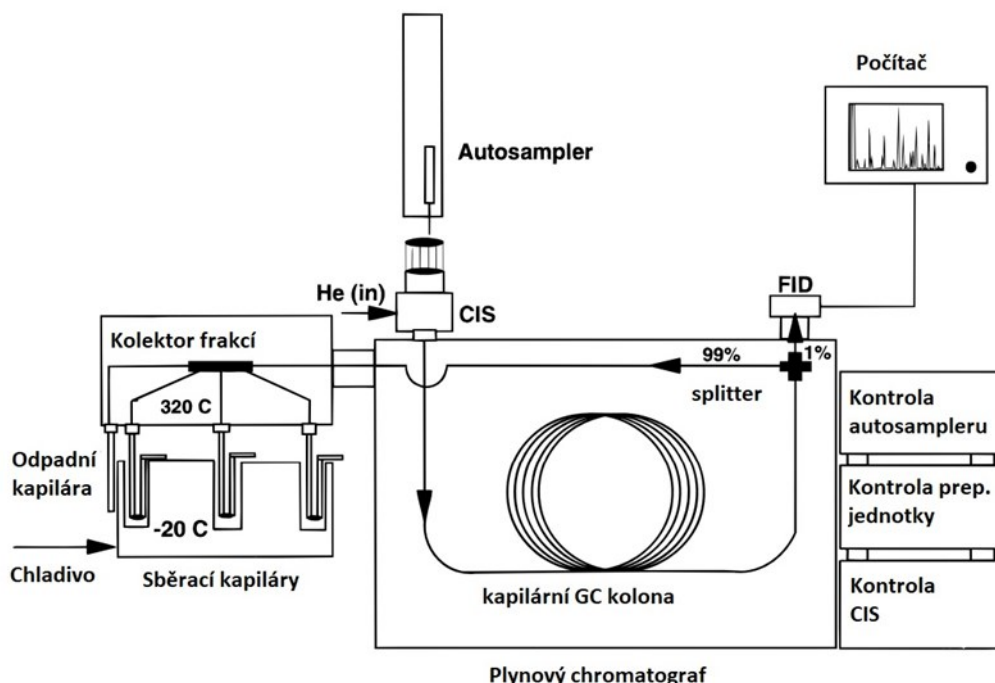
kovatelnost CSRA aplikace. Míra ovlivnění výsledku možnou kontaminací z procesu CSRA se zvyšuje se stářím zkoumaného vzorku a snižujícím se množstvím izolované látky¹⁴.

Příklady nejčastějších sloučenin a jejich původních zdrojů spolu se základním schématem aplikace CSRA je uveden na obr. 1.

3. Preparativní plynová chromatografie v molekulárně-specifické radiouhlíkové analýze

V rámci problematiky CSRA s koncovou analýzou uhlíku metodou AMS nachází PCGC ve spojení s kolektorem frakcí (obr. 2) uplatnění v separaci, přečištění a izolaci těkavých či středně těkavých organických sloučenin¹⁶. Jako první byly pro CSRA cíleny lipidické biomarkery z extraktů půdy³, mořských a jezerních sedimentů^{3,4} či archeologické keramiky^{18,20}. Vyšší výtěžky izolovaných biomarkerů lze získat opakovanými nástřiky vzorku na chromatografickou kolonu, použitím širších GC kolon (průměr min. 0,53 mm)¹⁸ a chlazeným záchytem v programovatelném kolektoru frakcí, kterým lze po separaci maximálně eliminovat potenciální ztráty separovaného vzorku²¹.

Pro nástřik vzorků se s výhodou používá teplotně programovatelný split/splitless nástřik (programmed temperature vaporizing inlet, PTV), který lze kryogenně chla-



Obr. 2. Schéma PCGC (upraveno podle cit.^{22,23}) CIS – cooled injection system, FID – flame ionization detector, GC – gas chromatography

dit pomocí CO₂ či kapalného N₂, a tím zamezit ztrátám těkavějších složek nastříkovaného vzorku současně s nastříknutím vyššího množství vzorku na chromatografickou kolonu. Separace látek zpravidla probíhá na chromatografických kolonách se stacionární fází tvořenou z 95 či 99 % cyklickými dimethylpolysiloxany. Používané kolony by zároveň měly být odolné vůči potenciálnímu uvolnění stacionární fáze (tzv. column bleed), aby nedocházelo k dodatečnému přidání cizorodého uhlíku k separovanému uhlíku. U moderních GC kolon je tento přídavek zanedbatelný a nemá tak vliv na výsledné stáří měřeného vzorku¹⁸. V klasickém uspořádání PCGC je konec chromatografické kolony přiveden do křížového separátoru (splitter), ve kterém se proud separovaných látek rozdělí a z 99 % prochází inaktivovanou kapilárou (transferline) do kolektoru frakcí a pouze 1 % separovaných látek je spáleno v plamenově ionizačním detektoru (flame ionization detector, FID) pro kontrolu průběhu separace. Pokud je PCGC připojen ke kolektoru frakcí Gerstel²⁴, lze látky v předem definovaných časech separovat do 6 na sobě nezávislých sběracích kapilár (objem od 1 do 100 µl). Mikroprocesor ovládající sběr frakcí je schopen přepínat mezi jednotlivými sběracími okny s přesností na 0,01 min, což umožňuje oddělit i látky, které jsou z kolony eluovány těsně u sebe^{22,24}, o vysoké čistotě (zpravidla vyšší než 90 %)¹⁸.

Množství separované látky pomocí PCGC po několika desítkách nástřiků (40 až 50 opakování) většinou nepřesahuje 300 µg (při koncentraci nástřiku 5 µg rozpouštěného vzorku v 1 µl rozpouštědla)¹⁹. Po ukončení analýzy jsou izolované látky ze sběracích kapilár vymývány organickým rozpouštědlem, které je následně ze vzorku odpařeno pod proudem inertního plynu a izolovaná látka je dále zpracována pro radiouhlíkové datování (spálení na CO₂ a redukce na grafit před měřením metodou AMS). Nicméně, použitím organického rozpouštědla pro vymytí izolované látky lze opět do celého procesu CSRA zanést kontaminaci cizorodým uhlíkem, jelikož následně odpaření rozpouštědla zpravidla neproběhne kvantitativně. Kontaminace uhlíkem v izolovaném vzorku po PCGC analýze pocházející ze stacionární fáze a použitého rozpouštědla byla prokázána pomocí NMR analýzy separovaných látek¹⁸. Proto Casanova a spol.²⁵ ve své studii věnující se CSRA mastných kyselin pro určení stáří lipidů, adsorbovaných v archeologické keramice, použili pro separaci cílených lipidických látek sběrací kapiláry naplněné skelnou vatou. Skelná vata zachytila izolované látky a pro jejich převedení do spalovací jednotky na CO₂ nebylo potřeba organické rozpouštědlo, protože látky byly spáleny v elementárním analyzátoru přímo ve skelné vatě¹⁹ (obr. 1). Tímto způsobem lze v současnosti nejpřesněji datovat lipidy obsažené v archeologické v keramice²⁰ a aplikace „bezrozpuštědlových“ (solventless trapping system, STS) sběracích kapilár v CSRA problematice by šla potenciálně rozšířit i na molekulárně-specifické datování lineárních alkanů či alkenonů, pocházejících z půdních, jezerních a mořských sedimentárních vrstev a jiné lipofilní biomarkery (viz obr. 1).

Na závěr této kapitoly je nutné dodat, že preparativní plynový chromatograf s kolektorem frakcí s výše popsaným uspořádáním je součástí přístrojového vybavení nové AMS laboratoře Ústavu jaderné fyziky AV ČR v.v.i. (cit.^{26,27}), proto některé části textu čerpají ze zkušeností z provozu přístroje.

4. Preparativní kapalinová chromatografie v molekulárně-specifické radiouhlíkové analýze

Semi-preparativní vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií lze v rámci CSRA problematiky využít především k separaci netěkavých polárních sloučenin o vyšších molekulových hmotnostech, u nichž není nutné, na rozdíl od PCGC, zařadit před separační krok derivatizaci^{5,28}. Jedná se o sacharidy, aminokyseliny, polyaminy či glycerol(dialkyl)glycerol tetraether (tzv. GDGTs – komplexní membránové lipidy archebakterií)^{11,13}.

Kapalinový chromatograf je opět napojen na programovatelný kolektor frakcí, ve kterém lze sběr frakcí nastavit dle retenčních časů separovaných látek nebo na základě jejich hmotnosti, pokud je chromatograf a dělicí zařízení napojeno na hmotnostní spektrometr, který monitoruje látky separovaného vzorku³. Oproti PCGC lze v případě preparativní kapalinové chromatografie rozdělit vyšší množství žádaných sloučenin (v řádu miligramů), a to pouze v jednom nástřiku¹⁴. K rozdělení dostatečného množství látek se opět používají vysokokapacitní chromatografické kolony, například s kyselou stacionární fází s negativně nabitými funkčními skupinami (např. Primosep A) pro separaci kolagenních aminokyselin¹⁴ či kyanopropylovými skupinami navázanými na silikagelu pro rozdělení GDGTs izolovaných ze sedimentů²⁸. Stejně jako v případě PCGC je nutné monitorovat preparativní proces pomocí procesních standardů a pozadových vzorků, jelikož i v případě užití preparativní kapalinové chromatografie existuje riziko kontaminace uvolněné ze stacionární fáze²⁹ či z mobilní fáze, která nese vzorek kolonou^{7,13}.

5. Hlavní aplikace molekulárně-specifické radiouhlíkové analýzy

5.1. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza lipidů v archeologické keramice

Keramické nádoby a jejich fragmenty patří mezi běžné archeologické nálezy. Rozpouštědlovou extrakcí keramických nálezů bylo zjištěno, že se v porézních stěnách nádob, které v minulosti sloužily k přípravě, podávání či uchovávání stravy bohaté na tuk, dochovala rezidua původních lipidů. Lipidy jsou vhodnými radiouhlíkovými biomarkery, protože jsou rychle metabolizovány a vykazují tak z hlediska metod radiouhlíkového datování po-

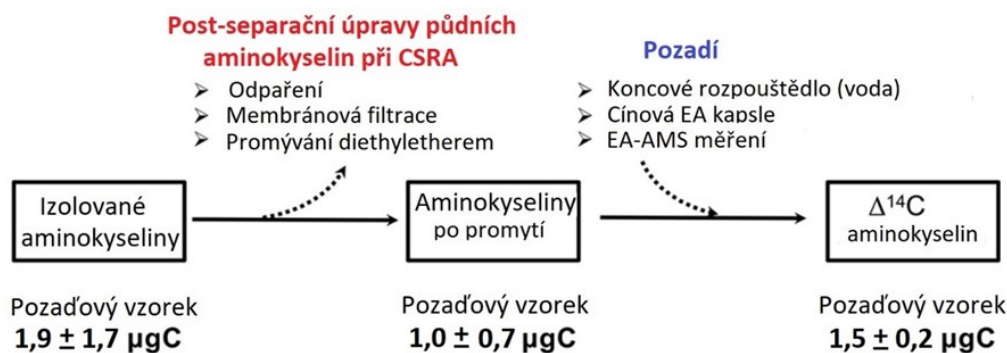
měrně krátký čas depozice. Navíc, v případě archeologické keramiky, jsou lipidy díky nízké mobilitě a hydrofobicitě pevně vázány v pórech keramiky a tím chráněny vůči okolnímu prostředí během jejich uložení v zemi^{30,31}. Mezi nejčastější lipofilní biomarkery patří především degradační produkty tuků, olejů či vosků – mastné kyseliny či mastné alkoholy, ale i zbytky pryskyřic – látky terpenoidní povahy, které jsou také lipofilní, a tím extrahovatelné nepolárními organickými rozpouštědly, i když se mezi lipidy formálně nezařazují³². Analýzou lipofilních biomarkerů lze získat více informací o způsobu obživy našich předků, funkci původních nádob a díky CSRA mastných kyselin, adsorbovaných v porézní keramické matici, určit i stáří nalezeného artefaktu^{20,31}. Jednou z výhod datování mastných kyselin dochovaných v keramice je, že izolované kyseliny mohou být přímo spojeny s komoditami, které byly v nádobách zpracovávány během jejich používání v minulosti²⁰. Totální lipidický extrakt (TLE) je z pozůstatků archeologických nádob získán například pomocí rozpouštědlové extrakce či okyseleným methanolem (direct methanolic extraction)³⁰, při níž dochází k rozrušení vazby mezi keramickou maticí a adsorbovanými lipidy, k methanolýze esterů glycerolu na methylestery mastných kyselin a glycerol a zároveň k esterifikaci volných mastných kyselin³⁰. Nejvíce zastoupenými mastnými kyselinami v lipidickém extraktu archeologické keramiky jsou kyseliny palmitová (C_{16:0}) a stearová (C_{18:0}). Pro izolaci těchto mastných kyselin z lipidického extraktu, a to v podobě jejich methylesterů³⁰, lze s výhodou využít PCGC s kolektorem frakcí. Klíčové je odstranění jakékoli externí uhlíkaté kontaminace a minimalizace jakéhokoli dalšího možného vstupu cizorodého uhlíku během finálního zpracování vzorku^{16,18}. V původních aplikacích CSRA mastných kyselin se k převedení mastných kyselin ze sběrací kapiláry do spalovacího reaktoru využívalo organické rozpouštědlo^{12,31}, které však mohlo vzorek kontaminovat cizorodým uhlíkem. Nejnovější postup CSRA mastných kyselin z archeologické keramiky dnes využívá tzv. bez-rozpouštědlových sběracích kapilár, při kterém jsou mastné kyseliny v podobě methylesterů izolovány v kolektoru frakcí do sběracích kapilár naplněných sklenou/křemennou vatou. Vata je pak převedena rovnou do spalovacího reaktoru bez potřeby výplachu sběrací kapiláry organickým rozpouštědlem. Použitím této metody lze získat přesné radiouhlíkové stáří i z nízkých koncentrací izolovaných mastných kyselin^{19,20,25}. V některých případech, především u přímořských archeologických lokalit, ve kterých byly v keramice detegovány lipofilní biomarkery, odkazující na mořský původ některých adsorbovaných lipidů, lze i v případě CSRA datování lipidů očekávat ovlivnění výsledné aktivity ¹⁴C tzv. mořským rezervoárovým efektem (marine reservoir effect, MRE)^{25,33}, který je nutný pro danou lokalitu vyhodnotit a zahrnout do výsledné interpretace stáří měřeného vzorku²⁵.

5.2. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza sedimentárních vrstev

Mořské či jezerní sedimenty v sobě mohou ukrývat informaci o geochemických pochodech a klimatických změnách v minulosti³⁴. K určení časového období těchto změn lze přispět i molekulárně-specifickým datováním organických sloučenin přítomných a konzervovaných v sedimentech v rámci dlouhého časového horizontu, obzvlášť pokud sedimentární vrstvy neobsahují žádné jiné potenciální vzorky k radiouhlíkovému datování jako uhlíky či rostlinné makrozbytky¹³. Přítomné organické sloučeniny tak mohou sloužit jako zástupci jednotlivých rezervoárů, zdrojů organického uhlíku, které lze metodou CSRA datovat. Extrahovatelné množství specifických biomarkerů, reprezentujících jednotlivé zdroje organického uhlíku v sedimentu se liší, obecně ale bývá velmi nízké (většinou v řádu jednotek až desítek mikrogramů uhlíku). Opět je tak kladen důraz na čistotu celého extrakčního a preparačního procesu a na kvantifikaci případné kontaminace cizorodým uhlíkem pomocí procesních pozadových vzorků. I tato aplikace vyžaduje náročnější technické laboratorní vybavení. Mezi organické biomarkery, které lze použít k CSRA datování sedimentárních vrstev a procesů, ke kterým v nich dochází, jsou řazeny především dlouhé alifatické lineární alkany (C₂₇–C₃₁)⁴, alkenony a steroly pocházející z rostlinných tkání a vosků^{22,34}, půdní aminokyseliny po hydrolyze z původně přítomných půdních proteinů a peptidů³⁵ či terpenoidní GDGTs (lineární či rozvětvené) produkované půdními bakteriemi^{3,28}. Alifatické lineární alkany či alkenony lze z extraktů izolovat s využitím preparativní plynové chromatografie²², polárnější a výše-molekulární látky jsou izolovány s využitím preparativní kapalinové chromatografie, využívající široké preparační kolony s normální či reverzní stacionární fází^{7,13,28,35}. Posledním krokem před samotným spálením izolované látky na CO₂ a jejím měřením metodou AMS je kvantitativní odpaření mobilní fáze, ve kterém je izolovaná látka rozpuštěna, a promývání izolované frakce v organickém rozpouštědle pro odstranění možné stržené kontaminace ze stacionární fáze separační kolony. V případě aminokyselin je k tomuto účelu s úspěchem používán diethylether^{35,36} (obr. 3).

5.3. Molekulárně-specifická radiouhlíková analýza v datování kostního kolagenu

Alternativou pro přípravu kostních vzorků pro stanovení aktivity ¹⁴C je zaměřit se na datování jednotlivých aminokyselin přítomných v kostním kolagenu, čímž je možné potlačit molekulární a izotopické heterogenity celkového kolagenu způsobené sekundární kontaminací původem z uložení vzorků v zemi či z restaurátorského zásahu^{8,14,29}. V případě živočišných kostí je cíleno zejména na 4-hydroxyprolin, který tvoří asi 13 % celkového uhlíku savčího kolagenu^{14,37}. Metoda pro CSRA aminokyselin je rozdělena na několik kroků: extrakci a hydrolyzu kolagenu, separaci a finální přečištění aminokyselin, následované



Obr. 3. Schéma post-separačních úprav CSRA půdních aminokyselin a požadových vzorků při použití diethyletheru pro odstranění potenciální kontaminace uhlíkem ze stacionární fáze chromatografické kolony (upraveno podle cit.³⁶)

radiouhlíkovým měřením metodou AMS. Pro separaci aminokyselin je využívána semi-preparativní kapalinová chromatografie, která kombinuje interakci s reverzní fází s iontově-výměnnými interakcemi. Jako mobilní fáze je používána deionizovaná voda (<4 ng g⁻¹ C)^{8,1435}. CSRA 4-hydroxyprolinu byla s úspěchem aplikována především u vzorků velmi starých kostí (> 40 000 let BP), které vykazují hraniční koncentraci datovatelného ¹⁴C dostupnými detekčními metodami. Avšak takové nálezy bývají velmi vzácné a jsou obvykle kontaminovány sekundárními restaurátorskými zásahy^{8,14} znemožňujícími radiouhlíkové datování celkového vzorku.

6. Závěr

Metodou CSRA lze dnes s úspěchem datovat chemicky komplexní organické vzorky, které by jinak byly kvůli své heterogenní povaze z radiouhlíkového datování vyloučeny. Extrakcí a izolací cílených biomarkerů je možné získat informace o procesech, odehrávajících se v naší minulosti s přesahem do archeologie, environmentální geochemie, sedimentologie či paleoklimatologie³. Kromě náročnějšího technického vybavení je zapotřebí v rámci laboratorního zpracování vzorků pro CSRA implementovat i složitější extrakční a izolační postupy předúpravy, přičemž celý postup musí být monitorovaný pomocí procesních standardů a požadových vzorků¹⁶, které by měly sloužit jako „záchytné body“ před nesprávnou interpretací výsledku radiouhlíkového datování. Dodržením všech bodů separačního postupu však lze získat spolehlivé výsledky analýzy ¹⁴C i u velmi nízkých množství izolované látky.

Tato publikace vznikla na základě podpory z OP VVV MŠMT, v rámci projektu „Výzkum ultrastopových izotopů a jejich využití v sociálních a environmentálních vědách urychlovačovou hmotnostní spektrometrií“, „Reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000728“.

LITERATURA

1. Hajdas I., Ascough P., Garnett M. H., Fallon S. J., Pearson Ch. L., Quarta G., Spalding K. L., Yamaguchi H., Yoneda M.: *Nat. Rev. Methods Primers* 1, 62 (2021).
2. Světlík I., Dreslerova D., Limburský P., Tomášková L.: *Archeologické rozhledy* 59, 80 (2007).
3. Rosenheim B. E., Day M. B., Domack E., Schrum H., Benthien A., Hayes J. M.: *Geochem. Geophys. Geosyst.* 9, Q04005 (2008).
4. Mollenhauer G., Rethemeyer J.: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 5, 1 (2009).
5. Ingalls A., Pearson A.: *Oceanography* 18,18 (2005).
6. Tuniz C., Bird J. R., Fink D., Herzog G. F.: *Accelerator Mass Spectrometry: Ultrasensitive Analysis for Global Science*. CRC Press, Florida 1998.
7. Kusch S., Mollenhauer G., Willmes C., Hefter J., Eglinton T. I., Galy V.: *Org. Geochem.* 157, 104259 (2021).
8. Deviese T. a 12 spoluautorů: *Nat. Commun.* 10, 1 (2019).
9. Bronk Ramsey C.: *Archaeometry* 50, 249 (2008).
10. Wang X.-C., Druffel E. R. M., Griffin S., Lee C., Kashgarian M.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 1365 (1998).
11. Hwang J., Druffel E. R. M.: *Science* 299, 881 (2003).
12. Berstan R., Stott A. W., Minnitt S., Ramsey C., Hedges R. E. M., Evershed R. P.: *Antiquity* 82, 702 (2008).
13. Birkholz A., Smittenberg R. H., Hajdas I., Wacker L., Bernasconi, S. M.: *Org. Geochem.* 60, 9 (2013).
14. Deviese T., Comeskey D., McCullagh J., Bronk

- Ramsey C., Higham T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32, 373 (2018).
15. Wacker L., Fahrni S. M., Hajdas I., Molnar M., Synal H. A., Szidat S., Zhang Y. L.: *Proceedings of the 12th International Conference on Accelerator Mass Spectrometry* (Albert Zondervan A., Prior C., Bruhn F., Sparks R., ed.), str. 315. Elsevier, 2013.
 16. Haghypour N., Ausin B., Usman M. O., Ishikawa N., Wacker L., Welte C., Ueda K., Eglinton T. I.: *Anal. Chem.* 91, 2042 (2020).
 17. Sun S. a 13 spoluautorů: *Radiocarbon* 62, 207 (2020).
 18. Casanova E., Knowles T., Williams C., Crump M., Evershed R.: *Anal. Chem.* 89, 7090 (2017).
 19. Casanova E., Knowles T. D. J., Williams C., Crump M. P., Evershed R. P.: *Anal. Chem.* 90, 11025 (2018).
 20. Casanova E. a 19 spoluautorů: *Nature* 580, 506 (2020).
 21. Kim L., Marriott P. J., v knize: *Preparative Gas Chromatography. Gas Chromatography*, 1. vyd., str. 395. Elsevier, Inc., Waltham 2012.
 22. Eglinton T. I., Aluwihare L. I., Bauer J. E., Druffel E. R., McNichol A. P.: *Anal. Chem.* 68, 904 (1996).
 23. Davidová Lucie: *Izolace a separace organických reziduí z archeologického materiálu za účelem radiouhlíkového datování. Bakalářská práce. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2020.*
 24. Gerstel: *GC Preparative Fraction Collector – PFC (Německo)* <https://www.gerstel.com/products/pfc/>, staženo 30. 10. 2022.
 25. Casanova E., Knowles T. D., Ford C., Cramp L. J., Sharples N., Evershed R. P.: *Radiocarbon* 62, 1679 (2020).
 26. Kučera J. a 12 spoluautorů: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 527, 29 (2022).
 27. Kučera J., Němec M., John J., Světlík I., Pachnerová Brabcová K., Kameník J., Dreslerová D.: *European Symposium on Analytical Spectrometry and Czech-Slovak Spectroscopic Conference, Brno, September 4–9, 2022*, Book of Abstracts OL 33, str. 75. <http://esas-cssc2022.spektroskopie.cz/files/ESAS%202022%20BOOK%20OF%20ABSTRACTS.pdf>, staženo 30. 10. 2022.
 28. Smittenberg R. H., Hopmans E.C., Schouten S., Damsté J. S. S.: *J. Chromatogr. A* 978, 129 (2002).
 29. Linscott B., Spindler L., Chivall D., Zelechonok Y., Wood R.: *24th Radiocarbon Conference 10th 14C & Archaeology Conference Zurich, 11 – 16 September, 2022, Zurich, Switzerland*, Book of abstracts, str. 157. <https://radiocarbon24.ethz.ch/wp-content/uploads/2022/09/BookOfAbstracts.pdf>, staženo 30. 10. 2022.
 30. Correa-Ascencio M., Evershed R. P.: *Anal. Methods* 6, 1330 (2014).
 31. Stott A. W., Berstan R., Evershed R. P., Bronk-Ramsey C., Hedges R. E. M., Humm M. J.: *Anal. Chem.* 75, 5037 (2003).
 32. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin I.* 3. vyd., OSSIS, Tábor 2009.
 33. Cook G. T., Ascough P. L., Bonsall C., Hamilton W. D., Russell N., Sayle K. L., Scott E. M., Bownes J. M.: *Quat. Geochronol.* 27, 164 (2015).
 34. Kusch S., Mollenhauer G., Willmes C., Hefter J., Eglinton T. I., Galy V.: *Org. Geochem.* 157, 104259 (2021).
 35. Blattmann T. M., Montluçon D. B., Haghypour N., Ishikawa N. F., Eglinton T. I.: *Front. Mar. Sci.* 7, 174 (2020).
 36. Ishikawa N. a 11 spoluautorů: *Anal. Chem.* 90, 12035 (2018).
 37. McCullagh J., Marom A., Hedges R.: *Radiocarbon* 52, 620 (2010).
- V. Brychová^a, L. Davidová^b, I. Světlík^a, K. Pachnerová Brabcová^a, M. Petrová^{a,c}, and G. Florescu^d** (^a Department of Radiation Dosimetry, Nuclear Physics Institute CAS, Husinec-Rez, ^b Department of Chemistry-BMC, Uppsala University, Sweden, ^c Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University in Prague, Prague, ^d Department of Geography, Stefan cel Mare University of Suceava, Suceava, Romania): **Compound-Specific Radiocarbon Analysis**
- Compound-specific radiocarbon analysis has played important role in the methodology applied in radiocarbon dating since the development of modern analytical instrumentation. Thank to this evolution it is nowadays possible to radiocarbon date samples which would be normally considered as undatable due to their heterogenous nature or secondary contamination. The aim of this review is to introduce molecular-specific radiocarbon dating approach and show some particular applications already successfully tested and used in radiocarbon dating.
- Keywords:** molecular-specific radiocarbon analysis, preparative gas and liquid chromatography, AMS, radiocarbon dating, lipids
- Acknowledgements*
This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the European Union (European Structural and Investment Funds – Operational Program Research, Development and Education) in the frames of the project "RAMSES – Ultra-trace isotope research in social and environmental studies using accelerator mass spectrometry" (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000728).