

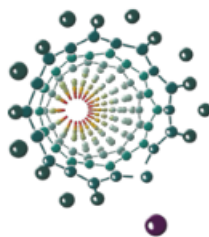
**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ**

Милица Б. Марковић

**СПЕКТРОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЖИВОТИЊСКИХ КОСТИЈУ
КАО МОДЕЛ СИСТЕМА У ФОРЕНЗИЦИ**

Докторска дисертација

Београд, 2025.



**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY**

Milica B. Marković

**SPECTROCHEMICAL ANALYSIS OF ANIMAL BONES AS A
MODEL SYSTEM IN FORENSICS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације

Ментори:

1. **Др Мирослав Кузмановић, редовни професор**, Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију
2. **Др Душан Димић, доцент**, Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

Чланови комисије:

1. **Др Биљана Шљукић-Паунковић, редовни професор**, Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију
2. **Др Мирослав Ристић, доцент**, Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију
3. **Др Биљана Станков, научни сарадник**, Универзитет у Београду, Институт за физику, Институт од националног значаја за Републику Србију

Захвалница

Захваљујем се менторима, проф. др Мирославу Кузмановићу и доценту др Душану Димићу, на несебичној помоћи, подршци, подељеном знању, разумевању и дивној атмосфери током израде докторске дисертације.

Велико хвала колегама, др Јелени Савовић, др Драгану Ранковићу, др Даници Бајук-Богдановић и Александри Шајић на пријатељским саветима, издвојеном времену и безрезервној помоћи приликом експерименталног рада на докторској дисертацији.

Велику захвалност дугујем и професору др Игору Паштију, дописном члану САНУ, на великој помоћи при изради дела експерименталног рада.

Захваљујем се члановима комисије, проф. др Биљани Шљукић-Паунковић, доценту др Мирославу Ристићу и научном сарднику др Биљани Станков на стрпљењу да прочитају дисертацију и корисним сугестијама које су ми дали.

Хвала мојој Љутој, мојим играчима, малим балеринама и друштву из терететане који су ми помогли да докторске студије завршим кроз игру, са осмехом, дивним успоменама и много јача и спремнија.

Највећу захвалност дугујем мојим родитељима, сестри, тетци, течи и зету без чије подршке и љубави данас не бих била овде. Посебан елан и чар мојим докторским студијама дала је моја Ђурђа и чињеница да сам на почетку овог путовања постала тетка.

Милица Марковић

Сажетак

Предмет испитивања у оквиру ове докторске дисертације је била анализа површине и хемијског састава хемијски третиране рамене кости домаће свиње, применом метода атомске и молекулске спектрохемије и анализе површина. Истраживање у целини подвлачи веома сложен однос између хемијских и физичких промена у структури кости третиране киселинама различитих јачина, што може имати потенцијалне импликације у форензичким/археолошким/медицинским, истраживањима која се баве разградњом људских остатака, или карактеризацијом биолошких апатита.

У оквиру предложене теме урађена је оптимизација LIBS технике за елементну анализу главних компонената и трагова у узорку хемијски третиране и нетретиране свињске рамене кости, применом ласерских извора зрачења различитих карактеристика, TEA-CO₂ и Nd:YAG ласера и испитивање утицаја киселина на хемијски састав свињске кости. Дијагностика плазме оптичком емисионом спектроскопијом је подразумевала одређивање главних карактеристика плазме као што су температура и концентрација електрона. Температура плазме је била одређена методом односа интензитета спектралних линија, а концентрација електрона из Штарковог профила спектралних линија. Као извор зрачења коришћени су TEA-CO₂ ласер, развијен у Институту за нуклеарне науке Винча, и комерцијални Nd-YAG ласер. Добијени параметри плазме су корелирани за тврдоћом костију, посебно за оне изложене дејству киселина. Профилометријска анализа свињске кости је урађена са циљем процене степена деструктивности методе и достизања довољног степена резолуција за мапирање дубинског и површинског елементног састава свињске кости. Профилометријска мерења су омогућила добијања димензија и дубина аблацијских кратера повезаних са интеракцијом ласерског зрачења, емитованог од стране TEA CO₂ ласера, са узорком свињске кости. Такође, дубинска профилација кости омогућила је увид у различити хемијски састав површинског слоја и унутрашњости костију, што је посебно било од интереса за разматрање утицаја киселина.

Применом метода вибрационе молекулске спектроскопије, ATR-FTIR и раманске спектроскопије праћен је утицај концентрације (0,01; 0,1 и 1 M), и времена трајања деловања (1-14 дана) хлороводоничне, флуороводоничне, сирћетне и сумпорне киселине на хемијски састав кости. Анализиране су спектралне области у којима се јављају вибрационе траке које се асигнирају вибрацијама функционалних група које су карактеристичне за органске и неорганске конституенте кости, протеинску матрицу и матрицу хидроксиапатита. Разлагањем спектралних трака Фуријеовом деконволуцијом у области амида I вибрације (1700-1600 cm⁻¹), вибрација фосфатне (1200-900 cm⁻¹) и карбонатне (650-500 cm⁻¹) групе добијен је увид у присуство различитих компонената у протеинској матрици и хидроксиапатиту испитиване кости, у зависности од испитиваног медијума и концентрације. Резултати указују да концентрације киселине и време излагања значајно утичу на степен деминерализације неорганске фазе и интегритет колагена. Квантитативни параметри квалитета кости, однос органске и неорганске фазе, индекс кристалинжности, садржај карбоната, полуинтензитетска ширина трака и зрелост колагена били су индикатор структурних и функционалних карактеристика третиране кости. Квантитативна анализа елементног састава хемијски третиране кости као и раствора киселина, у којима су кости стајале, испитана је применом аргоном стабилизованог лука, атомске апсорпционе спектрометрије и ICP-OES технике са циљем добијања комплетног увида у степен деминерализације кости под дејством киселина. Такође је извршена корелација квантитативних параметара квалитета кости (односа органске и неорганске матрице, индекса кристалинжности, полуинтензитетске ширине линије, односа садржаја карбоната и фосфата) добијених различитим вибрационим методама (ATR-FTIR и RS) и LIBS техником. Анализа површине хемијски третиране кости, применом SEM-EDX методе омогућила је добијање слике површине узорка високе резолуције и хемијског састава третиране кости.

Кључне речи: свињска кост, деминерализација, форензичка анализа, утицај киселина; LIBS, AAS, ATR-FTIR, раманска спектроскопија; SEM-EDX

Научна област: Физичка хемија

Уже научне области: Физичка хемија – спектрохемија, Физичка хемија – форензика

Abstract

The subject of this doctoral dissertation was the analysis of the surface and chemical composition of the chemically treated shoulder bone of a domestic pig, using the methods of atomic and molecular spectrochemistry and surface analysis. The research as a whole highlights a very complex relationship between chemical and physical changes in the structure of bone treated with acids of different strengths, which may have potential implications in forensic/archaeological/medical research, research dealing with the decomposition of human remains, or the characterization of biological apatites.

Within the framework of the proposed topic, optimization of the LIBS technique for the elemental analysis of the main components and traces in a sample of chemically treated and untreated pork shoulder bone, using laser radiation sources of different characteristics, TEA-CO₂ and Nd:YAG lasers, and testing the effect of acids on the chemical composition of pork bone were done. Diagnostics of plasma by optical emission spectroscopy meant determining the main characteristics of plasma such as temperature and electron concentration. The plasma temperature was determined by the spectral line intensity ratio method, and the electron concentration from the Stark profile of the spectral lines. The TEA-CO₂ laser, developed at the Institute of Nuclear Sciences in Vinča, and the commercial Nd-YAG laser were used as radiation sources. The obtained plasma parameters are correlated with the hardness of the bones, especially for those exposed to the action of acids. The profilometric analysis of pig bone was performed with the aim of assessing the degree of destructiveness of the method and reaching a sufficient degree of resolution for mapping the deep and surface elemental composition of pig bone. Profilometric measurements made it possible to obtain the dimensions and depths of the ablation craters associated with the interaction of the laser radiation, emitted by the TEA-CO₂ laser, with the pig bone sample. Also, in-depth bone profiling enabled insight into the different chemical composition of the surface layer and inside the bones, which was of particular interest for considering the influence of acids.

Using the methods of vibrational molecular spectroscopy, ATR-FTIR and Raman spectroscopy, the influence of the concentration (0.01, 0.1 and 1 M) and duration of action (1-14 days) of acids (hydrochloric, hydrofluoric, acetic and sulfuric acid) on the chemical composition of the bone was monitored. Spectral areas in which vibrational bands, assigned to the vibrational modes characteristic of organic and inorganic bone constituents, protein matrix and hydroxyapatite matrix, were analyzed. By applying Fourier deconvolution of vibrational bands in Amide I (1700-1600 cm⁻¹), phosphate (1200-900 cm⁻¹) and carbonate (650-500 cm⁻¹) regions, insight into the presence of different components in the protein matrix and hydroxyapatite of the examined bone was obtained, depending on the medium and its concentration. The results indicated that acid concentrations and exposure time significantly affect the degree of demineralization of the inorganic phase and the integrity of collagen. Quantitative parameters of bone quality, organic to inorganic phase ratio, crystallinity index, carbonate content, half-intensity band width, and collagen maturity were indicators of the structural and functional characteristics of the treated bone. Quantitative analysis of the elemental composition of the chemically treated bone as well as the acid solution in which the bones were kept was examined using an argon-stabilized arc, atomic absorption spectrometry and ICP OES technique with the aim of obtaining a complete insight into the degree of bone demineralization under the action of acids. The correlation of quantitative parameters of bone quality (ratio of organic and inorganic matrix, crystallinity index, half-intensity line width, ratio of carbonate and phosphate content) obtained by different vibration methods (ATR-FTIR and RS) and LIBS technique was also performed. The analysis of the superficial chemically treated bone, using the SEM-EDX method, gave a high-resolution image of the surface of the sample. By working with a detector for energy dispersive spectroscopy (EDX), it was possible to simultaneously obtain the chemical composition of the surface, and by adjusting the detector so that it responded to a certain wavelengths (of a certain elements), a picture of the

distribution of the corresponding elements on the examined surface, based on the intensity of the characteristic X-radiation emission obtained from the points on the surface, was formed.

Key words: pig bone, demineralization, forensic analysis, influence of acids; LIBS, AAS, ATR-FTIR, Raman spectroscopy; SEM-EDX

Scientific field: Physical chemistry

Specialized Scientific Fields: Physical chemistry-spectrochemistry, Physical chemistry-forensics

САДРЖАЈ

1. Увод	
1.1 Форензика као наука	1
2. Теоријски део	
2.1 Кост као форензички/антрополошки/археолошки материјал	3
2.1.1 Грађа и састав костију.....	3
2.1.2 Колаген и хидроксиапатит као најважније изграђивачке компоненте костију.....	5
2.2 Модел системи у форензичким испитивањима	9
2.3 Утицај киселина на форензички материјал	10
2.4 Спектроскопске и друге методе у форензичким испитивањима	12
2.4.1 Спектроскопија ласерски индуковане плазме.....	12
2.4.1.1 Ласерски-индукована плазма као спектроскопски емисиони извор.....	14
2.4.1.2 Дијагностика плазме методама оптичке емисионе спектроскопије.....	18
2.4.1.2.1 Дијагностика плазме коришћењем профила спектралних линија.....	21
2.4.2 Вибрационе спектроскопије.....	27
2.4.2.1 Инфрацрвена спектроскопија.....	27
2.4.2.2 Раманска спектроскопија.....	31
2.4.3 Скенирајућа електронска микроскопија са енергетски дисперзионом спектроскопијом рендгенских зрака.....	32
3. Актуелност проблематике у свету	34
4. Циљеви рада	37
5. Експериментални део	39
5.1 Хемикалије	39
5.2 Узорци кости	39
5.3 LIBS спектри	39
5.4 ICP OES мерења	40
5.5 Профилметријска анализа	41
5.6 AAS спектри	41
5.7 FTIR спектри	41
5.8 Рамански спектри	41
5.9 SEM-EDX анализа	42
6. Резултати и дискусија	43

6.1	Анализа LIBS спектра нетретиране кости	43
6.2	Дијагностика плазме	45
6.2.1	Одређивање густине електрона	45
6.2.2	Одређивање температуре плазме	47
6.3	Профилометријска анализа	49
6.4	Анализа FTIR спектра: утицај хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселине	50
6.4.1	Анализа амид I домена	50
6.4.2	Анализа $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домена	57
6.4.3	Анализа $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ домена	63
6.5	Анализа раманских спектра: утицај хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселина	64
6.5.1	Анализа $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ домена	64
6.6	Квантитативни параметри квалитета кости испитиване у растворима хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселине	66
6.7	Анализа FTIR спектра: утицај сумпорне киселине	70
6.7.1	Анализа амид I домена	70
6.7.2	Анализа $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домена	80
6.8	Анализа површине кости применом SEM-EDX методе	89
6.9	Анализа LIBS спектра третиране кости	93
7.	Закључак	100
8.	Литература	103
9.	Биографија и библиографија	111
10.	Изјава о ауторству	114
11.	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	115
12.	Изјава о коришћењу	116

1. УВОД

1.1 Форензика као наука

Форензика је наука која примењује научне принципе и дисциплине у циљу посматрање, анализирања и тумачење физичких доказа криминалних дела. Ово мултидисциплинарно поље обухвата дисциплине као што су форензичка биологија, форензичка хемија, форензичка антропологија, форензичка психологија/психијатрија, дигитална форензика и др. Форензика наука игра кључну улогу у правном систему обезбеђујући објективне налазе који могу помоћи у истрагама, подржати кривично гоњење или одбрану и допринети спровођењу правде. У циљу спречавања пристрасности од стране истраживача, аналитичара или вештака форензичке методе морају бити квантитативне и пружати могућност да се вероватноћа грешке процени објективно.

Историјски појам форензике потиче из римског доба, 44. године пре нове ере када су Брут (*Brutus*) и Касијус (*Cassius*) извршили атентат на Јулија Цезара (*Julius Caesar*). Антистије (*Antistius*), који је у то време био римски лекар, извршио је обдукцију и констатовао да је од 23 убодне ране смртоносна рана била она у грудима. Антистије је случај изнео на отвореном суду пред форумом, одакле и потиче назив форензичар што на латинском значи „пре форума“ [1].

Вековима након пада Римског царства, судска пракса је била запостављена а форензика као наука све више апстрактна. Једино је у древној Кини била развијена патолошка анализа за решавање злочина што је у доприносило развоју форензике у то време. У 13. веку Сонг Ци (*Song Ci*), припадник кинеске Сонг династије, је написао прву књигу под оригиналним називом *Collected Cases of Injustice Rectified or Washing Away of Wrongs*. Ова књига је сматрана приручником патолога и написана је на основу стварних догађаја и искустава и у њој су описани случајеви обдукција, хитног лечење, узроци смрти, и др.

Сматра се да су прва форензичка испитивања почела крајем 18. и почетком 19. века. У родоначелнике одређених грана форензике убрајају се:

- Матје Орфила (*Mathieu Orfila*, 1787-1853), родоначелник токсикологије, писао је о детекцији отрова и њиховим ефектима на животиње,
- Алфонс Бертилон (*Alphonse Bertillon*, 1853-1914), родоначелник антропометрије развојем система за разликовање индивидуа на основу одређених мера делова тела,
- Франсис Галтон (*Francis Galton*, 1822-1911), родоначелник анализе отисака прстију, развио је методу узимања отисака прстију као јединствени начин за идентификацију појединаца
- Леон Латес (*Leone Lattes*, 1887-1954), родоначелник методе за идентификацију трагова свеже крви (развио је процедуру разликовања крвних група) и осушених трагова крви,
- Келвин Годард (*Calvin Goddard*, 1891-1955), родоначелник балистике, развио је технику испитивања метака,
- Алберт Осборн (*Albert Osborn*, 1858-1946), родоначелник методе испитивања докумената, његов рад је довео до признавања докумената као научних доказа на судовима,
- Валтер Мек Крон (*Walter McCrone*, 1916-2002), родоначелник тзв. микроскопске форензике (развој и примена микроскопских техника у испитивању доказа),
- Ханс Грос (*Hans Gross*, 1847-1915), покретач форензичких публикација (написао је књигу о примени различитих научних дисциплина на пољу криминалистике),
- Едмонд Локар (*Edmond Locard*, 1877-1966), оснивач прве криминалистичке лабораторије 1910. године у Француској. Локар, који је био професор на Универзитету у Лиону, 1927. године предлаже чувени *Принцип размене* који се и

данас налази у основи савремене форензичке науке и који гласи: "Сваки близак контакт оставља траг" [1].

У данашње време како технолошки напредак постаје саставни део сваког аспекта живота људи тако и решавање злочина постаје готово футуристичко у свом напретку. Од скенирања мрежњаче до хемије трагова, преко геномике, транскриптомике, метаболомике и анализа микробиома, нанотехнологије, вештачке интелигенције и напретка у откривању и идентификацији протеина, протеомике, форензика напредују сваким даном све више.

2. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1 Кост као форензички/антрополошки/археолошки материјал

Кости су веома често биолошки материјал који се налази на археолошким, антрополошким и форензичким налазиштима. Идентификовање изолованих или фрагментираних костију може често бити веома тешко јер бројни материјали као што су дрво, грнчарија, пластика или камен понекад могу бити замењени за фрагментисану људску/животињску кост.

Значај костију са интердисциплинарног становишта се огледа у сложеним информацијама које дају, као један од аспеката физичке и форензичке антропологије је проучавање људских скелетних остатака да би се реконструисала прошлост и еволуциони процеси, разумеле људске варијације и добиле информације о преминулим особама, као што су њихова старост у тренутку смрти, пол, порекло, стас, патолошка стања (разне болести као што су остеоартритис, лепра, сифилис,...) или трауматске повреде.

У пракси је чешћи случај да се људски остаци мешају са остацима животиња. Идентификацију костију као археолошко/форензичког материјала могу додатно закомпликовати фактори као што су сагоревање, третирање хемикалијама или механичке деформације (савијање) костију [1].

2.1.1 Грађа и састав костију

Главна носећа структура тела кичмењака је скелет коштаног ткива који се састоји од костију и хрскавице. Мишићи, тетиве и лигаменти су такође причвршћени за кости и хрскавицу у телу. Скелет обезбеђује чврстину тела као и низ механичких полуга за које су причвршћена ткива и које омогућавају кретање мишића као и делова/целог тела. Структура кости обезбеђује идеалну равнотежу тврдоће и еластичности и заштите тела од механичког стреса. Здрава кост је довољно тврда да издржи спољне силе и у исто време довољно лагана да се креће када се мишићи контрахују [2,3].

Кост је живо ткиво које се састоји од различитих типова ћелија (остеобласти и остеокласти) који формирају нову кост или уништавају стару кост, одржавајући равнотежу у животу појединца/животиње која се нарушава у случају патолошког стања, трауме, или старости. Пошто је то живо ткиво, кост зараста сама ако је повређена (нпр. после фрактуре), или се прилагођава биомеханичким напрезањима током кретања или вежбања.

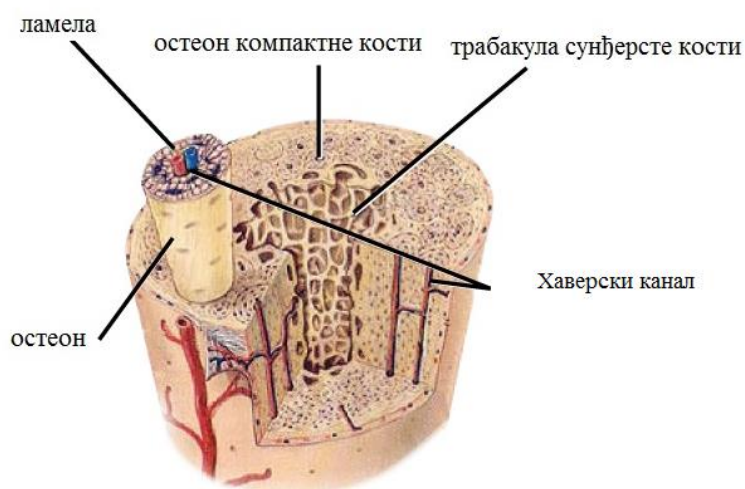
Кости су важан резервоар калцијума (97% укупног калцијума из тела се акумулира у скелету) који се може црпити када је то потребно за посебне метаболичке активности. Кости имају тзв. живу и пластичну природу. Коштано ткиво је високо васкуларизовано и поседује карактеристичан образац раста. Коштано ткиво може да оболи и излечи се као и друга ткива у организму и у односу на друга ткива, са изузетком крви, коштаног ткива поседује највиши могући степен регенерације [2,3].

Кости животиња су класификоване према облику, структури и степену развоја и деле се на: дуге, кратке, пљоснате, нерегуларне (пршљенови, кост кука и др...), пнеуматске (са високим садржајем ваздуха), сесамоидне кости (коштани чворови који се налазе уграђени у тетиве или зглобне капсуле као што су патела, писиформ, фабела и др. кости) и помоћне кости (ове кости нису увек присутне, често су билатералне и имају глатке површине без икаквог калуса, примери су сатуралне кости) [4].

Према структури кости животиња се деле на: компактне кости (кортикалне кости високе густине), сунђерасте (трабекуларне кости се састоје од мреже штапића и плоча између којих су простори који садрже срж, овакве кости се прилагођавају силама притиска), ламеларне (већина костију припада овој групи, било да су компактне или сунђерасте, оне се

састоје од танких плочица ткива које се назива ламела, код компактних костију ламеле су организоване у концентричне цилиндри а у сунђерастим костима оне се слажу у гомиле), фиброзне (тзв. влакнасте кости које се састоје од паралелних снопова густих колагенских влакана, ове кости се често налазе код гмизаваца и водоземаца) и дентин (тврди материјал присутан у зубима, то је ткиво које је гушће од ткива кости, то је најтврђи, најгушћи и најиздржљивији део тела кичмењака) [4]. Према степену развоја кости животиња се деле на: мембранске, хрскавичасте и мембранско-хрскавичасте.

Кост је композитно ткиво чију матрицу формирају коштане ламеле које су делом органске, а делом неорганске. Снагу костију условљава однос неорганских и органских супстанци као и њихова грађа. Две трећине коштане масе је у минералима, а остатак је у води и углавном у колагену типа I. Органска матрица обезбеђује значајну еластичност кости која се са старашћу (или под утицајем разних обољења) смањује како расте количина неорганских једињења чиме кости постају крте. Кост се састоји од приближно 45% воде, 30% протеина, 15% соли и 10% липида [4].



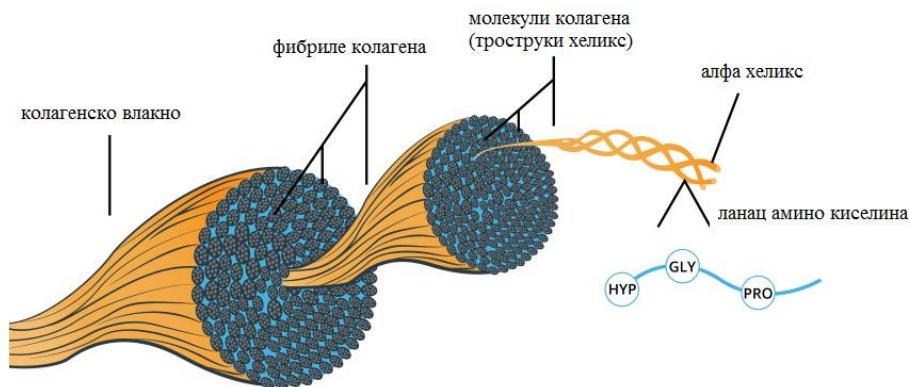
Слика 1 Структура животињске кости [5]

Органска једињења чине 30 до 40% масе костију. Органску матрицу кости, стеоидну матрицу, чине влакана колагенских и неколагенских протеина уграђених у мукополисахаридни протеински комплекс. Ћелије костију називају се остеоцити и оне се налазе у просторима који се називају лакуне. Сваку ћелију чине нити њене протоплазме која се финим каналима повезује са другим коштанам ћелијама. Ови канали су повезани са централним хаверским каналима који обезбеђују храну и кисеоник (слика 1) [5].

Неорганска једињења чине 60 до 70% тежине кости и у њих се убрајају: минерал хидроксиапатит (који је аналог природног кристалног калцијум фосфата (85%), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (слика 2), калцијум-карбонат (10%) и трагови калцијум-флуорида, калцијум-хидроксида, магнезијум-хлорида, итд. Поред макронутријената, кост увек садржи и неке од следећих елемената: гвожђе, алуминијум, силицијум, натријум, калијум, цинк и бакар. Важно је напоменути да кости садрже око 97% калцијума у телу и веома велику количину телесног фосфора. Калцијум и фосфат су подједнако важни као и натријум и калијум у регулацији основне функције тела. Неоргански калцијум и фосфат нису блиско повезани у односу на већину њихових основних улога које имају у физиологији кичмењака али су јако повезани када се посматра њихова улога у самој структури костију и зуба. Калцијум-фосфат уграђен у коштану матрицу служи као главни резервоар калцијумових јона тако да се сходно томе ендокрина регулација хомеостазе калцијума не може у потпуности одвојити од регулације фосфата [3].

2.1.2 Колаген и хидроксиапатит као најважније изграђивачке компоненте костију

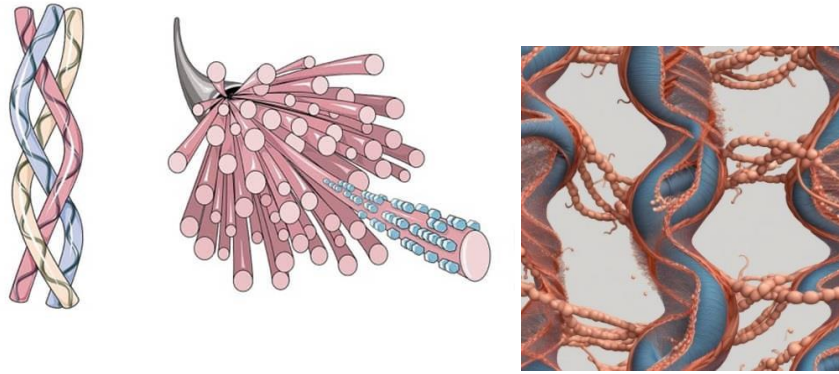
Кост као природни композитни материјал чине главне компоненте органске и минералне матрице, колагена и хидроксиапатита, редом. Протеини матрикса који нису колаген (неколагенски протеини) укључују протеогликане, протеине који садрже γ -карбоксиглутамат, гликопротеин остеоонектин, фосфопротеин остеопонтин и факторе раста. Такође у коштаном ткиву постоји и мала количина липида. Реч колаген потиче од грчке речи „*kola*“ што значи гума, и „*gen*“ што значи производња [6].



Слика 2 Структура колагена [6]

Колаген је влакнасти структурни протеин присутан у екстрацелуларној матрици и везивном ткиву животиња (слика 2) и углавном настаје од фибробласта везивног ткива као и низ других епителних ћелија [6]. То је најзаступљенији протеин у животињском царству кога нема у ткиву биљака и једноћелијских организама у којима полисахариди и целулоза преузимају његову улогу. У случају бескичмењака колаген је присутан у зидовима њихових тела и кутикули. Колаген чини 25-30% садржаја протеина целог тела, посебно код сисара где улази у структуру рожњаче, костију, крвних судова, хрскавице, дентина зуба итд. У влакнастим ткивима као што су кожа, тетиве и лигаменти колаген се налази у облику издужених фибрила. Овај протеин чини и 1-2% мишићног ткива где је најважнија компонента ендомизијума.

Као и сваки протеин и колаген има своју примарну структуру која представља број и редослед уграђивања појединих протеинских аминокиселина у структуру (тзв. секвенца аминокиселина). Структура колагена има понављајући мотив *Gli-X-Y* који чине аминокиселине глицин и, најчешће, пролин и хидроксипролин. Основна структурна јединица колагена је хетерополимерна, она се састоји од три полипептидна ланца који су распоређени у облику троструког хеликса (α хеликс) (слика 3). Два ланца су идентична ($\alpha 1$) док се трећи ланац донекле разликује у хемијском саставу ($\alpha 2$). Сваки ланац има 1050 аминокиселина увијених једна око друге у типичној десној спиралној структури (*right-handed helical structure*) која је дуга 300 nm. На сваком трећем положају улога глицина је кључна јер омогућава чврсто паковање 3 α ланца у молекул тзв. тропоколагена који се сматра основном структурном јединицом колагена. Сваки хеликс је стабилизован репулзивним интеракцијама између пролинских прстенова. Структура је даље стабилноизована водоничним везама између NH групе глицина и CO групе аминокиселина са других ланца као и умрежавањем (*cross-linking*) између лизинских споредних ланца [6]. Пречник молекула је око 1,5 nm а молекулска тежина око 290000 D. Колаген се пакује у хексагоналне и квазихексагоналне структуре које чине фибриларне типове колагена. Ово паковање може бити у облику листова или микрофибрила (под микроскопом се колаген види у облику издужених фибрила) [6].



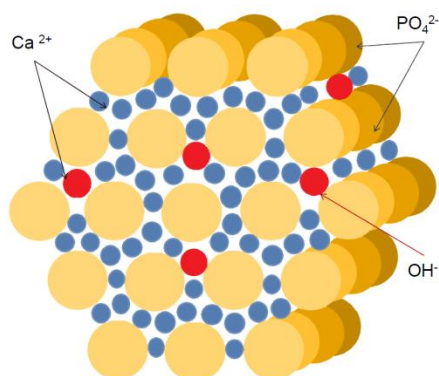
Слика 3 Троструки хеликс колагена и умрежавање колагена (с лева на десно)[7]

До сада је код кичмењака идентификовано око 28 врста колагена који се састоје од 46 различитих полипептидних ланаца. Сви они имају карактеристичну троструку спиралну структуру при чему је дужина спирала као и величина и природа не-спиралних компонената различита. Пет најчешћих врста колагена су: колаген типа I (кожа, кости, зуби, тетиве, лигаменти, васкуларна лигатура, органи (главни састојак органског дела кост)); колаген типа II (очи и хрскавица, главни састојак хрскавица); колаген III (мрежасте, ретикуларне, колаген) (главни састојак ретикуларног влакна, коже, мишића, крвних судова); колаген типа IV (формира слој који лучи епител базалне мембране и базалне ламине); колаген типа V (коса, површина ћелија, плацента). Велики проценат колагена у телу, око 90% , чини колаген типа I, затим следи колаген типа II и типа III. Разлог велике заступљености колагена типа I је његова широка распрострањеност у скоро свим везивним ткивима [8].

Колаген подржава већину ткива у облику екстрацелуларне матрице и даје структуру ћелијама. Он има велику затезну чврстоћу што се потврђује присуством у тетивама, костима, хрскавици, фасцији, итд. Колаген даје еластичност и снагу кожи, помаже развоју ткива и органа и пружа заштиту кожи инхибицијом апсорпције токсина и патогена. Овај молекул има улогу и у биолошким функцијама ћелија (опстанак ћелија, пролиферација и диференцијација), процесима као што је зарастање оштећених костију и крвних судова и одржавње структурног интегритета. Колагенска влакна су и "везивна места" за калцијум и друге минерале костију, процес који је познат као минерализација костију [8].

Зрелу минералну матрицу кости чини биолошки хидроксиапатит који је облика издужених карбонизованих нано честица калцијум-фосфата (налик тромбоцитима) код којих се правац издужења превасходно поклапа са дугом осом колагенских влакана типа I. Хидроксиапатит, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (HA), (обично се пише као $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ да би се нагласило да се јединична ћелија састоји од две структурне целине) је минерал из групе калцијум-фосфата, који у хемијском смислу, посматрајући структурне и морфолошке карактеристике, највише одговара природном коштаном ткиву. Калцијум-фосфати су соли фосфорне киселине које у својој структури садрже јоне H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} . Кристали стехиометријског HA су хексагоналне структуре (слика 4).

Биолошки апатити садрже два неорганска ортофосфатна јона, PO_4^{3-} и HPO_4^{2-} , у саставу костију, зубне глеђи и разних патолошких калцификација. Биолошки апатити су структурно промењени хидроксиапатити, тзв. нестехиометријски апатити, обично са недостатком калцијума и са увек уграђеном карбонатним ањоном, CO_3^{2-} . Биолошки апатити се састоје од малих кристала апатита, што је значајан фактор када се говори о растворљивости биолошких у поређењу са минералним апатитима. Мале димензије и ниска кристалинност су две изражене карактеристике биолошких апатита, које у комбинацији са нестехиометријским саставом, унутрашњим нередом кристала и присуством карбонатних



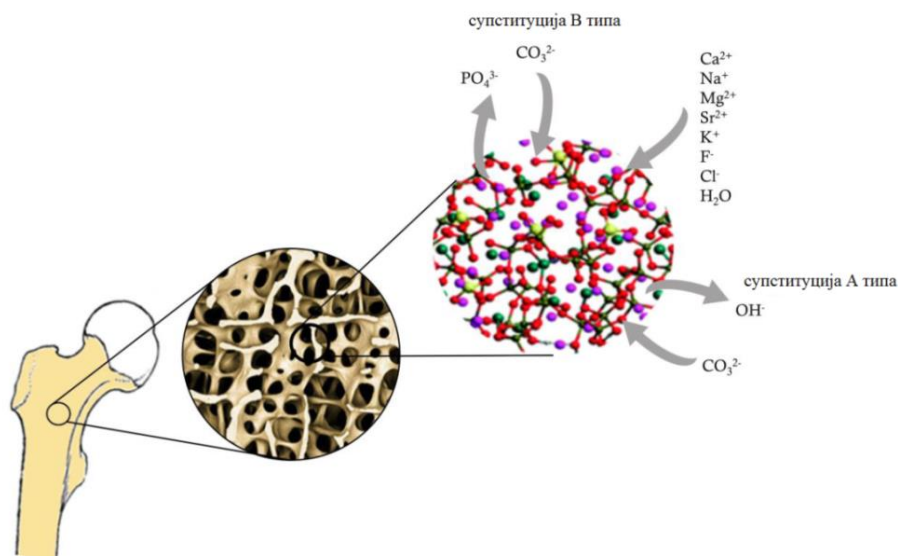
Слика 4 Хексагонална структура кристала стехиометријског хидроксиапатита [9]

јона у решетки, објашњавају његове јединствене карактеристике. Различите структуре апатита дозвољавају велика одступања у саставу, са могућношћу уградње великог броја различитих анјонских (нпр. CO_3^{2-} (до 5%), HPO_4^{2-} (до 5-10%), Cl^-), катјонских (нпр. Na^+ , Mg^{2+} , K^+) супституената и јонских ваканција у њихове три подрешетке (табела 1) [10]. Постоји неколико схема супституције у костима: Бе тип, где јони CO_3^{2-} могу да заузму место PO_4^{3-} јона, А тип, где CO_3^{2-} јони могу да заузму место OH^- јона и супституција када монохидроген-фосфатни јони, HPO_4^{2-} , заузимају место PO_4^{3-} јона [10]. Такође, места PO_4^{3-} јона могу бити заузета фракцијом јона монохидроген-фосфата (HPO_4^{2-}). Као последица тога, опште је прихваћено да се дефицит негативног наелектрисања изазван заменом PO_4^{3-} јона било CO_3^{2-} или HPO_4^{2-} јонима може надокнадити губитком позитивног наелектрисања, нпр. уклањањем Ca^{2+} јона из решетке. Штавише, HPO_4^{2-} јони су поред присуства унутар кристалне решетке хидроксиапатита, такође присутни и у такозваном аморфном површинском слоју који прекрива како биолошке (кост, дентин) тако и биомиметичке нанокристалне честице хидроксиапатита. Јони монохидроген-фосфата, HPO_4^{2-} , у костима такође могу да потичу из октакалцијум-фосфата (ОСР), $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, и домена сличних ОСР-у. ОСР је идентификован као могућа прелазна, транзиентна, прекурсорска фаза коштаног хидроксиапатита, док се домени слични ОСР-у сматрају компонентама коштаног минерала [10,11].

Табела 1 Супституција јона у биолошким апатитима

Јон који се замењује	Јон који се уграђује
Ca^{2+}	Na^+ ; Zn^{2+} ; Sr^{2+} ; Mg^{2+} ; Ag^+ ; Cu^{2+} ; Co^{2+} ; Mn^{2+} ; Pb^{2+} ; ваканције
PO_4^{3-}	HPO_4^{2-} ; CO_3^{2-} ; SiO_4^{4-} ; SeO_3^{2-}
OH^-	F^- ; Cl^- ; H_2O ; CO_3^{2-} (ограничено)

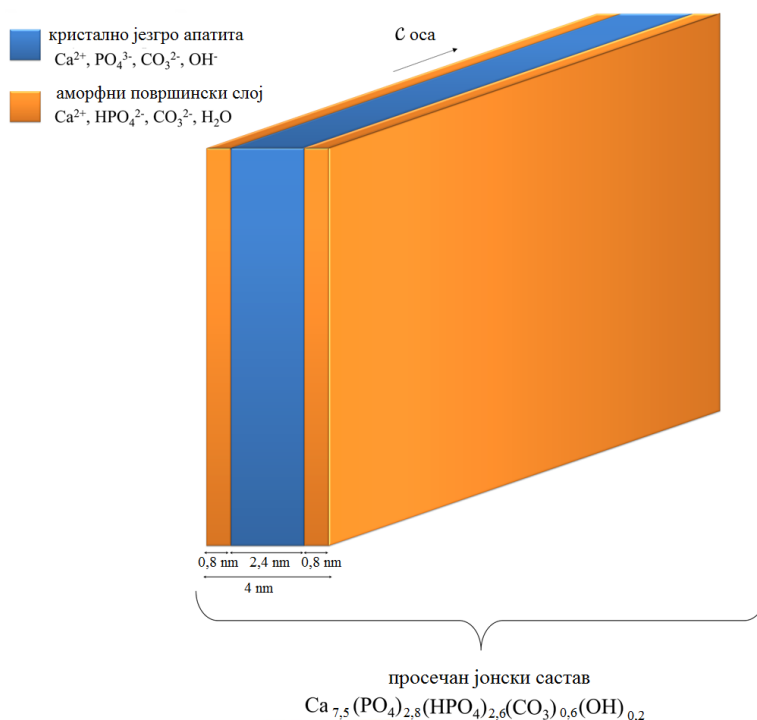
Јонска измена мења геометрију и наелектрисање у кристалној решетки што генерише дисторзије које доводе до смањења кристаличности биоапатита. Могућност постојања различитих јона у структури биолошког апатита такође утиче на механичка својства, деградацију и биолошку активност апатита, а тиме и на физиолошку функцију коштаног ткива у организму. Кристална решетка биоапатита може да садржи и воду као и јоне као што су калцијум, натријум, магнезијум, стронцијум, калијум, флуор или хлор (слика 5, табела 1). Ово све даје посебне карактеристике коштаног матрици, као што су отпорност и флексибилност, што доприноси минералној хомеостазии организма.



Слика 5 Супституције у кристалној структури хидроксиапатита [11]

Индивидуални удео сваког коштаног конституента, као и његов геометријски и просторни распоред, зависе од бројних фактора, као што су исхрана, метаболизам, евентуална патолошка стања, старост у тренутку смрти, *post mortem* период и врста земљишта у контакту са телесним остацима. Такође, потребно је напоменути да се на површини кристала коштаног матрикса могу и адсорбовати многи јони.

Дуго времена је сматрано, по препоруци Легроса (*Legros*) и сарадника, да се састав зреле кортикалне кости може дати формулом $\text{Ca}_{8,3-1,7}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{HPO}_4 \text{ или } \text{CO}_3)_{1,7}(\text{OH} \text{ или } \frac{1}{2} \text{CO}_3)_{0,3-1,7}$ [12]. Данас се сматра да предложена формула хемијског састава не представља реално састав кости јер: *а*) не узима у обзир аморфни површински слој кости чији састав варира у зависности од састава апатита у унутрашњем кристалном језгру кости и *б*) занемарује присуство монохидроген-фосфатног, HPO_4^{2-} , јона (слика б).



Слика 6 Модел зреле кортикалне кости [12]

Мала величина кристала хидроксиапатита их чини идеалним за њихову функцију у хомеостазии минералних јона, јер се мањи кристали генерално растварају пре већих кристала. Кристали хидроксиапатита се такође формирају у ткивима која нису нормално калцификована, на пример, у атеросклеротском плаку, меким ткивима са абнормално високим циркулишућим калцијумом или фосфатом, и зглобној хрскавици у случају дегенеративних обољења зглобова

2.2 Модел системи у форензичким испитивањима

У форензичкој пракси идентификацију скелетних остатака као материјалних доказа кривичних дела додатно компликују различите могућности уништавања доказа као што су закопавање, распарчавање, третирање хемикалијама или спаљивање [1,2]. Већина студија које се баве испитивањима распада биолошких материјала у форензичкој ентомологији и тафономији користи посмртне остатке који нису људски.

Употреба животиња у научне сврхе датира још из времена старе Грчке кад су се за проучавање анатомије користили пси и пилићи. Данас се животињски модели користе за проучавање великог броја патолошких стања [13]. Наше тренутно знање о начину распада људског тела произилази највећим делом из експеримента који се врше на животињским моделима, најчешће свињама. Коришћење свиња као модел животиња почиње са експерименталним ентомолошким испитивањима Пајна (*Payne*) који је од лешева различитих кичмењака (водоземци, сисари, птице) прешао на рад са свињама код којих је могао да контролише време смрти, њихо број, старост и тежину [14]. Касније су форензички ентомолози инспирисани Пајновим експерименталним протоколима почели да користи лешеве свиња у испитивањима распада животињских лешева и утицају земљишта и станишта. Констатовано је да свиње имају релативно устаљен образац распадања у временским оквирима дана, годишњих доба и година. Варијације у заједницама инсекта су добро проучене и схваћене тако да је било могуће предложити неколико модела за описивање сукцесије заједнице артропода на лешевима свиња. Фазе пропадања су називане по физикохемијским променама које су биле видљиве на лешевима а које су праћене одређеним распоредом сукцесије инсеката.

Употребе кадавера домаћих свиња као аналога за људске у савременој форензичкој ентомологији и тафономији уведена је крајем 80-тих година 20. века, од када домаће свиње постају најчешће и највише коришћени модели кадавера у форензичким испитивањима. Употреба модела свиња у форензичким истраживањима је добијала на значају током година због њихових физиолошких и анатомских сличности са људима, што их чини идеалним објектима за проучавање распадања и трауме у контролисаном окружењу. Истраживачи су почели да препознају вредност свињских модела у разумевању процеса распадања, јер су ткива свиња слична ткивима људи у смислу садржаја масти и целокупне анатомије, пружајући значајан увид у различите фазе распада. Студије су показале да се свињске кости разграђују на начине који блиско опонашају распад људских остатака, што их чини идеалним кандидатима за форензичке експерименте.

У датом периоду је форензичка антропологија почела да се успоставља као посебна дисциплина, што је довело до систематских студија о факторима животне средине који утичу на распадање, као што су температура и влажност. Временом, поље се проширило и укључило друге животињске моделе као што су козе и овце, који се користе за проучавање специфичних аспеката трауме и одговора ткива. Ови модели су олакшали напредак у форензичкој антропологији и тафономији, омогућавајући истраживачима да боље процене пост-мортем интервале и развију прецизније методе за анализу места злочина. Систематско коришћење ових животињских модела не само да повећава тачност форензичких истраживања, већ и премошћује јаз између теорије и практичне примене, на крају побољшавајући методологије у одређивању узрока и начина смрти. Како форензика

наставља да се развија, коришћење модела система остаје кључни фактор у побољшању нашег разумевања распада људских остатака и истражних поступака који се у форензици примењују.

Примена кадавера домаћих свиња је обликовала начин испитивања и разумевање процеса декомпозиције лешева у различитим срединама, годишњим добима и након различитих пре- или пост-мортем модификација. Такође, на овим моделима се испитују могућности примене савремених аналитичких метода и техника у анализи форензичких узорака. Још једна предност анималних модела, посебно домаћих свиња, је могућност репликације и репродуктивности мерења с обзиром на ограничени број кадавера хуманог порекла [13].

Питање које се често поставља јесте да ли су свиње одговарајући модел у форензичкој ентомологији и тафономији? Због биолошких и анатомских сличности са људским костима, у смислу структуре ламеларне кости, брзине регенерације костију, стопе минерализације кортикалне кости, концентрације минерала костију и минералне густине костију, свињске кости имају важну улогу у овим научним областима. Поређење предности и мана лешева свиња у односу на лешеве људи у експерименталној форензичкој ентомологији и на пољу тафономије указује да су узорци свињских остатака обично погоднији од људских у таквим експериментима. Важност свиња у односу на друге експерименталне животиње (зечеви, мишеви) је у томе што оне омогућавају поуздану анализу пост-мортем микробиома, јер је фауна инсеката која насељава лешеве свиња иста као и код лешева људи.

Модели као што су свиње ће се вероватно примењивати и у будућности јер су логистички лакши, доступнији и уједначенији по величини и старости. Кадавери свиња се такође лако могу реплицирати у великом броју и по ниској цени, за разлику од лешева људи којима је приступ знатно ограничен. Са етичког становишта и неопходних дозвола за рад свиње су мање захтевне за примену што их чини најбољим моделима у савременим форензичким истраживањима.

2.3 Утицај киселина на форензички материјал

Киселине могу значајно утицати на различите форензичке материјале, са посебним акцентом на интегритет и поузданост доказа прикупљених током кривичних истрага [15].

Када су у питању текстил и влакна, киселине могу изазвати озбиљну деградацију, посебно код природних влакана попут памука и синтетичких материјала као што је најлон. Киселине могу да хидролизују полимерне ланце који овим влакнима дају чврстину, што има за последицу слабљење, обезбојавање или чак потпуни распад узорака. Овакве промене ометају способност упаривања влакна пронађених на жртвама или починиоцима са онима са места злочина, што је уобичајена метода у форензичкој анализи за повезивање осумњичених са криминалним активностима. Уколико боје и премази пронађени на местима злочина дођу у додир са киселинама оне могу променити њихове хемијске особине, довести до површинске ерозије и деградације везива која се користе у формулацији боја. Овакве измене могу онемогућити форензичку анализу, тачна поређења и анализе неопходне за праћење узорака боје до њиховог извора, потенцијално елиминишући кључне везе са возилима или објектима укљученим у злочин. Метални предмети, као што су ватрено оружје или алати, изложени су корозији када су изложени киселинама, што може да изазове оштећење површине, губитак детаља, па чак и нарушавање интегритета структуре. Процес корозије не само да доводи до физичког пропадања предмета, већ може и да избрише критичне ознаке, као што су серијски бројеви, неопходни за идентификацију и проверу криминалне прошлости. Стаклени предмети изложени деловању киселина могу онемогућити проналажење отисака прстију или трагова доказа који су можда наталожени на стаклу. У анализи тла и других материјала у траговима, киселине могу да промене хемијски састав и микробиолошки састав узорака, потенцијално мењајући оригиналне карактеристике које

форензичари могу да користе за успостављање географских веза између осумњичених и локација. Ова варијабилност компликује тумачење доказа о тлу, који се често ослањају на специфичне компоненте тла у циљу добијања веродостојних података са места злочина. На крају, у токсикологији, кисели услови могу значајно да утичу на стабилност лекова и њихових метаболита. Распад фармацеутских производа може довести до лажних негативних резултата или нетачности у токсиколошким проценама током обдукционих истрага, потенцијално прикривајући прави узрок смрти или присуство супстанци које би могле да имплицирају кривично дело.

У контексту меких ткива, јаке киселине могу денатурирати протеине и нуклеинске киселине, спречавајући прецизно профилисање ДНК, што је неопходно за повезивање осумњичених са злочинима или утврђивање идентитета жртве. Кисела средина такође може олакшати разградњу ћелијских мембрана, узрокујући цурење и деградацију ћелијских компоненти, ограничавајући ефикасност било које форензичке биолошке анализе која се извршава на узорцима [15].

Јаке киселине, као што је хлороводонична киселина, могу ефикасно декалцифицирати кости одн. „испрати“ калцијумове и фосфатне јоне што има за последицу губитак густине и механичке чврстоће. Ово може озбиљно ометати форензичке остеолошке процене које се ослањају на интегритет скелетних остатака за одређивање старости, пола или порекла, што су критични аспекти форензичке анализе. Сумпорна киселина као јако корозивна и јака киселина такође може имати значајан утицај на биолошке узорке у форензичким истраживањима. Као веома реактивни и дехидрирајући агенс сумпорна киселина изазива различите степене оштећења у зависности од тога како долази у контакт са биолошким ткивом (излагање коже, гутање или удисање). Када се примени на биолошке материјале, сумпорна киселина може довести до распадања органске материје, ефикасно разграђујући протеине, липиде и нуклеинске киселине. Ова деградација може ометати очување и анализу виталних форензичких доказа, као што су крв, ткиво или друге телесне течности. Интензивна топлота створена егзотермном реакцијом сумпорне киселине са водом такође може уништити ћелијске структуре. Са археолошког становишта значајно је дејство сумпорне киселине из природних (оксидација минерала, вулканска активност, распадање органске материје, киселе кише) и антропогених извора (загађење), јер утиче на очување коштаног материјала, изазивајући губитак детаља попут полних и старосних карактеристика. У судско-патолошкој пракси то је врло често средство које се користи за уништавање физичких доказа биолошког порекла, онемогућавање утврђивања узрока и времена смрти и идентификацију жртава. Употреба сумпорне киселине може довести и до контаминације, што компликује тумачење резултата у форензичком контексту. Стога, иако сумпорна киселина може бити корисна у неким аналитичким процедурама, њена деструктивна природа представља ризик по интегритет форензичких биолошких узорака.

Деградација киселинама не само да мења физички изглед и структуру костију, већ може утицати и на способност издвајања ДНК из њих. Излагање киселини може довести до хидролизе, разградње колагена и других органских компоненти, на крају умањујући количину и квалитет генетског материјала који се може опоравити. Штавише, када се ради са другим биолошким материјалима као што су зуби, киселине могу еродирати глеђ и дентин, угрожавајући анализу јединствених идентификатора, као што су зубни картони, витални за утврђивање идентитета.

Укратко, дејство киселина на биолошке форензичке материјале, било да се ради о костима, зубима или меким ткивима, може озбиљно угрозити способност прикупљања поузданих, разумљивих доказа, што захтева пажљиво руковање и чување биолошких узорака у форензичком контексту.

2.4 Спектроскопске и друге методе у форензичким испитивањима

Савремена форензичка анализа подразумева примену савремених метода и техника при чему методе и технике атомске и молекулске спектроскопије заузимају најважније место. Веома важна прекретница у развоју форензичке анализе десила се средином 20. века када је напредак у развоју спектроскопских техника омогућио добијање веома важних података о структури материје недеструктивним путем [1,2].

У најзаступљеније спектроскопске технике убрајају се: атомска апсорпциона спектроскопија (AAS, *Atomic Absorption Spectroscopy*), атомска емисиона спектроскопија (AES; *Atomic Emission Spectroscopy*) у коју спадају спектроскопија ласерски индуковане плазме (LIBS, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*), емисиона спектрометрија индуктивно спрегнуте плазме (ICP, *Inductively Coupled Plasma*), индуктивно спрегнута плазма са масеном спектрометријом (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), флуоресценција X зрака (XRF, *X Ray Fluorescence*) као и методе молекулске спектроскопије у коју спадају инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (IR, *Infrared Spectroscopy*), раманска спектроскопија (RS, *Raman Spectroscopy*), нуклеарна магнетска резонанција (NMR-*Nuclear Magnetic Resonance*), флуоресцентна спектроскопија (FS, *Fluorescence Spectroscopy*), ултраљубичаста-видљива спектроскопија (UV-Vis, *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*), и масена спектрометрија (MS, *Mass Spectrometry*) [1,2].

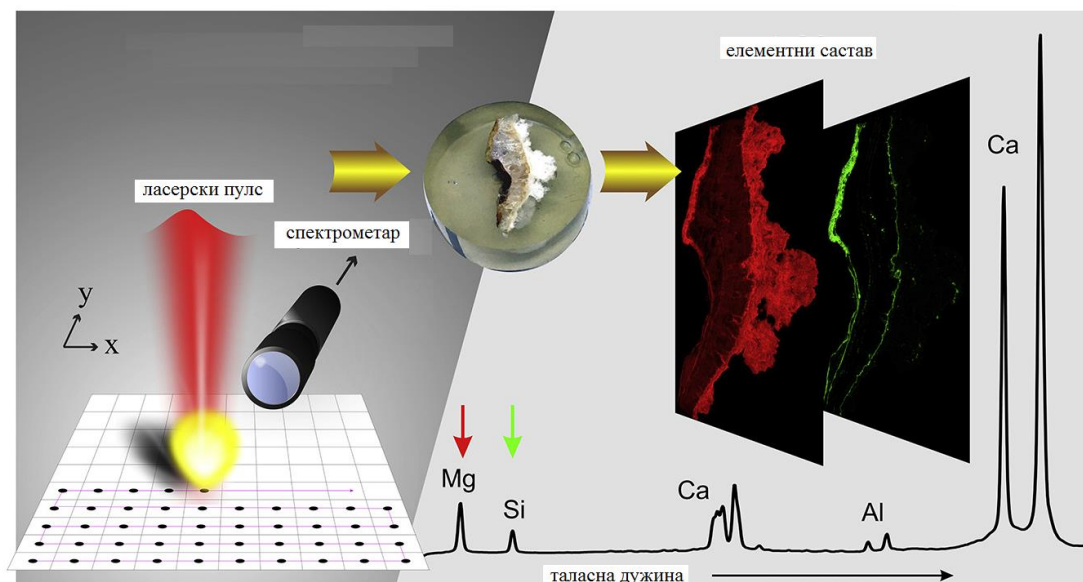
2.4.1 Спектроскопија ласерски индуковане плазме

Спектроскопија ласерски-индуковане плазме је метода оптичке емисионе спектроскопије (OES, *Optical Emission Spectroscopy*) која користи ласером индуковану плазму као извор испаравања, атомизације и побуђивања испитиваног узорка. Оптичка емисија из ласерски индуковане плазме се користи за потребе хемијске анализе. Генерално, у LIBS мерењу се интензиван пулс ласера фокусира на површину узорка при чему се површини испоручује велика густина енергије у кратком временском трајању, тј. Велика густина снаге. Сходно томе, мала запремина материјала мете се загрева и испарава у околни гас, стварајући облак (*plume*) материјала изнад циљане површине. Облак може наставити да апсорбује енергију ласера што узрокује даљу јонизацију, стварање плазме и загревање плазме при чему плазма апсорбује зрачење (инверзни бремштралунг) а облак гаса много слабије. Оптичка емисија плазме се региструје помоћу спектрометра, при чему се тако добијени емисиони спектар даље може користити за квалитативну или квантитативну елементну анализу испитиваног узорка.

Претечом LIBS-а се може сматрати ласерски-индукована емисија варнице. Брех и Крос (*Brech, Cross*) су 1962. године, две године након открића рубинског ласера, генерисали прву ласерски-индуковану плазму са површине. Прва аналитичка примена ласерски-индуковане плазме пријављена је у Француској 1963. године, што се званично сматра „рођењем“ LIBS технике [15-17]. Након тога прилично дуго времена LIBS техника је била сведена углавном на проучавање фундаменталних карактеристика ласерске плазме пре него на њене аналитичке могућности. Од 1990-их, LIBS техника доживљава драматичан напредак ка томе да постане техника како за лабораторијске тако и теренске анализе. Године 2004. прегледни чланак Вајнфорднера (*Winefordner*) и сарадника описује ову технику као „будућу супер звезду“ [18].

Као и друге технике атомске емисионе спектрометрије LIBS, има одређене предности у поређењу са другим техникама елементне анализе које нису засноване на AES, то су способност детекције свих елемената и способност истовремене детекција више елемената. Такође, једна од главних предности LIBS технике, у поређењу са конвенционалним техникама заснованим на AES, је употреба ласера као извора зрачења [19].

LIBS техником се могу анализирати сва агрегатна стања. Анализа не подразумева посебну припрему узорака а примена ласера не доводи до оштећења узорка с обзиром да је то „микрометода“ у којој се користе и троше врло мале количине узорка (процесом аблације се уклања од неколико десетина до 100 ng испитиваног материјала) (слика 7). Такође, узорци се могу испитивати на изузетно високим температурама и притисцима. Још једна од предности ове технике је и могућност спрезања са другим спектроскопским методама као што је раманска спектроскопија или ласерски-индукована флуоресценција (LIF, *Laser-Induced Fluorescence*).



Слика 7 Упростио приказ принципа LIBS технике [20]

И поред свих наведених предности, сама техника, гледано са аналитичког становишта, има одређена ограничења. Главни фактор који утиче на могућност примене LIBS у квантитативне сврхе је ефекат позадине, тзв. *matrix effect*. Овај ефекат је приметан и код других AES техника заснованих на плазми као што су ICP, међутим, утицај на LIBS је знатно израженији што је последица директне примене ласера као начина узорковања. Ефекат је посебно изражен код испитивања чврстих узорака, кад се директно на чврстом предмету ствара плазма. Разблаживање основе редукује ефекат основе па су зато у погледу тачности у предности технике код којих се ради са растворима, где је разблажење основе минимум 100 пута, а може да буде и знатно веће. Такође, и по питању других карактеристика мерења, као што су граница детекције, тачност и прецизност, LIBS и даље заостаје у односу на друге аналитичке методе [21]. Са фундаменталне тачке гледишта ограничења технике потичу од неколико фактора: *а)* сложене природе интеракције ласер-узорак која зависи од карактеристика ласера као и особина материјала; *б)* сложене временске и просторне еволуције ласерски-индуковане плазме. Ови фактори заједно доприносе ефекту основе [21].

Како је за примену LIBS технике такође кључно побољшање интензитета спектралне емисије плазме, развијено је више нових метода које то омогућавају. У неким методама се примењују додатни физички феномени, а у неким се побољшава интеракција ласер-материјал. У прву групу метода се сврставају LIBS побољшан прањњем из варнице (*spark-discharge assisted LIBS*), LIBS побољшан магнетским пољем (*magnetic-field-enhanced LIBS*), просторно ограничен LIBS (*spatially confined LIBS*), LIBS побољшан пламеном (*flame-enhanced LIBS*), резонантно-побољшан LIBS (*resonance-enhanced LIBS*) и LIBS двоструког пулса (*double-pulse LIBS*). У другу групу метода спадају LIBS побољшан наночестицама (*nanoparticle-enhanced LIBS*), површински-појачан LIBS (*surface-enhanced LIBS*) и повишење температуре узорка [22].

2.4.1.1. Ласерски индукована плазма као спектроскопски емисиони извор

У лабораторији, плазма се најчешће генерише електричним пражњењем кроз гасове. Особине генерисане плазме зависе од природе унетог гаса, температуре, притиска, степена јонизације итд. Плазма се може генерисати и деловањем ласерског зрачења. Ласерски индуковани пробој је добро позната појава која доводи до формирања јонизованог гас који се обично назива ласерски индукована плазма, LIP (*Laser-Induced Plasma*). Формирање плазме ласером је брз процес који се истражује већ неколико деценија због своје разноврсне и сложене природе. Потенцијална примена LIP-а је изузетно велика и од важности како за фундаментална тако и примењена истраживања. Иако се већина традиционалних техника за карактеризацију плазме из других извора може користити и за карактеризацију LIP-а ипак се мора водити рачуна када се ради о тумачењу резултата добијених из LIP из разлога њихове транзиентне природе и нехомогености. Постојање велике временско-просторне густине и температурског градијента LIP захтева неуједначено усредњавање по растојању и времену [23-26].

У раној фази временске еволуције LIP се одликују високим температурама (10^4 - 10^5 K) и великом густином електрона и јона (10^{17} - 10^{19} cm⁻³). Интензиван ласерски пулс (10 GW cm⁻²) (предаје енергију, 10 J cm⁻²) веома кратког трајања озрачује циљану површину у коме се мали део узорак који је погођен ласером тренутно атомизује, јонизује и испарава у екстремно врућу пару која се назива „плазма облак“ (*plasma plume*). Енергија побуђивања је реда величине eV што омогућава одвијање низа процеса у којима учествују компоненте плазме: јони, атоми, молекули и кластери. Такви процеси укључују апсорпцију/емисију (емисија може да буде дискретна или континуална; дискретне линије се карактеришу својим интензитетом, обликом и таласном дужином који зависе од структуре емитирујућих атома), јонизацију/захват електрона, дисоцијацију/рекомбинацију, формирање молекула, формирање кластера и наночестица и деексцитацију.

За ласерски индукован пробој, тј. формирање плазме, је карактеристичан тзв. праг, минимална густина снаге ласера која је неопходна за формирање плазме (та густина снаге се назива прагом за формирање плазме). Вредност прага зрачења зависи од услова мерења (врста гаса и притисак), својстава ласера (фокус, амплитуда импулса, таласна дужина, време трајања импулса) и озраченог материјала (као што је агрегатно стање; оптичка, топлотна и електрична својства; порозност и морфологија површине). Ова својства такође одређују стварне физичке процесе укључене у процес разградње површине одн. формирања плазме.

LIP има веома широку примену у разним областима наука: науци о материјалима, аналитици, спектроскопији, пољопривреди, геологији, медицини и др. Све примене LIP-а захтевају доступност поузданих ласера различитих карактеристика (енергија, ширина пулса, таласна дужина, профил снопа) и разумевање својстава LIP-а развијањем и коришћењем најсавременији дијагностичких алата. LIP се данас користи у спрези са многим аналитичким техникама као што су LA-ICP-MS (*Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), LA-ICP-OES (*Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*), LA-TOF-MS (*Laser Ablation Time-Of-Flight Mass Spectrometry*), LA-LAS (*Laser Ablation Laser-Absorption spectroscopy*) [25].

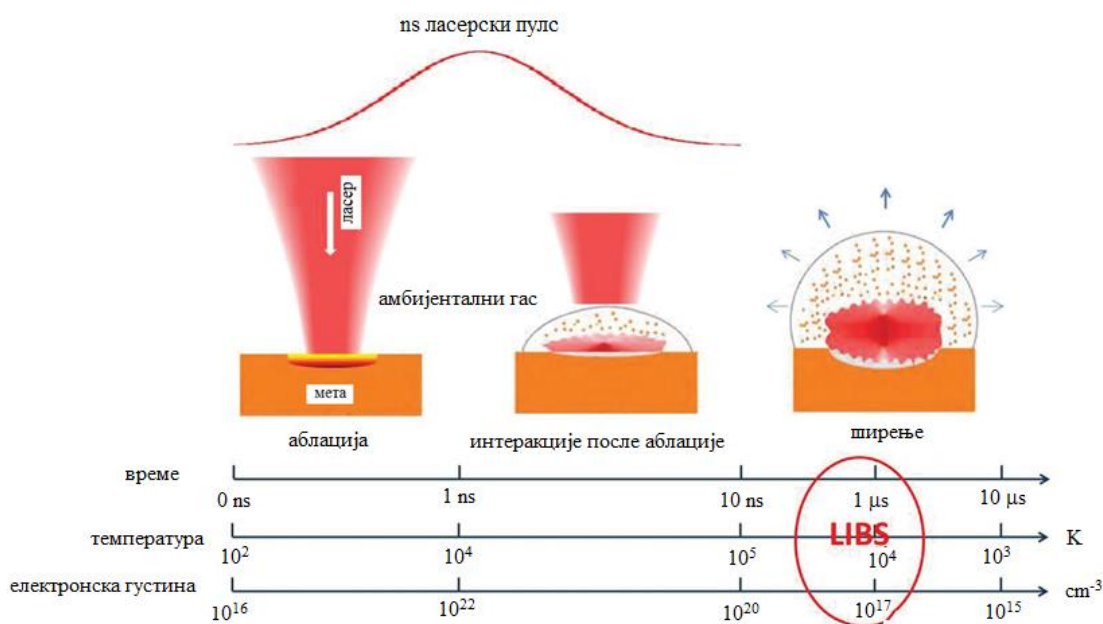
Главни процеси у генерисању и еволуцији LIP, структура LIP

Иако је поступак генерисања LIP-а релативно једноставан и подразумева усмеравање ласерског пулса великог интензитета (изнад прага ласерске аблације) на материјал од интереса (типично 10^8 W m²) физички и динамички процеси који се том приликом дешавају су јако сложени.

У својим раним фазама, LIP има високу гуштину електрона и високу температуру, која прогресивно опада с временом због феномена експанзије и рекомбинације. Судари између

слободних електрона и тешких врста (атома и јона) су одговорни за успостављање равнотеже типа екситација/деекситација и јонизација/рекомбинација. У LIP-у судари електрона су главни пут депопулације побуђених стања али је могућа и радијациона релаксација, као што је то спонтана емисија која је одговорна за постојање LIBS сигнала.

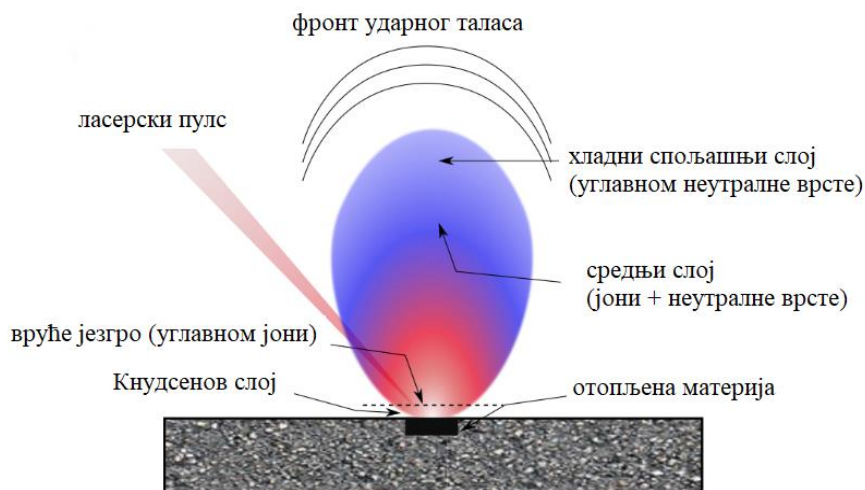
Разликује се неколико корака којима се може описати генерисање и еволуција плазме у простору. Као што је приказано на слици 8 процес почиње оног тренутка када ласерски сноп погоди циљану површину. Том приликом један део енергије упадног снопа се апсорбује што проузрокује мање или веће промене на површини испитиваног материјала (аблација). Уколико је енергија упадног снопа већа од енергије потребне за аблацију долази до фазне трансформације у испитиваном материјалу и стварања паре материјала која може бити неутрална или јонизована. Пара интерагује даље са надолazeћим ласерским снопом уколико се ради о трајању пулса реда ns или дуже. Уколико пара има високу температуру и велику густину електрона степен јонизације паре је већи. На тај начин се изнад испитиваног материјала ствара плазма док у материјалу остаје удубљење, кратер [21-29].



Слика 8 След догађаја приликом генерисања и еволуције LIP-а, временска скала, електронска густина и температуре одређених фаза [29]

Област простирања LIP-а се може поделити на три главне области (слика 9) [23-25]. Близу површине мете налази се најтоплији и најгушћи део плазме који се назива језгро. У овој области материјал се углавном налази у јонизованом стању због високих температура. Унутар језгра поред циљане површине постоји такозвани Кнудсенов (*Knudsen*) слој чија је дебљина једнака неколико средњих слободних путања кретања честица. Кнудсенов слој се дефинише као област у којој честица од неравнотежне дистрибуције, унутар неколико средњих путања, постиже равнотежну расподелу брзине [23]. У средњем делу плазме, јони и неутралне честице (атоми + молекули) коегзистирају због процеса јонизације и рекомбинације. Најудаљенија област плазме је релативно хладна и у њој доминирају неутралне врсте које могу да апсорбују зрачење које излази из језгра и средње области плазме. Иза средње области плазме налази се тзв. фронт ударног таласа који путује испред облака плазме и који настаје услед експлозивног ширења плазме. Ударни талас настаје када се уклоњени материјал (пара испитиваног материјала) избаци са површине материјала брзином већом од брзине звука у околном гасу. Иза ударног таласа остаје ударни гас који је део амбијенталног гаса.

Термодинамичке и оптичке карактеристике ударног гаса се могу значајно мењати проласком ударног таласа. Пара испитиваног материјала заједно са ударним гасом чини облак плазме. Када је облак у јонизованом стању онда се сматра плазмом, ласерски индукованом плазмом [27]. Уколико се плазма посматра у амбијенталном гасу она се кроз њега шири и интерагује са њим. Како ласерски пулс још увек може трајати током ране фазе ширења плазме то се у систему јавља тзв. ласерски-подржан апсорпциони талас (*Laser-Supported Absorption Wave, LSAW*) који је доминантан током ширења, пропагације, плазме у околину. Престанком трајања ласерског пулса плазма се и даље шири кроз околину. Тада се дешавају и процеси релаксације, посебно радијационе релаксације која подразумева емисију плазме што је основа LIBS технике [24,26].

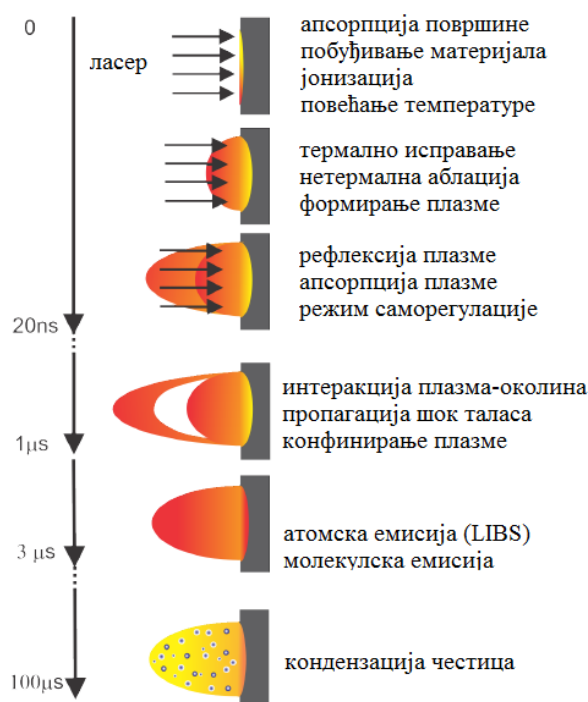


Слика 9 Шематски приказ ласерски индуковане плазме [24]

Временско трајање LIP-а обухвата неколико редова величине. Основна својства LIP-а се мењају током еволуције плазме. Генерисањем LIP-а дешавају се многи међусобно повезани процеси који се одвијају и након експанзије плазме у простор. Између осталог то су загревање, топљење, испаравање, фазна експлозија, избацивање честица, стварање плазме, интеракција ласер-плазма, хидродинамичка експанзија плазме, стварање ударних таласа, конфинирање („затварање“) плазме, кондензација честица и др. (слика 10). Последња фаза живота LIP-а није од великог интереса, посебно за LIBS мерења, јер се количина аблиране масе узорка не побуђује као што је то случај са паром плазме. Овај део узорка је аблиран у облику честица, које формирају кондензовану пару, или у облику чврстог ексфолијата који не емитују зрачење. Атоми који настају аблацијом се хладе и стварају наночестице у процесу рекомбинације [21-29].

Физички процеси који се дешавају у LIP-у зависе од типа ласера и мете која се циља као и до параметра околине. На пример, интензитет, ширина пулса и таласна дужина ласера ће утицати на интеракције ласер-плазма и ласер-мета. Ако је изабрани ласер фемтосекундни, јонизацијом ће доминирати нетермички процеси. Како је пулс јако кратак да би изазвао топлотне ефекте, јонизацију проузрокују други ефекти, у зависности од типа узорка. Пошто пулс носи велику енергију то се узорак побуђује вишефотонском апсорпцијом и јонизацијом, тунеловањем и лавинском јонизацијом. Јонизацијом узорка великом енергијом ласерског пулса настаје шупљина која избацивањем електрона из материјала индукује емисију рендгенских зрака, врућих електрона и фотоемисију. Овако настају високо неелектрисани јони у процесу који се назива Кулонова експлозија. Изостанком топлотних ефеката, из разлога што су транспортни процеси много спорији у односу на време трајања ласерског импулса тако да је погођена запремина материјала практично изолована од остатка (bulk), у испитиваном материјалу се ударом ласерског пулса ствара кратер дефинисаних ивица при чему нема топљења материјала као ни остатака материјала у кратеру. Код примене ласерских

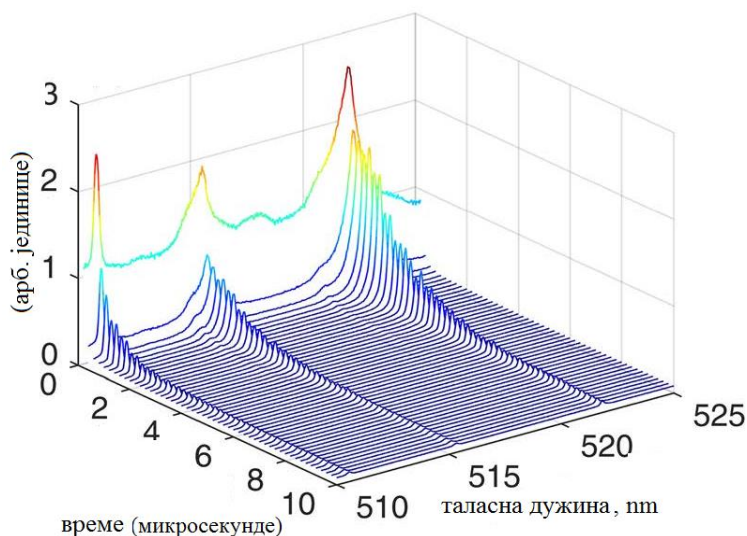
пулсева кратког трајања (реда fs) плазма се генерише по престанку ласерског пулса [21-29]. Насупрот томе, наносекундни ласери изазивају друге ефекте. Време загревања електрона у мети је око 10^{-12} s, много краће од трајања пулса, што условљава доминацију топлотних ефеката у процесу јонизације. Укратко, енергија ласера топи и испарава узорак, а повећање температуре јонизује атоме. Ако је озрачивање узорка довољно јако у процес јонизације биће укључени и нетермички ефекти. У временском интервалу од 10^{-9} s до 10^{-8} s плазма постаје непрозирна за ласерско зрачење, тако да последњи део ласерског пулса интерагује са површином плазме и бива апсорбован или рефлектован тако да даље не јонизује испитивани материјал. Овај феномен се назива „заклањање плазме“ (*plasma shielding*) и зависи од околних услова (присуства околних гасова или вакуума) и експерименталних услова рада (ласерског озрачивања и таласне дужине ласера). Заклањање плазме редукује степен аблације јер спречава долазак ласерског снопа до испитиваног материјала, што има за последицу да се око кратера ствара истопљени материјал као и остаци материјала. У исто време плазма се у том делу поново загрева чиме се време живота плазме продужава а њена запремина расте. У случају ласерских пулсева који трају дуже (ns- μ s) LIP се генерише за време трајања пулса при чему се значајан део енергије ласера троши на загревање плазме [20-29].



Слика 10 Временска скала физичких процеса који се одигравају приликом LIP-а у гасу [26]

Без обзира какав пулс генерише плазму, краћи или дужи, у свим случајевима формирана плазма није стационарна, шири се веома великом брзином, при чему је укупно време трајања од неколико наносекунди до десетина наносекунди (у типичним радним условима), након чега се интензитет плазме смањује до тренутка када се она гаси. Временска еволуција плазме је динамички физички процес који зависи од трајања пулса ласера. Емисиони сигнал у LIBS мерењима показује временску и просторну зависност, он се састоји од временски и просторно разложених спектралних линија емитованих из LIP-а. Временски разложена LIBS мерења дају тродимензионе податке, таласну дужину, време кашњења (*delay time*) и интензитет емисије (слика 11). Ако се плазма индукује у вакууму она се шири адијабатски и ширење материјала који је одстрањен аблацијом се може описати Ојлеровим једначинама хидродинамике. Насупрот томе ако је околина гас или течност облак плазме ће компримовати околни медијум и произвести ударни талас. У овом случају облак плазме је

мешавина атома и јона из испареног материјала и околног гаса. Ширење ударног таласа се у том случају може описати Седовом (*Sedov*) теоријом [21-29].



Слика 11 Временски разложена оптичка емисија LIP-а на 25°C; енергија ласера 36,1 mJ, ширина временског интервала (*gate width*) 0,2 μ s [22]

Физички процеси који се дешавају у LIP-у зависе како од типа ласера тако и од карактеристика саме мете. Физичке и хемијске особине мете (метали, полупроводници, изолатори,...), ће утицати на карактеристике плазме и интеракције ласер-мета јер тип материјала условљава праг генерисања плазме у одређеним материјалима. Уколико се ради о металима ласерски снап интерагује са слободним електронима метала, док у случају када се ради о полупроводницима или изолаторима ласерски зрак интерагује са везаним електронима [21-29].

2.4.1.2. Дијагностика плаземе тодама оптичке емисионе спектроскопије

LIP су спектроскопски извори који имају брзу временску еволуцију карактеристичних параметара као и велики градијент њихове просторне расподеле. Опис стања плазме и процена њених битних физичких параметара су стриктно повезани са концептом термодинамичке равнотеже. Код плазме која је у потпуној термодинамичкој равнотежи сви процеси су избалансирани и окарактерисани једном температуром. То значи да је брзина процеса побуђивања атома сударима са електронима једнака брзини обрнутог процеса, деексцитацији (тзв. судари друге врсте), јонизација сударима је изједначена са тројном рекомбинацијом, а количина зрачења које је емитовано је једнака количини апсорбованог зрачења [22-29].

Дијагностика плазме игра кључну улогу у разумевању физичких својства свих плазми, укључујући LIP, као и у њиховој оптимизацији за различите примене. Главне карактеристике плазме су њена температура и концентрација електрона који имају доминантну улогу у нееластичним сударима у плазми. С обзиром на транзиентну природу плазме и просторну нехомогеност, дијагностика LIP-а мора да има добру временску и просторну резолуцију. Данас постоји много метода које се користе у дијагностици плазме, међу којима су оптичке методе, методе засноване на интеракцији електромагнетског зрачења са плазмом и методе у којима се користе сонде [24-27].

Оптичка емисиона спектроскопија је највише коришћен дијагностички алат у дијагностици LIP-а. Поред температуре и густине електрона OES даје могућност

одређивања: састава плазме (атома, јона, молекула), расподеле брзина (кинетичке дистрибуције), ширења линија као и испитивања хемијских процеса у плазми. Просторна и временска зависност густине електрона и температуре је присутна у свим LIP. Познато је да са повећањем растојања од испитиване мете густина електрона и температура плазме опадају. Такође, исти тренд показују карактеристични параметри и са протоком временом.

Карактеризација плазме применом оптичких метода је заснована на „мерењу“ фотона који су ослобођени из плазме процесом спонтане емисије или на ефектима који су настали деловањем екстерних извора фотона (ласери, лукови, лампе) који интерагују са плазмом (расипање, скретање, фазни помак, ротација поларизације, апсорпција, побуђивање,...). Основне оптичке методе које се користе у дијагностици плазме укључују имидинг, оптичку спектроскопију (апсорпциону и емисиону спектроскопију и ласерски-индуковану флуоресценцију) и различите методе примене ласера за дијагностику (интерферометрија, Томсоново расејање, дефлектометрија). Као додаток оптичким методама дијагностике, наелектрисане честице се детектују јонским сондама, електростатичким анализатором енергије и TOF-MS.

Дијагностичке методе се могу поделити и на активне и пасивне, као и на директне и индиректне. У пасивне методе спада емисиона спектроскопија, а у активне, оне које у извесној мери утичу на плазму, спадају дијагностичке методе које се заснивају на интеракцији упадног снопа зрачења и плазме. У директним методама се карактеристике плазме добијају без претпоставки о параметрима као што су тип термодинамичке равнотеже, расподела брзина електрона и јона, геометрија плазме и др. У индиректним методама се уводе одређене претпоставке о условима у плазми као што су нпр. тип расподеле честица и њихов степен ексцитације/јонизације. Пасивне и активне методе дијагностике плазме могу истовремено бити директне и индиректне [25-26].

Свака од дијагностичких метода има своје предности и мане и ни једна се метода не може користити за комплетну карактеризацију параметара плазме из разлога што свака од метода даје оптималне резултате у одређеном опсегу температура и режиму густине плазме.

У овом делу рада ће бити описане оптичке емисионе спектроскопске методе дијагностике плазме што је основа LIBS технике. У LIBS испитивањима постоје две основне претпоставке које се користе у дијагностици плазме, то су постојање локалне термодинамичке равнотеже и постојање оптички танких емисионих спектралних линија.

Локална термодинамичка равнотежа (LTE, Local thermodynamic equilibrium)

Успостављање термодинамичке равнотеже у LIP систему је веома вероватно али је тешко утврдити LTE услед транзијентне природе и великих градијената плазме. Најчешће коришћене методе за одређивање температуре плазме се стога заснивају на примени две равнотежне релације, Болцмановој (*Boltzmann*) једначини, која дефинише густину насељености, расподелу атома у истом стању јонизације, између различитих енергетских нивоа у функцији температуре (једначина 1), и Саха-Егертовој (*Saha-Eggert*) једначини која даје релативну расподелу атома између сукцесивних јонизационих стања у функцији температуре (једначина 2). Примена обе једначине се заснива на важењу локалне термодинамичке равнотеже, стања у коме је температура у Болцмановој и Саха-Егертовој једначини једнака температури у Максвеловој (*Maxwell*) релацији која даје расподелу брзине слободних електрона (једначина 3) у функцији температуре.

$$n_j = \frac{g_j n_{tot}}{U(T)} e^{-E_j/kT_{ex}} \quad (1)$$

n_j - број атома у побуђеном стању j

g_j - статистичка тежина побуђеног стања j атома

n_{tot} - укупна бројчана густина атома (број атома по јединици запремине)

$U(T) = \sum_j g_j e^{-E_j/kT}$ - партициона функција

k – Болцманова константа

T – температура побуђивања

$$\frac{n_{z+1}n_e}{n_z} = 2 \frac{U_{z+1}(T)}{U_z(T)} \left(\frac{2\pi m_e kT}{h^2} \right)^{3/2} e^{-E_{IP}/T} \quad (2)$$

$z, z+1$ - сукцесивна јонизациона стања датог елемента

m_e – маса електрона

E_{IP} – потенцијал јонизације од стања z до $z + 1$

$$\frac{dn}{n} = \left(\frac{m_e}{2\pi kT} \right)^{1/2} e^{-\frac{mv^2}{2kT}} dv \quad (3)$$

dn/n – фракција електрона са брзином у опсегу ($v, v+dv$)

У транзиентном систему какав је LIP, услови LTE постоје у случају када је време између судара честица у плазми кратко, кратко, у поређењу са временом трајања у коме долази до значајних промена у плазми. Да би стање LTE важило у плазми деексцитација сударима (атома и јона) са електронима мора доминирати у односу на радијационе прелазе (спонтану емисију која под LTE условима зависи од локалних услова који владају у плазми као и од расподеле насељености и вероватноће прелаза) што захтева велику густину електрона. То значи да колизиона фреквенција деексцитације неелестичним сударима друге врсте са електронима треба да буде десет пута већа од броја деексцитација спонтаном емисијом, тј. радијационим прелазом (тзв. МекВиртерово правило, *McWhirter*). Такође, колизиона фреквенција тројне рекомбинације треба да буде десет пута већа од колизионе фреквенције радијационе рекомбинације. Овај и претходно наведени услов су довољни да важе Болцманова и Сахаева расподела у којој фигурише T_e , што је довољно за опис плазме чак и ако T_e није једнако T_h . Важно је напоменути и то да услови LTE важе у случају плазми ниских температура при којима је расподела насељености стања током еволуције плазме условљена локалним условима у самој плазми који су дефинисани Болцмановом и Саха-Егертовом једначином. Неопходан али и не довољан услов за важење LTE је:

$$n_e \geq 1,6 \times 10^{12} T^{1/2} (\Delta E_{ij})^3 \text{ (cm}^{-3}\text{)} \quad (4)$$

ΔE_{ij} – разлика у енергији између стања i и j (eV)

T – температура плазме

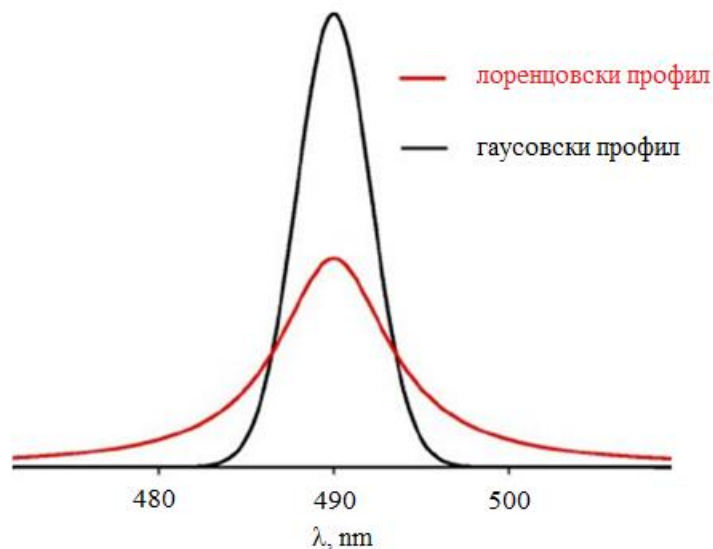
У већини случајева критична густина електрона у плазми је реда величине 10^{15} - 10^{16} cm^{-3} . У случају LIP које се генеришу под различитим експерименталним условима густина електрона у плазми задовољава критеријум постављен једначином 4. Постојање LTE у LIP мора задовољити још два критеријума, да су температура побуђивања и јонизације, које се одређују из Болцманове и Саха-Егертове једначине редом, упоредиве и да постоји слагање између Болцманове расподеле и експериментално одређених интензитета линија, што се огледа у линеарности Болцманове праве. Услови LTE не важе у плазмама високих температура и малих густина електрона (тзв. *non-equilibrium plasmas* или *non-LTE plasmas*).

Оптички танке спектралне линије

Примена метода за дијагностику плазме, одређивање густине електрона и температуре плазме, подразумева постојање оптички танких спектралних линија. Уколико тај услов није испуњен линије које се користе за карактеризацију плазме могу показивати самоапсорпцију. Провера оптичке дебљине линија се може вршити на више начина, један је и мерење релативних интензитета линија које припадају резонантним емисионим мултиплетним линијама посматраног елемента.

2.4.1.2.1. Дијагностика плазме коришћењем профила спектралних линија

Профил спектралних линија је условљен стањем плазме. Спектралне линије се проширују као последица више ефеката као што су: природно ширење, Штарково ширење (*Stark*), ван дер Валсово (*van der Waals*) и Доплерово (*Doppler*) ширење. У зависности од типа ширења профил спектралних линија може бити лоренцовски или гаусовски (слика 12). Поред ових ефеката ширења постоји и допринос профили линија који потиче од система за детекцију спектра, тзв. инструментални профил линије. Познавање инструменталног профила је неопходно уколико он није занемарљив (сматра се да треба да буде десет пута мањи од осталих ефеката ширења спектралних линија). Инструментално ширење линија зависи од експерименталних услова рада, ширине улазног и излазног разреза, квалитета компоненти спектрометра, феномена дифракције и др. Уколико је познат инструментални профил линије тада је допринос осталих ефеката ширења у профили експериментално добијене линије конволуција Гаусових (Доплерово и инструментално ширење) и Лоренцових профила (Штарково, резонантно и ван дер Валсово ширење). Комбинација профила се описује математичком функцијом која се зове Војтова функција (*Voigt*). Инструментално ширење линија се одређује скенирањем емисионог профила линије коју емитује нпр. шупља катода на ниском притиску или ласер, обично He-Ne ласер [24-27].



Слика 12 Лоренцовски и гаусовски облик спектралне линије

Природна ширина линије је последица Хајзенберговог принципа неодређености, одн. коначност средњег времена живота побуђених енергетских стања ($\tau\Delta E \geq h/2\pi$). То је особина атома а не последица спољашњих фактора. Што је вероватноћа спонтане емисије већа то је време живота стања краће а ширина линије већа. Природно ширење линија даје тзв. лоренцовски облик линије у спектру (слика 12).

Штарково ширење се односи на феномен код кога се спектралне линије атома или јона шире у присуству спољашњег електричног поља. Овај ефекат настаје услед промене енергетских нивоа атома приликом интеракције електричног поља и наелектрисаних честица у атому, што има за последицу померање фреквенција емитованог или апсорбованог зрачења. Штарково ширење је израженије за високо побуђена стања и у окружењима са високом густином електрона, као што је плазма. Ефекат је доминантан у раним фазама развоја плазме када је N_e веће али за неке елементе може доминирати и за мале вредности N_e . Доплерово ширење је последица термалног кретања честица и доминантно је у каснијим фазама развоја LIP-а. Овај тип ширења није у конкуренцији са Штарковим већ са Лоренцовим ширењем линија, посебно на атмосферском притиску. Који ће тип ширења бити доминантан зависи од тежине атома, колико је побуђени ниво енергетски висок и др. Ван дер Валсово ширење спектралних линија настаје под утицајем интермолекулских интеракција, посебно у случајевима када се LIP шири у област умереног до високог притиска. Ово проширење произилази из промена у енергетским нивоима атома или молекула услед судара са околним честицама гаса. При атмосферском притиску, померања фреквенције и ширине линија зависе не само од својстава атома који емитују, већ и од фактора као што су маса атома и од тога који су побуђени нивои укључени у прелазе. Тежи атоми имају тенденцију да имају веће попречне пресеке за сударе, што може побољшати ефекат ширења. Поред тога, степен ексцитације игра важну улогу јер виша побуђена стања могу имати већи степен интеракције са околним честицама, што доводи до израженијег ширења линија[23-28].

Одређивање густине електрона из Штарковог ефекта ширења спектралних линија

Штарков ефекат има главну улогу у одређивању густине електрона у LIP-у. Штарков ефекат настаје као последица присуства јона и електрона, наелектрисаних честица, у близини других врста које подлежу спектралним прелазима. Наелектрисане честице из плазме својим резултујућим електричним пољем, чија се вредност мења у простору и времену услед њиховог хаотичног кретања, утичу на ширину спектралних линија. Свако екстерно електрично поље проузрокује промену енергије атома који емитује услед интеракције електричног поља и диполног момента атома/молекула који емитује. Као последица ове интеракције долази до цепања енергетских нивоа. Штарково ширење доминантно зависи од концентрације електрона док је зависност од температуре слаба. Важно је напоменути и то да Штарково ширење не зависи од испуњености услова за LTE. Ширење линија може зависити линеарно или од квадрата јачине електричног поља што разликује линеарни од квадратног Штарковог ефекта, редом [24-27].

Штарково ширење линија заједно са различитим параметрима спектралних линија (интензитет и облик), па чак и карактеристикама континуалног зрачења, може бити корисно за одређивање параметара плазме, као што су температура електрона, притисак и густина електрона.

За одређивање густине електрона на основу Штарковог ефекта није неопходно познавање апсолутног интензитета емисије. Најважнији експериментални параметар у одређивању густине електрона на основу Штарковог ефекта је добра спектрална резолуција инструмента, довољна раздвојеност између линија као и интензитет линија. Ту се такође убрајају и познавање коефицијента Штарковог ширења, рад са оптички танким линијама довољног интензитета, осетљивости на Штарков ефекат као и раздвајање Штарковог ширења од осталих ефеката ширења спектралних линија. Како је ефекат Штарковог проширења спектралних линија значајан у случају када је густина плазме $\geq 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ стандардни спектрографи са резолуцијом од $\left(\frac{\lambda}{\Delta\lambda} \geq 10000\right)$ су сасвим задовољавајући за рад.

Уколико се претпостави да је инструментални профил линије гаусовског типа, $\Delta\lambda_{instrumental}$, а остали ефекти ширења линија занемарљиви тада се ефекат Штарковог ширења, $\Delta\lambda_{Stark}$, може добити мерењем полуинтензитетске ширине линије (FWHM, *Full Width Half Maximum*) ($\Delta\lambda_{measured}$) коришћењем релације 5 [22]:

$$\Delta\lambda_{измерено} = \frac{\Delta\lambda_{Штарк}}{2} + \sqrt{\left(\frac{\Delta\lambda_{Штарк}}{2}\right)^2 + (\Delta\lambda_{инструментално})^2} \quad (5)$$

Уколико су Штарков и инструментални профил линије лоренцовског типа тада се профил експериментално добијене линије даје релацијом 6 [22]:

$$\Delta\lambda_{измерено} = \Delta\lambda_{Штарк} + \Delta\lambda_{инструментално} \quad (6)$$

Експериментални профил линије је конволуција гаусовског и лоренцовског профила тако да је за добијање правог профила спектралне линије неопходно извршити погодну деконволуцију.

Линеарни Штарков ефекат се примењује на атом водоника, атоме сличне водонику и атоме који су у високо побуђеним стањима док се квадратни Штарков ефекат односи на све друге системе. Линеарни Штарков ефекат има за последицу веће цепање линија, за исту јачину поља, у односу на квадратни ефекат. Са друге стране квадратни Штарков ефекат доводи до асиметричног ширења линија атома и симетричног ширења линија јона.

Најизраженији линеарни Штарков ефекат се јавља код спектралних линија водоника. Све линије водоника ($H_\alpha = 656,285nm$; $H_\beta = 486,133nm$; $H_\gamma = 434,047nm$; и $H_\delta = 410,174nm$) се могу користити за дијагностику. H_α линија је највећег интензитета али такође и линија која је под највећим утицајем динамике јона. Такође, осцилаторна јачина прелаза који доводи до појаве H_α линије је око четири пута већи у односу на H_β линију што може довести до самоапсорпције. H_β линија је погоднија за анализу јер је мањег интензитета, што не доводи до самоапсорпције, и под мањим утицајем динамике јона. Такође, профил ове линије је под мањим утицајем температуре. Ова линија мање интерферира са другим линијама, али уколико је густина електрона већа од 10^{17} - 10^{19} cm^{-3} коришћење H_β линија није повољно из разлога повећања ширине профила и преклапања са H_γ и H_δ линијама у спектру.

Постоји низ емпиријских релација на основу којих се израчунава густина електрона на основу Штарковог ефекта [26]:

$$\Delta\lambda_{H_\alpha} (nm) = 1,3 \left(\frac{n_e}{10^{17}} \right)^{0,64 \pm 0,03} \quad (7)$$

$$\Delta\lambda_{H_\beta} (nm) = 4,5 \left(\frac{n_e}{10^{17}} \right)^{0,71 \pm 0,03} \quad (8)$$

n_e - густина електрона у cm^{-3}

Једначина 7 је применљива у случају када је густина електрона у опсегу 0,01 до $100 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$, а једначина 8 када је густина електрона у опсегу 0,03 до $8 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$. Тачност одређивања густине електрона зависи од грешака одређивања параметара у једначини за израчунавање Штарковог профила линије. Временска еволуција густине електрона у плазми, коришћењем неколико емисионих линија више елемената, показала је знатно расипање

вредности што се сматра ограничењима у тачности теоријских прорачуна [25]. На слици 13 приказана је временска еволуција Штаркових профила линије калцијума и водоника.

У литератури се налазе и друге апроксимативне релације на основу којих се може израчунати густина електрона [28]:

$$n_e = C(n_e T) \Delta \lambda_{Stark}^{3/2} \quad (9)$$

$\Delta \lambda_{Stark}$ - полуинтензитетска ширина линије услед Штарковог ефекта

$C(n_e T)$ - коефицијент који слабо зависи од концентрације електрона и температуре

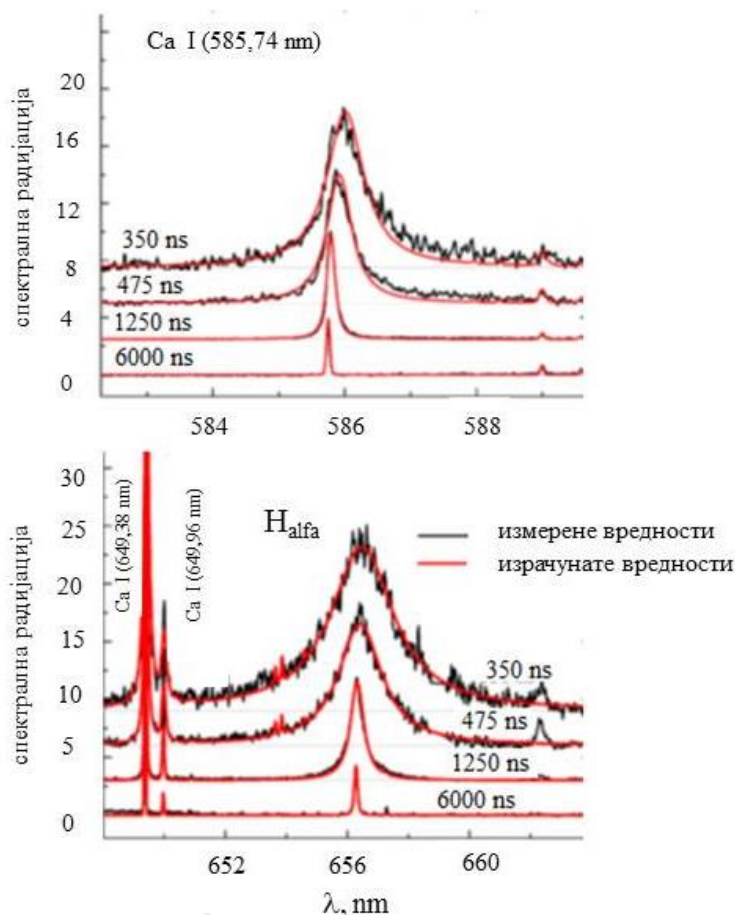
Још једна релација која повезује штарковску полуинтензитетску ширину линије и густину електрона је облика [29,30]:

$$\Delta \lambda_{1/2} = 2W \left(\frac{n_e}{10^{16}} \right) + 3,5A \left(\frac{n_e}{10^{16}} \right)^{1/4} \times \left(1 - \frac{3}{4} N_D^{-1/3} \right) W \left(\frac{n_e}{10^{16}} \right) A^0 \quad (10)$$

W – фактор утицаја електрона на различитим температурама

A – параметар који описује јонско ширење линија

N_D – број честица у Дебајевој сфери



Слика 13 Временска еволуција Штарковог профила линија калцијума и водоника [26]

Први члан у једначини 10 описује ширење услед судара електрона, а други члан је корекциони члан за јонско ширење. Када се ради о атомима који нису водоник други члан се може занемарити тако да се једначина редукује у једначину облика:

$$\Delta\lambda_{1/2} = 2W \left(\frac{n_e}{10^{16}} \right) A^0 \quad (11)$$

За одрђивање густине електрона, у случају када плазма не садржи водоник и водонику сличне атоме, користи се квадратни Штарков ефекат. Одређивање густине електрона на овај начин је мање прецизно јер је ширење линија мање. Такође, овај ефекат ширења се може користити само при већим концентрацијама електрона. Предност примене квадратног Штарковог ефекта је могућност коришћења линија многих других елемената тако да је лакше избећи њихово преклапање (Ar, N, O,...). За атоме са два или више електрона ширење линија које је последица квадратног Штарковог ефекта се апроксимативно даје релацијом [28]:

$$\Delta\lambda_{Stark} \approx 2[1 + 1,75A(1 - 0,75R)] w \frac{n_e}{n_e^{ref}} \quad (12)$$

w - полуширина која је под утицајем електрона

A - параметар јонског ширења који је мера важности судара са јонима у ширењу линија

n_e - густина електрона

n_e^{ref} - референтна вредност густине електрона (реда величине 10^{16} - 10^{17} cm^{-3}) за коју се рачунају параметри A и w

R - однос средњег растојања између јона и Дебајевог радијуса

Одређивање температуре плазме

Температура плазме је важно термодинамичко својство плазме јер се преко ње могу описати и предвидети и друге карактеристике плазме као што су релативне насељености енергетских нивоа и расподела брзина честица.

Температура јона и електрона је директно пропорционална средњој кинетичкој енергији. У термичкој равнотежи, расподела брзина за сваку врсту честица се покорава Максвеловој расподели. Како је услов термодинамичке равнотеже тешко постићи у лабораторијским плазмама то се у обзир узима LTE када се иста температура повезује са свим честицама у плазми: атомима, јонима и електронима. У LIBS мерењима под нормалним притиском показано је да се услов LTE постиже после неколико стотина наносекунди, у случају када је озрачивање веће од 10^8 W cm^{-2} . У одсуству LTE плазма показује сложену везу између температуре електрона (T_e) и температуре јона (T_h), што доводи до различитих физичких својстава и понашања плазме. У условима одсуства LTE енергије електрона и јона не достижу заједничку равнотежу, што значи да се T_e и T_h могу значајно разликовати. Овај диспаритет је пресудан, пошто T_e првенствено управља процесима ексцитације и јонизације унутар плазме због много виших енергетских нивоа електрона у поређењу са јонима. Будући да су лакши и покретљивији, електрони су одговорни за нееластичне сударе који доминирају реакцијама које доводе до јонизације и ексцитације атома и молекула присутних у плазми. Сходно томе, велике вредности T_e могу довести до већег степена јонизације и побуђивања на већи број побуђених стања, значајно утичући на спектралну емисију. Насупрот томе, T_h утиче на укупну енталпију и кинетичку енергију јона унутар плазме, што често доводи, услед њихове веће масе, до споријег прилагођавања спољашњим утицајима у поређењу са електронима. Овај диспаритет отежава карактеризацију плазме и има за последицу различите степене хемијских реакција, емисију зрачења и процесе преноса енергије који нису предвиђени локалним термодинамичким моделом равнотеже [24-27].

Неколико најчешће коришћених метода за одређивање температуре LIP плазме су Доплерово ширење, методе мерења апсолутних и методе мерења релативних интензитета спектралне емисије. Методе засноване на мерењу релативних интензитета спектралне емисије су мање захтевне у односу на методе мерења апсолутних интензитета спектралне

емисије јер јер се заснивају на мерењу релативног односа осетљивости спектрометра на одређеним таласним дужинама [24-27].

Одређивање температуре LIP, примена Доплеровог ефекта

Доплерово ширење је последица термалног кретања атома. Доплеров ефекат је појава промене фреквенције коју региструје детектор у случају када се детектор и/или емитер релативно крећу. Доплерово ширење се јавља у спектрима атома у гасном стању који се произвољно крећу. Фреквенција зрачења која бива апсорбована или емитована током прелаза од стране молекула/атома се мења у зависности од правца кретања атома у односу на извор зрачења. Доплерово ширење даје гаусовски облик линије (није хомогено јер се атоми произвољно крећу и то произвољним брзинама). Опсег фреквенције који обухвата профил спектралне линије је дат изразом:

$$\Delta \nu = |\nu_0 - \nu| = \nu_0 \frac{v}{c} \cos \theta = \nu_0 \frac{v_x}{c}$$

$$\Delta \lambda_{Dop.} = |\lambda_0 - \lambda| = \frac{\lambda_0 v_x}{c}$$
(13)

Код плазми које се посматрају у вакуму материјал мете који се одваја аблацијом има велику брзину ширења тако да је главни допринос ширењу профила линија Доплерово ширење које потиче од врста које у различитим деловима плазме имају различите компоненте брзине у правцу посматрања.

Полуинтензитетска ширина спектралне линије проширена деловањем Доплеровог ефекта је:

$$\Delta \lambda_D = 2\lambda_0 \sqrt{\frac{2kT \ln 2}{mc^2}} \approx const \sqrt{\frac{T}{m}}$$
(14)

ν_0 – фреквенција зрачења коју честица плазме емитује

v_x – компонента брзине у правцу посматрања

λ_0 – таласна дужина на максимуму емисионе линије

T – температура плазме

m – маса молекула

c – брзина светлости

Једначина 14 показује зависност доплеровског ширења од таласне дужине, температуре и масе честица. Уколико се честице у плазми покорављају Максвеловој расподели брзина тада је на основу доплеровског ширења могуће одредити температуру плазме која је мера средње кинетичке енергије честица плазме. На једној истој температури ефекат Доплеровог ширења је већи за лаке атоме (јоне или молекуле). Једначина 14 важи само у случају када је средњи слободни пут честице већи од $\lambda/2\pi$ одн. када честице не трпи судар током емисије фотона. Другим речима, када се притисак у плазми повећава овај услов се мења јер се смањује средњи слободни пут честице, а тиме мења и вредност таласне дужине која фигурише у релацији (повећањем притиска релација не важи за веће таласне дужине) [24-27].

2.4.2 Вибрационе спектроскопије

Савремена вибрациона спектроскопија обухвата широку палету техника заснованих на два фундаментално различита феномена, апсорпцији инфрацрвеног (ИЦ) зрачења и расејању ултраљубичастог (УЉ), видљивог (ВИД) или блиског ИЦ зрачења. Данас инфрацрвена и раманска спектроскопија постају све заступљеније спектроскопске методе у форензици. Обе методе су недеструктивне, брзе и квантитативне. Протеклих година учињени су велики напретци на пољу развоја ових метода које се могу користе у анализи телесних течности, идентификацији муниције и експлозива, идентификацији боја, пигмената и премаза, анализи рукописа и уметничких дела, анализи косе, костију, длака и влакана, анализи дрога, биолошких агенаса и др. [2, 31-33].

Употреба инфрацрвене спектроскопије у одређивању молекулске структуре има своје корене чврсто успостављене још у 19. веку, од открића инфрацрвеног спектра зрачења 1800. године од стране Сер Вилијама Хершела (*Sir William Herschel*). Ефекат раманског расејања откривен је касније, 1928. године, од стране Сер Чандрасекара Рамана (*Sir Chandrasekhar Raman*). У прошлости је највеће ограничење у примени инфрацрвене и раманске спектроскопије у форензичкој структурној анализи представљала неопходна количина материјала који је био потребан за анализу као и сам поступак припреме узорка који је често подразумевао његово механичко или хемијско разарање. Веома важна прекретница у развоју форензичке анализе десила се средином 20. века када је напредак у развоју спектроскопских техника омогућио добијање веома важних података о структури материје недеструктивним путем. Током седамдесетих година прошлог века направљени је велики искорак када је оптички микроскоп спојен са спектроскопом чиме је било могуће одредити састав на просторно веома малим деловима узорка. Први инфрацрвени микроспектрометар појавио се средином 1960-их година а први рамански микроспектрометар 1976. године [31-33].

2.4.2.1. Инфрацрвена спектроскопија

Молекулске вибрације описују осцилаторно кретање атома унутар молекула око њихових равнотежних положаја. Молекулске вибрације су кључне за разумевање широког спектра физичких и хемијских особина молекула, укључујући међумолекулске интеракције, топлотни капацитет и апсорпцију светлости.

Вибрационо кретање молекула је периодично приближавање и удаљавање атома у молекулу у односу на равнотежни положај. Вибрационо кретање је карактеристично за сва агрегатна стања и температуре. Вибрациони спектри у ИЦ области спектра настају прелазима између различитих вибрационих нивоа основног електронског стања молекула. Ови спектри најчешће настају у апсорпцији и детектују се у интервалу енергија од $10\text{-}13000\text{ cm}^{-1}$. У блиској ИЦ области спектра зрачења ($13000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) јављају се виши тонови (овертонови), у средњој ИЦ области ($4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) вибрације функционалних група молекула а у далекој области ($200\text{-}10\text{ cm}^{-1}$) вибрациони облици кристалне решетке [34,35].

Вибрациони спектри кондензованих, вишеатомских, молекула имају знатно већу примену од спектра гасова и пара. Како у наведеним спектрима немаразложене ротационе структуре за њихово описивање се користе исте релације које се примењују на чисто вибрационе прелазе молекула. Вишеатомски молекули се могу посматрати као скуп $3N-6$ (нелинеарани молекули) или $3N-5$ (линеарани молекули) засебних осцилатора (N је број атома у молекулу). У апроксимацији хармонијског осцилатора енергија вибрације вишеатомског молекула се даје једначином:

$$E_v = hc\omega_1(v_1 + \frac{d_1}{2}) + hc\omega_2(v_2 + \frac{d_2}{2}) + \dots \quad (15)$$

чему свака нормална вибрација има свој квантни број $v_{(1, 2, \dots)}$ и своју фреквенцију осциловања:

$$\omega_{1,2,3,\dots} = \frac{hv_{1,2,3,\dots}}{c} \quad (16)$$

Када се ради о вибрацијама које имају амплитуду упоредиву са дужином хемијске везе тада се вибрационо кретање вишеатомских молекула може сматрати збиром више простих (линеарних) вибрација које се називају *основне* или *нормалне* вибрације. Осцилације језгара у нормалним облицима су хармонијске, што значи да сва језгра осцилују истом фреквенцијом и истом фазом (истовремено достижу максимуме и минимуме) а различитим амплитудама. Свака нормална вибрација има своју основну фреквенцију:

$$v_{osc.} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (17)$$

k - константа силе

μ - редукована маса

У кондензованим системима вибрације се могу поделити на оне карактеристичне за функционалне групе у молекулу (групне вибрације) и скелетне вибрације.

Положаји трака групних вибрација су у великом степену независни од најближе околине групе. У кондензованим системима положај трака групних вибрација је под утицајем температуре, растварача, физичког стања, симетрије молекула, механичког спрезања вибрација истих или сличних осцилатора, Фермијеве резонанције, електронских ефеката супституената (индуктивни, резонантни, ефекат коњугације) [34,35]. Групне вибрације се деле на валентне и деформационе, у зависности да ли се у молекулу мења дужина или угао веза. Валентне групне вибрације се јављају у области од $4500-1500 \text{ cm}^{-1}$ која се користити у квалитативној анализи за добијање информација о постојећим функционалним групама у испитиваним молекулима. Валентне групне вибрације молекула се грубо могу оделити на оне у којима учествују атоми повезани једноструким (X–H типа C–H и O–H), двоструким (X=Y типа C=C, C=N и C=O) и троструким (X≡Y типа C≡C и C≡N) везама. Траке деформационих групних вибрација јављају се у области испод 1500 cm^{-1} .

Скелетне вибрације молекула настају услед спрезања различитих облика валентних и савијајућих вибрација ланчаних, прстенастих или рачвастих структура у молекулу. Област скелетних вибрација се назива облашћу „отиска прста“ [34,35].

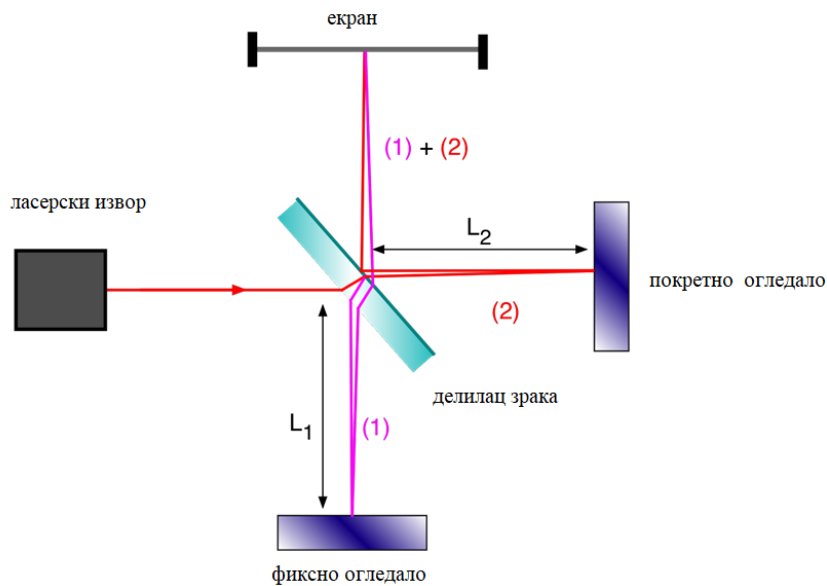
Инструменти и технике снимања вибрационих инфрацрвених спектра

Вибрациони инфрацрвени спектар се представља као зависност процента пропуштеног инфрацрвеног зрачења (транспаренције) од таласне дужине (таласног броја) зрачења. Данас је развијено више техника снимања ИЦ спектра. У основне технике ИЦ спектроскопије спадају: дисперзиона и трансмисиона инфрацрвена спектроскопија (са или без Фуријеове трансформације); рефлексione технике у средњој ИЦ области и ИЦ микроскопија [34,35].

Дисперзиона, трансмисиона, инфрацрвена спектроскопија

Дисперзиона, трансмисиона, инфрацрвена спектроскопија је основна техника снимања инфрацрвених спектра. Овом техником је могуће снимати чврсте, течне и гасовите узорке, у спектралном подручју таласних бројева од $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Дисперزيونи спектрофотометри су најчешће двозрачни.

Много већу примену у пракси имају инструменти са Фуријеовом трансформацијом. Код инфрацрвене спектроскопије с Фуријеовом трансформацијом (FTIR) све фреквенције које долазе из инфрацрвеног извора зрачења падају истовремено на детектор и током мерења цело спектрално подручје доприноси мерном сигналу. Главни део FTIR спектрофотометра је Мајкелсонов интерферометар (слика 14) који садржи пет основних елемената: извор, три оптичка елемента (фиксно огледало, огледало за скенирање и делилац снопа) и детектор.



Слика 14 Мајкелсонов интерферометар [36]

Монохроматско зрачење из извора пада на делилац снопа који дели пропуштени зрак у односу 50:50. Половина пропуштеног зрака представља упадни зрак за фиксно огледало а друга половина за огледало које се покреће. Приликом рефлексије са огледала зраци се рекомбинују и интерферују. Када је растојање између делиоца снопа и два огледала једнако јавља се тзв. *zero path difference* (ZPD), нулта путна разлика између зрака која доводи до конструктивне интерференције. Уколико се покретно огледало помери за $\lambda/4$ (λ -таласна дужина упадног зрачења) путна разлика између два таласа, до делиоца снопа, је $\lambda/2$ што има за последицу деструктивну интерференцију. Деструктивна интерференција је максимална за вредности путне разлике таласа $\lambda/2, 3\lambda/2, 5\lambda/2, \dots$. Када је вредности путне разлике између таласа једнака целобројном умношку таласних дужина упадног зрачења ($\lambda, 2\lambda, 3\lambda, \dots$) рефлектовани таласи ће подлезати конструктивној интерференцији. Код стандардних спектрометара огледало које се помера се креће константном брзином тако да детектор мери синусоидну промену интензитета, тзв. интерферограм. Математичком трансформацијом добијеног интерферограма се директно добија интензитет пропуштеног зрачења од фреквенције одн. инфрацрвени спектар испитиваног једињења. Када се посматра само једна таласна дужина упадног зрачења Фуријеовом трансформацијом се добија само једна линија, на таласној дужини упадног зрачења λ . Када се на узорак шаље низ таласних дужина сигнал који се добија у FTIR спектрима садржи информације о целом спектру узорка (све λ) и овај сигнал се Фуријеовом трансформацијом преводи из времесног у фреквентни домен. Предности FTIR технике су: *a*) изузетно велика осетљивост (могућност анализе узорака величине и неколико μm), *b*) велика моћ разлагања и репродуктивност (могућност анализе

вeома сложенeх спектара, са много трака, ова техника има изузетну тачност таласних бројева од $0,01 \text{ cm}^{-1}$, што има за последицу могућност одређивања вeома ниских концентрација), *в*) могућност истовремене детекције свих таласних дужина извора (добијање целог спектра у времену од 1 секунде или краће) [34,35].

Рефлексионе технике у средњој инфрацрвеној области

Рефлексионе технике анализе се могу поделити на технике засноване на: *а*) унутрашњој, *б*) спољашњој и *в*) дифузионој рефлексији [34].

Пригушена укупна рефлексија (*Attenuated total reflection*, ATR) је спектроскопска техника која има изузетно велику примену у форензици. Ова техника омогућава да се узорци (прашкasti или течни) анализирају директно, без претходне припреме. Техника се заснива на феномену тоталне унутрашње рефлексије који се јавља када упадно зрачење пада на површину под углом који је већи од критичног угла (минимална вредност угла при којој се рефлексија јавља) (слика 15). Инфрацрвени зрак се усмерава, под одређеним углом, на оптички густе кристал високог индекса преламања (*ZnSe*, *Ge*, *дијамант типа II*) који пропушта ИЦ зрачење одређене енергије. На површину кристала се поставља узорак чији је индекс преламања мањи од индекса преламања кристала. Зрак се усмерава на узорак на коме долази до унутрашње рефлексије. Унутрашња рефлексија ствара краткотрајни талас (тзв. непостојећи талас, енгл. *evanescent wave*) који се шири иза површине кристала у узорак и који продире само неколико микрона иза површине кристала у узорак тако да је добар контакт кристала са површином узорка од изразитог значаја. Дебљина продирања таласа (d_p) (у одсуству апсорпције) је дубина на којој амплитуда електричног поља непостојећег таласа пада на вредност $1/e$ (37%) у односу на вредност коју има на површини:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_2 \sqrt{\sin^2 \theta - \frac{n_1}{n_2}}} \quad (18)$$

λ - таласна дужина упадног зрачења

θ - угао под којим пада упадно зрачење на медијум већег индекса преламања, n_1 (кристал)



Слика 15 Пригушење вишеструке унутрашње рефлексије [37]

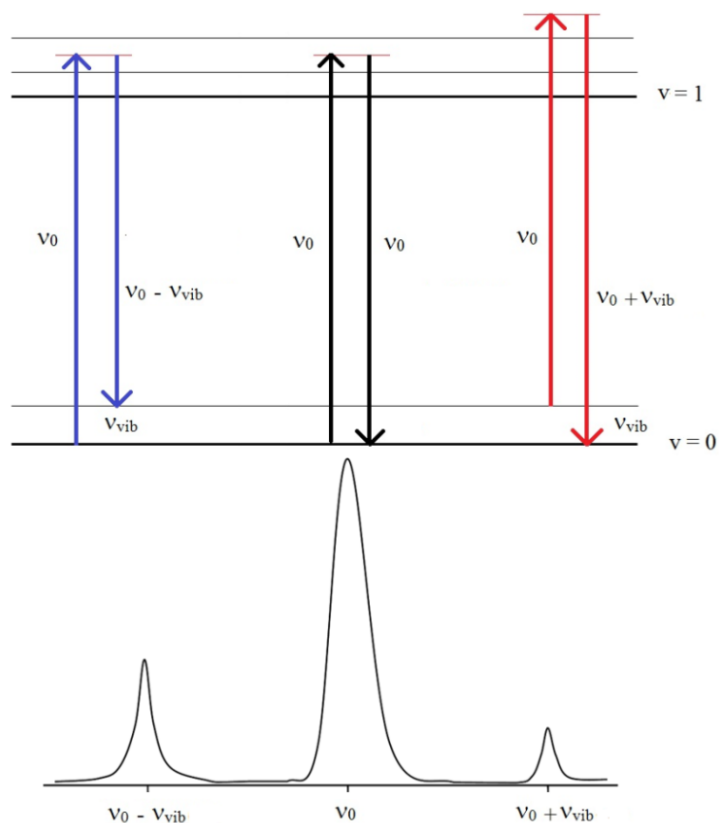
Из једначине 18 се види да ће дубљина продирања непостојећег таласа бити већа уколико је већа таласна дужина упадног зрачења и мања уколико су упадни угао и индекс преламања кристала већи. Променом таласне дужине и материјала кристала мењају се услови унутрашње рефлексије одн. број рефлексија и степен пригушења. При свакој рефлексији (којих има више дуж кристала) долази до смањења интензитета рефлектованог зрачења. Детектор мери смањење интензитета зрачења које је последица вишеструке унутрашње рефлексије.

2.4.2.2 Раманска спектроскопија

Раманска спектроскопија је метода квалитативне, квантитативне и структурне хемијске анализе, базирана на Рамановом ефекту, појави расејавања монохроматског видљивог, ултраљубичастог и блиског инфрацрвеног зрачења на молекулама неапсорбујуће средине. По механизму настајања рамански спектри су двофотонски и често се називају спектрима комбинационог расејања, јер се упадна фреквенција "комбинује" са фреквенцијом унутрашњег кретања молекула [38,39].

Раманска спектроскопија се користе примарно у квалитативној анализи која се заснива на специфичности положаја трака функционалних група (органиска једињења и биолошки узорци) или положаја трака аниона (неорганиска једињења). Раманска спектроскопија се успешно примењују и у области форензике [38,39]. Метода је комплементарна инфрацрвеној апсорпционој спектроскопији у испитивањима структурних карактеристика молекула. Због разлике у изборним правилима за појаву две врсте спектра, код молекула са центром симетрије инфрацрвено активне вибрације се не јављају се у раманском спектру и обрнуто. За мање симетричне и несиметричне молекуле, спектри се делимично разликују или се пак траке јављају на истим положајима при чему је интензитет трака које потичу од истог типа вибрација различит.

У спектру расејаног зрачења се јављају три компоненте, Рејлијева (исте енергије као и побуђујуће, упадно, зрачење), Стоксова (компонента на мањој енергији у односу на Рејлијеву компоненту) и анти Стоксова компонента (компонента на већој енергији у односу на Рејлијеву компоненту) (слика 16). Раманско расејање је процес који је мање вероватан од еластичног Рејлијевог расејања јер се тек један од 10^7 фотона нееластично расејава. Раманско Стоксово расејање је процес који је на нормалним температурама вероватнији од анти Стоксовог расејања јер се на собној температури већина молекула налази на основном вибрационом нивоу основног електронског стања.

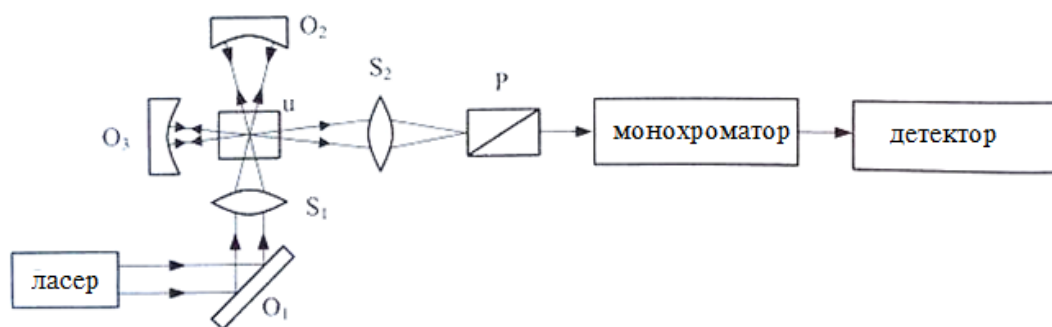


Слика 16 Компоненте раманског расејања: Стоксова, Рејлијева и анти Стоксова компонента (с лева на десно)

До данас је развијено више техника раманске спектроскопије. Поред нормалне раманске спектроскопије ту су и резонантна раманска спектроскопија, (*Resonance Raman Spectroscopy*, RR), површински појачана раманска спектроскопија (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) и површински појачана резонантна раманска спектроскопија (*Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy*).

Инструменти и технике снимања раманских вибрационих спектра

Рамански спектрометри могу бити дисперزيونи и спектрометри са Фуријеовом трансформацијом. Принцип конструкције раманских спектрометара је различит у односу на конструкцију инфрацрвених спектрометара. Инструмент се састоји од извора монохроматског зрачења, оптике за фокусирање ласерског снопа на узорак (једно или систем сочива), оптике за сабирање расејаног зрачења које се усмерава ка монохроматору, монохроматора и детектора (слика 17). Рамански расејано зрачење испитује се под углом од 90° у односу на правац интензивног упадног зрачења како би се отклонила могућност да оно маскира рамански спектар и евентуално оштети детектор [38,39].



Слика 17 Оптичка схема раманског спектрометра [34]

Монохроматско ласерско зрачење се усмерава ка узорку помоћу огледала O_1 и сочива S_1 . Упадно зрачење се још једном враћа на узорак помоћу рефлексивног огледала O_2 , а емитовано (расејано) зрачење се директно, и рефлексijом са огледала O_3 помоћу сочива S_2 , фокусира на поларизатор P и разрез монохроматора (којим се одређује деполаризациони однос који даје информације о симетрији вибрација, $\rho = I_{\perp}/I_{\parallel}$). За анализу расајеног зрачења користи се монохроматор који представља решетку са 1200 или 1800 зареза/mm. Као детектори расејаног зрачења користе се детектори УВ/ВИД зрачења, фотомултипликаторске цеви или диодни низови. Данас су у великој употреби CCD детектори (*Charge Coupled Device*). Савремени рамански спектрометри раде на принципу Фуријеове трансформације [38,39].

2.4.3 Скенирајућа електронска микроскопија са енергетски дисперзионом спектроскопијом рендгенских зрака

Скенирајућа електронска микроскопија са енергетски дисперзивном спектроскопијом X-зрака (*Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*, SEM-EDX) је техника која се широко користи у различитим научним областима за детаљну анализу морфологије површине и елементног састава материјала. Метода је нашла веома широку примену у области науке о материјалима, електроници, форензици, геологији, испитивањима површине и елементног састава биолошких узорака (ткива или ћелије) [40-43].

Скенирајућом електронском микроскопијом се добија слика површине узорка високе резолуције. SEM користи фокусирани сноп електрона који скенира површину узорка. Како ови електрони ступају у интеракцију са атомима на површини, они производе сигнале који се могу детектовати и претворити у детаљне слике са увећањем и до 100 000 пута и резолуцијом до нанометарске скале. SEM слике површине приказују топографију, површинску текстуру, морфологију, облик и величину, узорака, што је кључно за разумевање својстава материјала.

SEM се користи у спрези са енергетски дисперзивном рендгенском спектроскопијом која пружа информације о елементном саставу испитиваног материјала. Када електронски сноп из SEM-а ступи у интеракцију са узорком, то проузрокује избацивање електрона унутрашњег омотача из атома у узорку. Како електрони спољашње љуске попуњавају ова празна места, рендгенски зраци се емитују са енергијама карактеристичним за елементе који су присутни у узорку. EDX детектор мери енергију и интензитет емитованих рендгенских зрака, омогућавајући идентификацију и квантификацију елемената у узорку. EDX такође може мапирати дистрибуцију елемената по површини узорка, приказујући где су елементи концентрисани.

3. АКТУЕЛНОСТ ПРОБЛЕМАТИКЕ У СВЕТУ

Протеклих година учињен је велики напредак на пољу развоја и примене спектроскопских метода у анализи форензичких узорака костију [2,17,44-75].

Анализа састава људског/животињског коштаног ткива је уобичајена у форензичкој пракси из разлога што информације које би могле бити добијене често омогућавају разликовање између различитих појединаца/врста или сврставање остатака у класе. Концентрација елемената у траговима који се налазе у костима су у вези са начином живота, старошћу, полом, метаболизмом, начином исхране, животном средином и др. Такви елементи су укључени у бројне метаболичке процесе који имају за коначни исход акумулацију елемената у коштаном ткиву. Анализа елемената у траговима у костима се обично врши помоћу стандардних спектроскопских техника, AAS, ICP, ICP-MS, LA а у последње време све више и применом LIBS технике [59].

Примена LIBS технике у областима биоархеологије и форензичке антропологије отвара нова врата за брзу и недеструктивну анализу скелета омогућавајући антрополозима да сагледају људске/животињске варијације на елементарном нивоу одн. дајући могућност креирања индивидуалних елементних профила. Главни предност LIBS технике, у односу на друге, је могућност анализе минималних количина узорака, без потребе за било каквом припремом. Такве карактеристике, према специфичним потребама форензичког истраживања, дају могућност рада *in situ*, на веома малим фрагментима костију и/или вршење анализе много различитих узорака у врло кратком времену уз њихово очување за даљу анализу, када је то потребно.

Касем (*Kasem*) и сарадници су извршили LIBS анализу матрице вештачких калцификованих ткива мерењем интензитета калцијумових атомских и јонских линија [60]. Аутори су направили три вештачка референтна узорка који су представљали три различите матрице на бази калцијума: CaCO₃ матрицу, матрицу пепела кости и матрицу Са-хидроксиапатита. Као ексцитациону таласну дужину користили су зрачење од 266 nm (UV-LIBS) и зрачење од 1064 nm (IC-LIBS). Резултати су показали да се коришћењем UV-LIBS технике постиже добра репродуктивност мерења, прецизност, стабилни услови генерисања плазме, боље линеарно фитовање као и смањење утицаја позадине. Такође је показано да се пепео кости може користити као стандардни материјал за калибрацију калцификованих ткива коришћењем UV-LIBS технике и ексцитационе таласне дужине од 266 nm. Касем је такође испитивао и утицај биолошке деградације и утицај околине на археолошки материјал, кости, из периода више различитих египатских династија. Констатовано је да пост-мортем ефекти морају бити узети у обзир приликом анализе материјала, посебно у случају разматрања исхране преминулих. Такође, констатована је јасна корелација између степена деградације коштаног ткива и одсуства CN и C₂ молекулских трака у LIBS спектрима [60].

Русак (*Rusak*) и сарадници су такође користили LIBS технику у анализи биоархеолошког материјала као што су калцификована ткива, зуби и кости [61]. Они су процењивали очуваност материјала мерењем односа калцијума и флуора (Ca/F) на површини и дубљим слојевима материјала користећи емисионе линије Ca(I) на 671,8 nm и F(I) на 685,6 nm. За процену очуваности колагена коришћен је однос угљеника и азота (C/N). Констатовано је да је однос Ca/F мањи у костима које нису очуване и обрнуто. После више од 200 ласерски пулсева дошло се до критичне вредности односа Ca/F од 5,70 која се може користити за разликовање добро од лоше очуваних костију [61].

Мазалан (*Mazalan*) и сарадници су користили LIBS за одређивање односа Ca/P у хидроксиапатиту животињских костију, костима јагњета, говечета и рибе [63]. Синтетички хидроксиапатит се у медицини користи као костни цемент који мора бити компатабилан са хидроксиапатитом у костима пацијента одн. мора имати одговарајући однос Ca/P. За анализу су коришћене емисионе линије Ca(I) на 442,54 nm и P(I) на 534,59 nm. Резултати, који су потврђени и применом EDX методе, су показали да LIBS техника даје тачне резултате мерења.

Монкајо (*Moncajo*) и сарадници су користили LIBS технику и неуронску мрежну анализу 25 пост-мортем узорака људских костију и 12 зуба [64]. Анализиране су емисионе линије Ca, Sr и Mg (390–410 nm, 420–480 nm и 516–532 nm) (фактор спектралне корелације је био већи од 98%), чије су карактеристике биле значајно условљене индивидуалним метаболизмом. Резултати су јасно показали да релативан однос елемената варира између костију истог типа али различитих јединки као и у различитим костима једне исте јединке. То је потврдило могућност примене LIBS технике у анализи комплексног матрикса костију са великом прецизношћу [64].

Напредак у развоју техника вибрационе спектроскопије довео је до нових увида у молекулски састав и структуру биолошких ткива. Кверидо (*Querido*) и сарадници су у својим радовима разматрали уобичајене модалитете и технике вибрационе спектроскопије који представљају кључне примере који илуструју како се оне примењује за процену квалитета везивног ткива [57,66]. Описана је примена FTIR и раманске спектроскопије у анализи својстава хрскавице и костију. Представљене су предности и ограничења сваког приступа а посебно предности комбинације спектрометара са микроскопом (тзв. хиперспектрално снимање) и сонди са оптичким влакнима у примени у биомедицинске сврхе. Показано је да се ови модалитети могу користити практично за било коју врсту узорка, *ex vivo*, *in situ* или *in vivo*. Истакнута је неупоредива предност техника вибрационе спектроскопије као недеструктивних у анализи како екстрацелуларног матрикса тако и свих параметара повезаних са нормалним развојем, старењем или патолошким стањима ткива.

Велрај (*Velraj*) и сарадници у свом раду описују промене у саставу археолошког узорка кости из државе Керала, Индија, коришћењем FTIR методе [67]. Деконволуцијом вибрационих спектра у области која је карактеристична за вибрације фосфатне групе хидроксиапатита ($1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) добијено је шест компоненти (960, 1010, 1020, 1030, 1110 и 1120 cm^{-1}) које су указале на постојање фосфата у различитим хемијским окружењима. Такође су врло детаљно анализиране и вибрационе траке које се асигнирају вибрацијама колагенских влакана и карбоната у супституисаним матрицама хидроксиапатита. Из анализираних спектра израчунати су квантитативни параметри квалитета кости: индекс минерализације, индекс кристаличности, степен зрелости кости и однос органске материје и фосфата (C/P).

Мамеде (*Mamede*) и сарадници су испитивали биолошки профил из спаљених људских скелетних остатака применом FTIR и раманске спектроскопије и методе дифракције рендгенских зрака [68]. Истраживање је извршено са циљем процене пола и старости у тренутку смрти, узраста и порекла као препознавања *peri mortem* траума и њиховог разликовања од прелома услед пожара. Констатовано је да су вредности односа органске материје и фосфата (C/P) (који се обично израчунава из односа интензитета трака на 1415 и 1035 cm^{-1} ($\text{Abs}(1415\text{ cm}^{-1})/\text{Abs}(1035\text{ cm}^{-1})$)) и ВРИ (Type B carbonate) (који се обично израчунава из односа интензитета трака на 1415 и 603 cm^{-1} , $\text{Abs}(1415\text{ cm}^{-1})/\text{Abs}(603\text{ cm}^{-1})$)) параметара обрнуто пропорционални индексу кристаличности (CI, *Cristallinity Index*). Констатовано је да са порастом вредности C/P и ВРИ расте и количина карбоната типа Бе. Што се тиче CI, констатовано је да ниже вредности одговарају мањим кристалима биоапатита са већим напрезањем решетке те се због тога очекивало да пораст температуре доведе до смањења вредности C/P и ВРИ из разлога губитка карбоната (преко CO_2). У раду се наводе и резултати Томсона (*Thomson*) и сарадника по којима се вредности C/P и ВРИ значајно мењају на температурама горења у интервалу од 500 и 700°C [69]. Такође је констатовано да се добијени резултати на говеђој кости могу разликовати у односу на резултате добијене за спаљене људске кости. У истом раду се цитирају и резултати Сноека (*Snoeck*) и сарадника који су одређивали ВРИ експериментално загреваних животињских костију и археолошких узорака кремираних људских костију [70]. Резултати су показали да угљенисане кости имају већи ВРИ индекс у односу на калцификовану кост која је била изложена високим температурама. Такође, поређењем два типа узорака констатовано је да експериментално загреване животињске кости, загреване под контролисаним условима,

садрже мању концентрацију карбоната типа Бе а већу концентрацију карбоната типа А што није до краја објашњено. Такође, по резултатима Сноека и сарадника однос ОН/Р (који се израчунава из односа интензитета трака на 630 и 603 cm^{-1} , $\text{Abs}(630\text{ cm}^{-1})/\text{Abs}(603\text{ cm}^{-1})$), који представља количину ОН група унутар коштане матрице, се процесом загревања мењао. Претостављено је да се том приликом карбонат типа А губи и вероватно замењују ОН групама, што се у спектрима снимљеним на температурама око 700°C , манифестује кроз појаву трака на 630 и 3572 cm^{-1} , које представљају веома важне индикаторе термичког третирања костију.

Дал Сасо (*Dal Sasso*) и сарадници су одређивали кристаличност биоопатита који је од великог практичног значаја за физичкохемијска и микроструктурна својства као и интегритет коштаног материјала [71]. У раду је примењен нови начин израчунавања и употребе ширине вибрационе траке за процену степена кристаличности костију. Резултати добијени применом FTIR спектроскопије упоређени су са резултатима добијеним дифракцијом рендгенских зрака. Ширина вибрационе траке на 604 cm^{-1} је искоришћена за процену просечне величине кристалита и садржаја структурног карбоната у биоопатитима, чиме је дата универзална калибрациона крива за практичне употребе.

Фигуеиредо (*Figueiredo*) и сарадници су испитивали утицај хлороводоничне киселине, различитих концентрација ($0,6$; $1,2$ и $2,4\text{ M}$) и времена деловања, на процес деминерализације коштане матрице кортикалне кости [72]. Садржај калцијума је одређен применом атомске апсорпционе спектроскопије што је даље омогућило добијање кинетичког профила узорка током деминерализације. Промене у фази и хемијском саставу кости праћене су дифракцијом рендгенских зрака и FTIR спектроскопијом, промене на површини кости електронском микроскопијом а порозност костију и расподела величине пора живином порозиметријом. Констатовано је да повећање концентрације киселине доводи до повећања степена деминерализације, али не на униформан начин. Такође је констатовано да деловањем хлороводоничне киселине долази до значајног повећања порозности кости, посебно код узорка који је био изложен највећој концентрацији киселине.

Екстракција колагена деловањем сирћетне киселине испитана је у раду Капутоа (*Caputo*) и сарадника [73]. Описана је тзв. „мека“ недеструктивна метода екстракције колагена из археолошких узорака костију. Резултати су показали да метода омогућава добијање колагена у високом приносу. Такође је показано да резултати биохемијске карактеризације екстракта колагена применом денатуришуће електрофорезе и Western blot - а могу бити индикатор квалитета коштаног колагена у археолошким узорцима.

Миесковска (*Mieczkowska*) и сарадници у свом раду су описали ензимско умрежавање коштаног колагена мишева применом LC-MS и FTIR микроспектроскопије. Резултати испитивања су потврдили позитивну корелацију интензитета трака на ~ 1660 , ~ 1680 и $\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ и концентрације пиридинолина (PID), деоксипиридинолина (DPD) или незрелог дихидроксилизинонорлеуцина (DHLNL)/хидроксилизинонорлеуцина (HLNL) [74].

Пашалис (*Paschalis*) и аутори су користили FTIR спектроскопију за карактеризацију умрежавања серије колагенских пептида, коже, дентина и предентина [75]. Садржај деоксипиридинолина (DPD) корелиран је са интензитетом траке на $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ док је садржај PID колагенских унакрсних веза корелиран са интензитетом траке на $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$.

Коуркоумелис (*Kourkoumelis*) и сарадници су у свом ревијском раду дали преглед литературе која се бави применом FTIR спектроскопије у дијагностици болести коштаног ткива [55,76]. Истакли су могућности методе за праћење промена у хемијском саставу кости и указали на параметре који се добијају из спектроскопских података а директно су у вези са квалитетом кости, чврстином и еластичношћу.

4. ЦИЉЕВИ РАДА

У оквиру предложене теме постављена су два основна циља, то су: а) оптимизација LIBS технике за елементну анализу главних компонената и трагова у узорку хемијски третиране и нетретиране свињске рамене кости, применом ласерских извора зрачења различитих карактеристика, ТЕА CO₂ (*Transversely Excited Atmospheric pressure carbon dioxide*) и Nd:YAG (*Neodymium-doped Yttrium Aluminum Garnet*; Nd:Y₃Al₅O₁₂) ласера и б) испитивање утицаја киселина на хемијски састав свињске кости.

Ближе одреднице првог циља подразумевале су:

- а) дијагностику плазме оптичком емисионом спектроскопијом која је укључила одређивање главних карактеристика плазме као што су температура и концентрација електрона. Температура плазме је била одређена мерењем апсолутног/релативног интензитета спектралне емисије, а концентрација електрона из Штарковог профила спектралних линија. Као извор зрачења коришћени су ТЕА CO₂ ласер, развијен у Институту за нуклеарне науке Винча, и комерцијални Nd-YAG ласер. Добијени параметри плазме су корелирани са тврдоћом костију, посебно за оне изложене дејству киселина;
- б) профилометријску анализу свињске кости са циљем процене степена деструктивности методе и достизања довољног степена резолуција за мапирање дубинског и површинског елементног састава свињске кости. Профилометријска мерења омогућила су добијања димензија и дубина аблацијских кратера повезаних са интеракцијом ласерског зрачења, емитованог од стране ТЕА CO₂ ласера, са узорком свињске кости;
- в) квантитативну анализу елементног састава нетретиране кости применом ICP-OES и FAAS (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*) техника, за потребе процене перформанси LIBS технике за анализу костију.

Ближе одреднице другог циља биле су:

- а) примена метода вибрационе молекулске спектроскопије, ATR-FTIR и раманске спектроскопије, у анализи спектралних области у којима се јављају вибрационе траке које се асигнирају вибрацијама функционалних група карактеристичним за органске и неорганске конституенте кости, протеинску матрицу и матрицу хидроксиапатита. Хемијски третирана/нетретирана кост је била испитана и LIBS техником. Циљ ових испитивања је био одређивање: степена деминерализације кости под утицајем деловањем киселина различитих јачина (различитих рКа) (сумпорне, хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне), концентрација (0,01; 0,1; и 1 М), и времена деловања (1, 7 и 14 дана), карактеристичних параметара квалитета кости (однос органске и неорганске фазе (MM, *Mineral-to-Matrix ratio*), индекс кристалинжности (CI, *crystallinity index*), садржај карбоната, полуинтензитетска ширина трака (FWHM, *Full Widths at Half Maximum*), индекс зрелости колагена (СММ, *Collagen Maturity Marker*)) као и корелација резултата добијених применом различитих метода и техника.
- б) корелација квантитативних параметара квалитета кости (односа органске и неорганске матрице, индекса кристалинжности, полуинтензитетске ширине линије, односа садржаја карбоната и фосфата) добијених различитим вибрационим методама (ATR-FTIR и RS) и LIBS техником;
- в) квантитативна анализа елементног састава хемијски нетретиране/третиране кости и раствора киселина у којима су кости стајале, применом аргоном стабилизованог лука, атомске апсорпционе спектрометрије и ICP-OES технике;

2) анализа површне хемијски третиране кости, применом SEM-EDX методе са циљем добијања хемијског састава површине кости и слике површине узорка високе резолуције.

5. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

5.1 Хемикалије

За праћење утицаја киселина на свињску кост коришћене су следеће киселине р.а. степена чистоће: хлороводонична (Merck, Germany), флуороводонична (Merck, Germany), сирћетна (Merck, Germany) и сумпрна киселина (Merck, Germany). Азотна киселина (р.а. Merck, Germany) коришћена је за разлагање кости и припрему за мерења елементног састава на ICP-OES -у.

За елементну анализу раствора преосталих после вађења кости (превасходно за анализу калцијума, фосфора и магнезијума) коришћени су стандардни раствори *Reagecon Calcium/Magnesium/Phosphorous Standards for Atomic Absorption (AAS)* (Reagecon Diagnostics Ltd., Clare, Ireland), 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1000 ppm) у 0,5 М азотној киселини.

5.2 Узорци кости

Свињска рамена кост је набављена у месарској радњи. Кост је прво одмашћена потапањем у 70%, v/v, етанол а потом детаљно испрана дестилованом водом. Узорак је чуван на 4°C. Пре потапања у испитиване растворе киселина, кост је исечена на делове приближно једнаке масе, око 5 g. Сваки узорак је стављен у приближно 50 cm^3 раствора киселина и остављен одређен број дана (1, 7, 14).

5.3 LIBS спектри

LIBS спектри су снимани коришћењем два ласера, TEA-CO₂ ласера развијеним у Институту за нуклеарне науке Винча [77] и комерцијалном ласеру Nd:YAG ласеру (модел LK115, Solar LS, Minsk, Belarus) са ваздушним хлађењем

Дијагностика плазме

Дијагностика плазме урађена је применом TEA-CO₂ ласера. Радне таласне дужине ласера биле су 10,5709 и 10,5909 μm , а брзина понављања импулса до 2 Hz са вишемодним профилем снопа. Иницијални ласерски пулс носио је приближно 35% укупне енергије импулса са FWHM око 100 ns. Опадајући реп пулса, који је пратио иницијални пулс, трајао је око 2 μs . Почетни део импулса је обезбедио довољну густину енергије за формирање плазме, а време кашњења је додатно загревало плазму и продужило трајање спектралне емисије омогућавајући плазми да заштити узорак од додатне аблације. Оптимизовани експериментални параметри су били: енергија ласерског импулса је била 155 mJ при чему је ласерски зрак фокусиран на површину узорка. За фокусирање зрака коришћено је ZnSe сочиво са жижном даљином од 125 mm. Димензија тачке фокусираног снопа на мети била је 1,1×0,7 mm. Ласерски зрак је фокусиран тако да фокус буде 3 mm иза површине мете, што је била оптимална позиција фокуса за добијање спектра елементног састава узорка са повољним односом сигнала и позадине. Слика пресека плазме (лоцираног d=1 mm од површине мете) пројектована је на улазни разрез Carl Zeiss PGS2 спектрографа (Czerny-Turner оптичка конфигурација, жижна даљина од 2 m) коришћењем ахроматског кварцног сочива [78]. На овај начин је избегнуто регистровање интензивног континуалног зрачења из ране фазе еволуције ласером индуковане плазме. До тренутка када је фронт плазме достигао посматрану зону, плазма је била довољно охлађена тако да је интензитет позадине био смањен чиме се побољшавао однос сигнала и позадине. У експерименту је коришћена

спектрална решетка са 600 прореза/mm, са бљеском на 330 nm. U2C-16H11850 CCD камера је снимала спектре емисије плазме са побољшаном осетљивошћу у ултраљубичастој области која покрива спектрални опсег између 200–1100 nm (2048×64 чип; величина пиксела 14×14 μm). Камера је била активирана брзом фотодиодом, док је време експозиције подешавано на минималну вредност од 10 ms да би се смањили тамна струја и шум. Мета је била постављена на постоље које може да се транслира дуж X-Y-Z оса како би се осигурала интеракција сваког ласерског импулса са новом површином и узеле у обзир и могуће површинске нехомогености у смислу елементног састава. Свако мерење представљало је средњу вредност најмање десет узастопних добијених спектара. Спектри са значајним одступањима у интензитету су одбачени из разматрања. Спорадично одступање неких спектара било је узроковано електричним пражњењем између главних електрода TEA-CO₂ ласера (обично до 3% од укупног броја импулса).

Хемијски третирана кост

Хемијски третирана кост испитана је применом оба ласера. Радне таласне дужине TEA-CO₂ ласера биле су 10,5709 и 10,5909 μm, а брзина понављања импулса до 2 Hz, у вишемодном режиму. Почетни ласерски импулс је трајао око ~100 ns што је носило приближно 35% укупне енергије импулса. Почетни импулс је пратио опадајући реп који је трајао око ~ 2 μs. Оптимизовани параметри мерења су били следећи: енергија ласерског импулса била је 155 mJ, ласерски сноп је био фокусиран на површину узорка при чему је растојање плазме која је фокусирана на спектрограф била 1 mm. ZnSe сочиво је коришћено за фокусирање ласерског зрака. Слика плазме је пројектована на улазни прорез Carl Zeiss PGS2 спектрографа помоћу ахроматског кварцног сочива. U2C-16H11850 CCD камера са побољшаном осетљивошћу у ултраљубичастој спектралној области је коришћена за снимање спектара емисије плазме. Да би се смањили тамна струја и шум, CCD камера је активирана при минималном времену експозиције од 10 ms.

Nd:YAG ласер је радио на таласној дужини од 1064 nm (први хармоник). Енергија ласерског импулса износила је 90 mJ, фреквенција 1 Hz, а трајање импулса 7 ns. Ласерски зрак је фокусиран на мету помоћу стакленог сочива жижне даљине од 80 mm фокусираног на површину мете, дајући тачку пречника приближно 140 μm. Слика ласерски индиковане плазме је пројектована на улазни прорез спектрографа коришћењем ахроматског кварцног сочива (UV-ахромат) жижне даљине 273 mm, у односу 1:1. Аквизиција спектралне емисије обављена је са дела плазме који је био паралелан са метом и 1 mm удаљен од ње. Коришћен је Carl Zeiss PGS2 спектрограф са равном дифракционом решетком (сјај на 280 nm, 650 уреза по mm) опремљен U2C-16H11850 (SOL инструмент) CCD камером, са побољшаном осетљивошћу у ултраљубичастој области (2048×64 чип; величина пиксела 14×14 μm). LIBS спектри су снимљени са 15 тачака на површини кости. Са сваке тачке је снимљено по пет спектара. По један ласерски пулс слат је на сваку одабрану тачку узорка да би се минимизирао степен аблације и да би се добила најбоља могућа слика састава површине кости. Резултати за сваки анализирани елемент су представљени као средња вредност свих мерења да би се избегле варијације састава унутар узорка и добила свеобухватна анализа.

5.4 ICP OES мерења

За прелиминарну квантитативну анализу узорка коришћена је ICP-OES техника (*iCAP 6000, Thermo Scientific*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Узорак кости је здробљен и разграђен микроталасном дигестијом. Измерено је око 0,25 mg узорка и стављено у кивету уз додаток 8 cm³ (1:1) HNO₃. Температура узорка је подигнута са собне температуре на температуру од 200°C током 15 минута. Узорак је држан на константној температури 20 минута, а затим охлађен спонтано до собне температуре. Након хлађења

узорак је разблажен до 25 cm^3 дејонизованом водом. За одређивање фосфора, магнезијума и калцијума раствор је додатно разблажен 1000 пута јер су интензитети спектралних линија далеко премашивали интензитете стандарда од 10 ppm.

5.5 Профилометријска анализа

Zygo NewView 7100 оптички профилометар је коришћен за бесконтактно, тродимензионално скенирање, мерење дубине ласерске аблације помоћу интерферометрије беле светлости, и одређивање профила кратера. Опсег вертикалног скенирања био је $150 \text{ }\mu\text{m}$, а резолуција висине $0,1 \text{ nm}$. Видно поље се кретало од $0,07$ до $9,3 \text{ mm}$ у зависности од интерферометријског објектива ($10\times$ до $100\times$). Оптичка резолуција је варирала од $0,36$ до $9,5 \text{ }\mu\text{m}$. За аквизицију и анализу података коришћен је софтвер *ZYGO MetroPro*. Контактни оловни профилометар (*Talysurf Series2*, Taylor-Hobson Ltd, Leicester, United Kingdom.) је коришћен за карактеризацију површинских параметара као што су дубина ласерске аблације, дводимензионалних профила формираних кратера и тродимензионалних топографских мапа површине. Резолуција је била $0,25 \text{ }\mu\text{m}$ у смеру y -осе, $1 \text{ }\mu\text{m}$ у x -смеру и 3 nm у z -смеру. За аквизицију и анализу података коришћен је софтвер *Digisurf* (Digital Surf, Besançon, France).

5.6 AAS спектри

Атомски апсорпциони спектрометар *Carl Zeiss Jena EA 30* (Jena, Germany) коришћен је за квантитативну елементну анализу раствора киселина преосталих након уклањања кости.

5.7 FTIR спектри

FT-IR спектри свињске рамене кости третиране различитим киселинама снимани су у средњој инфрацрвеној области спектра, од 4000 - 525 cm^{-1} , коришћењем FT-IR спектрометра (*Nicolet iS 20 FT-IR*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) у ATR режиму са монолитним кристалом дијаманта. Резолуција је била 4 cm^{-1} а број скенова 16. Узорци кости су били спрашени да би се побољшао контакт са кристалом и његова покривеност. Узорци су снимани више пута, анализирани су усредњени спектри. Интервали спектра карактеристични за вибрације специфичних функционалних група, као што су PO_4^{3-} , CO_3^{2-} и HPO_4^{2-} , анализирани су деконволуцијом спектра коришћењем PeakFit програма 4.12 и Војтовог (*Voigt*) профила спектралне линије. Деконволуција је извршена у областима спектра од 1700 - 1600 cm^{-1} (амид I трака), 1200 - 900 cm^{-1} ($\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$), 900 - 850 cm^{-1} (карбонат) и 650 - 500 cm^{-1} ($\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$). Положај трака у спектрима деконволуције одређен је на основу другог извода спектра. Површине подтрака у спектрима деконволуције коришћене су као индикација квантитативних промена у саставу кости након деловања киселина. Референтни спектри кости су снимљени у дестилованој води (исти период потапања у води као и у киселинама).

5.8 Рамански спектри

Рамански спектри прашкастих узорака кости снимани су на раманском спектрометру са микроскопом (*DXR Raman microscope*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Време експозиције је било 10 s а број експозиција 10. Спектри су снимани у области од 3500 - 50 cm^{-1} коришћењем ласера таласне дужине од 532 nm и снаге од 10 mV . Дисперзиони

елемент је био решетка са 900 разреза/mm, отвор спектрографа је био 50 μm . Узорци су снимани више пута. Анализирани су усредњени спектри узорака.

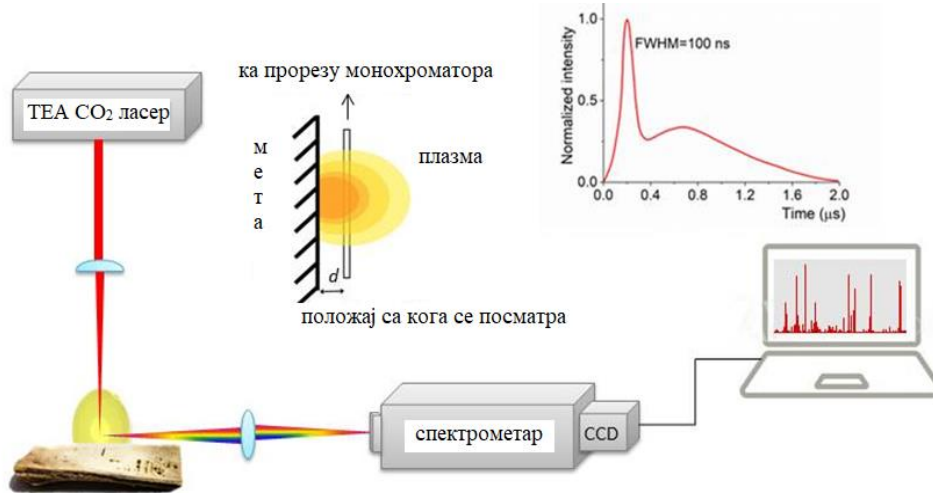
5.9 SEM-EDX анализа

Површинска морфологија узорака спрашене рамене свињске кости испитана је применом PhenomProX скенирајућег електронског микроскопа (*Phenom, The Netherlands*). EDX анализа је урађена коришћењем напона убрзања од 15 kV и при малом увећању да би се правилно одредио хемијски састав третиране кости. На узорке није наносен проводни слој, а за све експерименте је коришћен холдер за смањење наелектрисања.

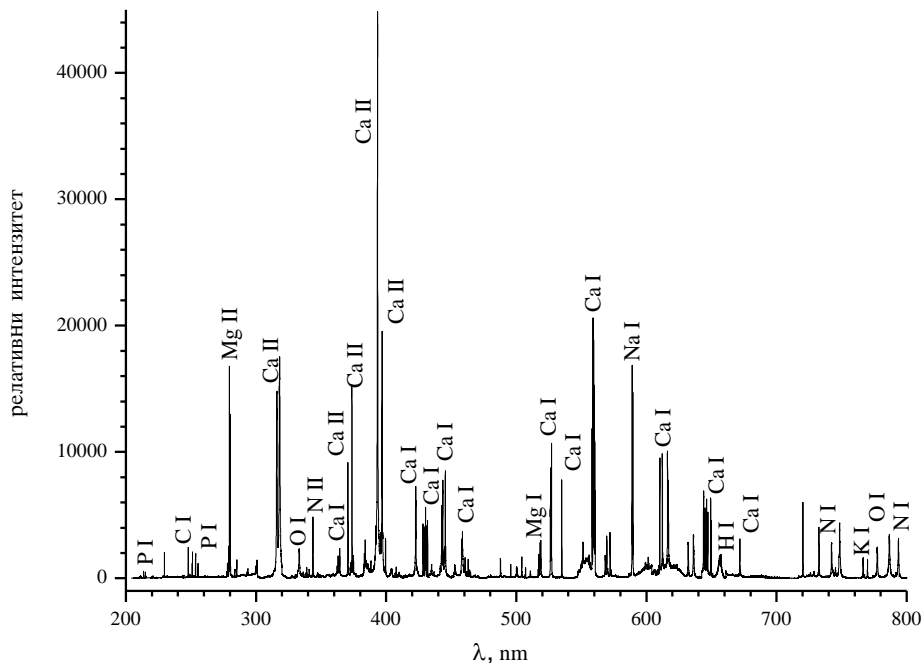
6. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

6.1 Анализа LIBS спектра нетретиране кости

На слици 18 приказана је експериментална поставка ЛИБС-а коришћена у дијагностици плазме у овом раду а на слици 19 цео LIBS спектар свињске рамене кости.

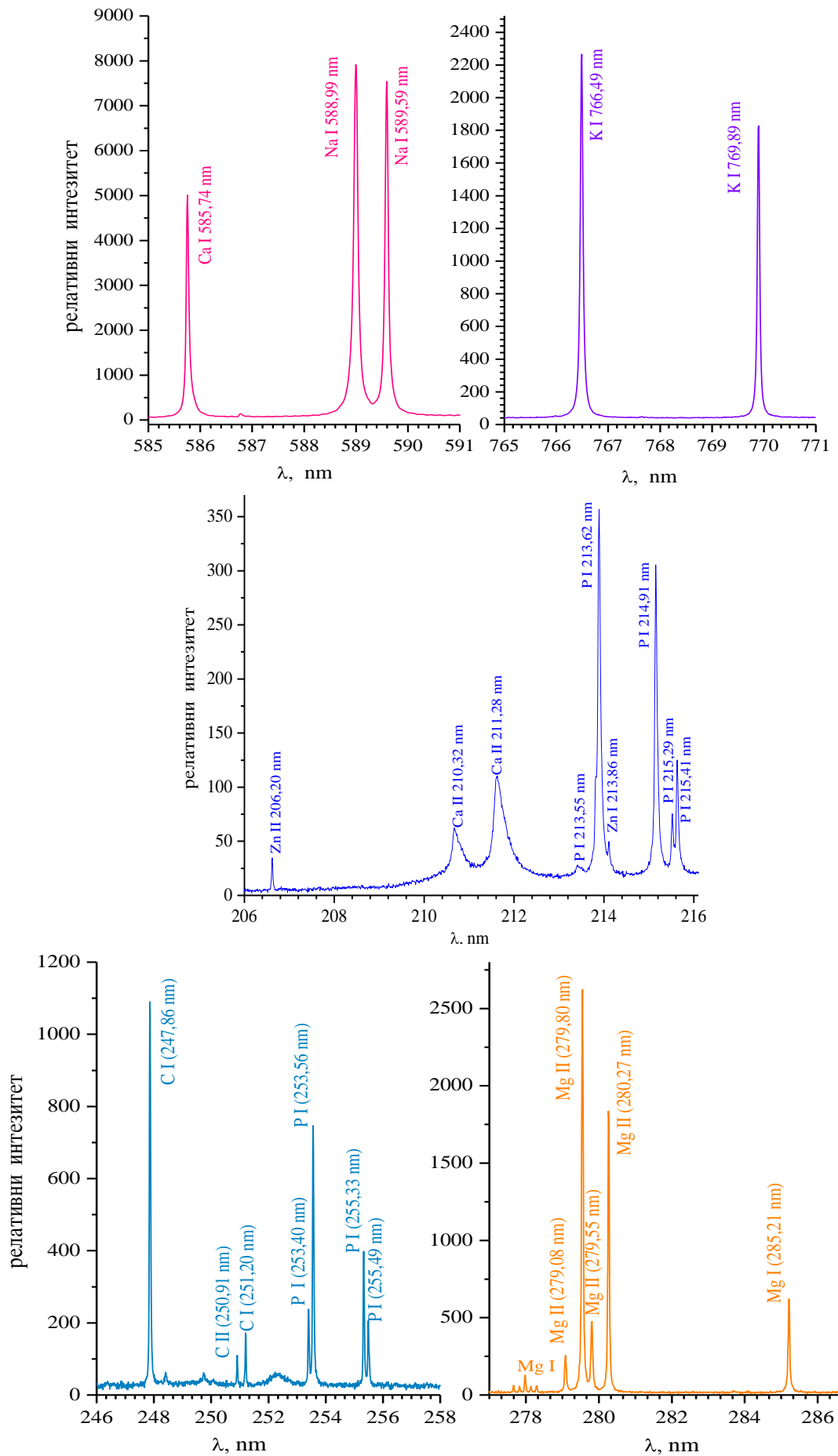


Слика 18 Шематски приказ експерименталне поставке LIBS-а. Временски профил TEA CO₂ ласерског пулса је приказан на врху



Слика 19 LIBS спектар узорка кости рамена свиње у области 200-800 nm

Добијени LIBS спектри свињске кости су претежно имали оштре интензивне линије атома и једноструко јонизованих јона, као што се види на слици 20. Пратећи типичан хемијски састав костију, у спектру доминирају линије Ca и P, али постоје и линије других елемената присутних у мањим концентрацијама, као што су Mg, C, H, O, Na, Zn и K. Линије H, O, као и линије N (из ваздуха), су знатно шире од осталих линија, пратећи њихово изражено Штарково ширење и чињеницу да се, због своје високе енергије јонизације, емитују из много топлијих зона плазме у односу на спектралне линије метала.



Слика 20 Делови LIBS спектра узорка кости рамена свиње. Енергија ласера 155 mJ , емисија снимљена из пресека плазма 1 mm изнад површине мете

Табела 2 Резултати ICP анализе свињске рамене кости

Елемент	Концентрација (%)	Елемент	Концентрација (ppm)
P	12,8	Zn	127
Ca	12,4	Al	214
Na	0,43	Sr	37,5
Mg	0,34	Fe	35,5
K	0,12		

Интензивне линије атома и појединачних јонизованих јона искоришћене су за праћење односа Mg/Ca, Ca/P и C/P у узорцима кости. Анализирани су интензитети специфичних атомских и јонских линија (C I линија на 247,86 nm; Na I линија на 589,00 nm; K I линија на 766,49 nm; Zn I линија на 206,20 nm и Mg II линије на 280,271 nm) и интензитет позадине око линија са највећом вредношћу границе детекција (LOD, *Limit of Detection*). Вредности границе детекције су израчунате помоћу једначине $LOD = (3 \times c) / SNR$, где је c позната концентрација анализата добијена из ICP анализе (Табела 1), а SNR је однос сигнал-шум израчунат из односа интензитета линије и стандардне девијације интензитета емисије позадинског континуума у областима које су суседне емисионој линији. LOD вредности за Na, K, Mg и Zn су процењене на 11; 1,6; 16 и 12 ppm, редом. LOD вредности за Na, K и Mg су процењене из интензитета њихових најинтензивнијих линија, које у спектру костију показују очигледну самоапсорпцију, тако се ове вредности могу донекле сматрати прецењеним. Под претпоставком да типична концентрација угљеника у кости износи око 5% (углавном у облику CaCO₃), LOD вредност за угљеник је процењена на 0,07%. Хемијски састав испитиваног коштаног узорка је такав да садржи мали број елемената у детектабилној количини. Релативно ниска граница детекције процењена за Mg, Zn, Na и K указује да се већина металних елемената може открити у костима са већим садржајем минерала.

6.2 Дијагностика плазме

6.2.1 Одређивање густине електрона

Директна зависност Штарковог ширења од концентрације електрона и јона омогућила је одређивање густине броја електрона (N_e) мерењем емисионих (или апсорпционих) профила спектралних линија. Најважнији експериментални параметар у одређивању N_e на основу Штарковог ефекта је добра спектрална резолуција инструмента, довољно раздвајање између линија и интензитет линија [18,19]. Ово такође укључује познавање Штарковог коефицијента ширења, рад са оптички танким линијама довољног интензитета и осетљивост на Штарков ефекат. Оно што је такође јако важно јесте, посебно у временски интегрисаним мерењима, одвајање Штарковог ширења од других ефеката ширења спектралних линија пошто су експериментални профили конволуција профила добијених у различитим условима плазме, односно у различитим фазама еволуције плазме [79, 80].

Штаркова ширина C I 247, 86 nm линије из другог спектралног реда искоришћена је за одређивање густине броја електрона, N_e . Коришћена је ешелетна дифракциона решетка на дисперзији од 0,35 nm mm⁻¹. Експериментални спектар је фитован Војтовим профилем коришћењем фиксне гаусовске ширине на половини висине, FWHM. Претпостављено је да је лоренцовска компонента последица Штарковог ширења. Војтова, Гаусова и Доплерова ширина линије дата је једначином 19 [81]:

$$w_V = 0,5346 \times w_L + \sqrt{0,2169 \times w_L^2 + w_G^2}$$

$$w_G = \sqrt{w_D^2 + w_i^2}$$
(19)

где су where w_V , w_L , w_G , w_D , и w_i Војтова, Гаусова, Доплерова и инструментална ширина, респективно.

Гаусова компонента Војтовог профила узета је као збир Доплеровог и инструменталног ширења. За одређивање инструменталног профила (0,0123 nm; ширина улазног прореза од 20 μm) коришћен је фитован профил линије Hg I на 253,65 nm, која се емитује из живине лампе ниског притиска. Доплерово ширење линије није се могло занемарити због високе температуре ласерски индуковане плазме и мале масе угљеника као емитера. Доплерова ширина је процењена помоћу једначине 20:

$$\Delta\lambda_D = 7.16 \times 10^{-7} \lambda_0 \sqrt{T/M}$$
(20)

где је $\Delta\lambda_D$ FWHM Доплеровог профила, λ_0 таласна дужина спектралне линије у nm, T температура у Келвинима, а M је моларна маса у грамима по молу.

У температурском интервалу између 10 000 и 20 000 K добијена је вредност Доплерове ширине, $\Delta\lambda_D$, израчуната за линију C I 247,86 nm. Добијена вредност налазила се у интервалу од 0,005 nm до 0,007 nm, док је укупна гаусовска ширина била између 0,013 nm и 0,013 nm.

На слици 21 (горњи панел) приказан је снимљени експериментални профил спектралне линије C I 247,8 nm у другом спектралном реду, фитован Војтовим профилем са фиксном Гаусовом полуинтензитетском ширином од 0,014 nm, добијеним *Single Peak Fit* поступком у *OriginLab* програму. На слици 21 је такође приказана и линија живе на 253,65 nm (померена ради јасноће).

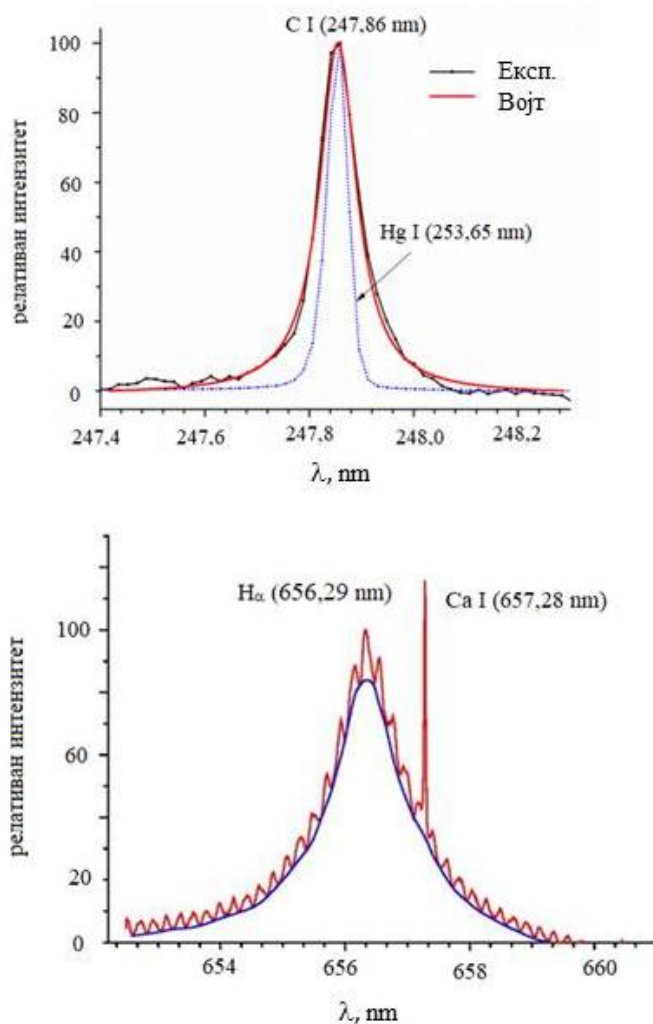
Деконволуисана Штаркова ширина од 0,024 nm је узета за процену густине електрона користећи апроксимативну формулу:

$$N_e [cm^3] = \frac{\Delta\lambda}{2w} \times 10^{16}$$
(21)

где је $\Delta\lambda$ Штаркова ширина (FWHM у nm), а w је теоријски параметар Штарковог ширења преузет из литературе [82].

За линију угљеника 247,86 nm, теоријски параметар Штарковог ширења на 20 000 K износи $w = 0,417 \times 10^{-3}$ nm. Израчуната густина електрона, N_e , је $2,9 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ за ласерски зрак фокусиран 3 mm иза мете. Овакав положај фокуса је био оптималан за добијање спектра узорка са повољним односом сигнала и позадине. Густина електрона је такође израчуната и из Штаркове ширине H_α спектралне линије (слика 21, десни панел). Најизраженији линеарни Штарков ефекат се јавља на спектралним линијама водоника. Треба нагласити да се све линије водоника (H_α - H_δ) могу користити за дијагностику плазме. Иако H_α линија има највећи интензитет, на њу највише утиче динамика јона тако да је претпостављено да је нека молекулска трака из првог или другог спектралног реда била суперпонирана на H_α линију. За реконструкцију спектра саме H_α линије коришћена је груба процена и на основу ширине таквог профила одређена је концентрација електрона. Констатовано је да утицај суперпонираних тракастих линија на грешку одређивања концентрације електрона није био велики. Штаркова ширина (w_S) H_α линије, за коју је било могуће апроксимирати $w_S = w_L$ и занемарити друге физичке процесе који могу допринети Лоренцовом профили, је добијена из

деконволутивног профила линије Војтовог типа (w_V). Густина броја електрона је израчуната из једначине 22 [83, 84]:



Слика 21 Експериментални профил C I 247,86 nm фитован Војтовим профилем. Живина линија на 253,652 nm, добијена под истим експерименталним условима, приказана је ради поређење (горњи панел) са експерименталним профилем H_α линије (доњи панел)

$$N_e [cm^{-3}] = 10^{17} \times \left(\frac{w_s [nm]}{1,098} \right)^{1.47135} \quad (22)$$

где је w_s пуна ширина на половини површине (FWHM) спектралне H_α линије.

Густина броја електрона израчуната на основу Штарковог профила H_α линије је износила $1,9 \times 10^{17} cm^{-3}$.

6.2.2 Одређивање температуре плазме

Температуре плазме је одређена коришћењем Доплеровог ширење и методе мерења апсолутног/релативног интензитета спектралне емисије [85-87].

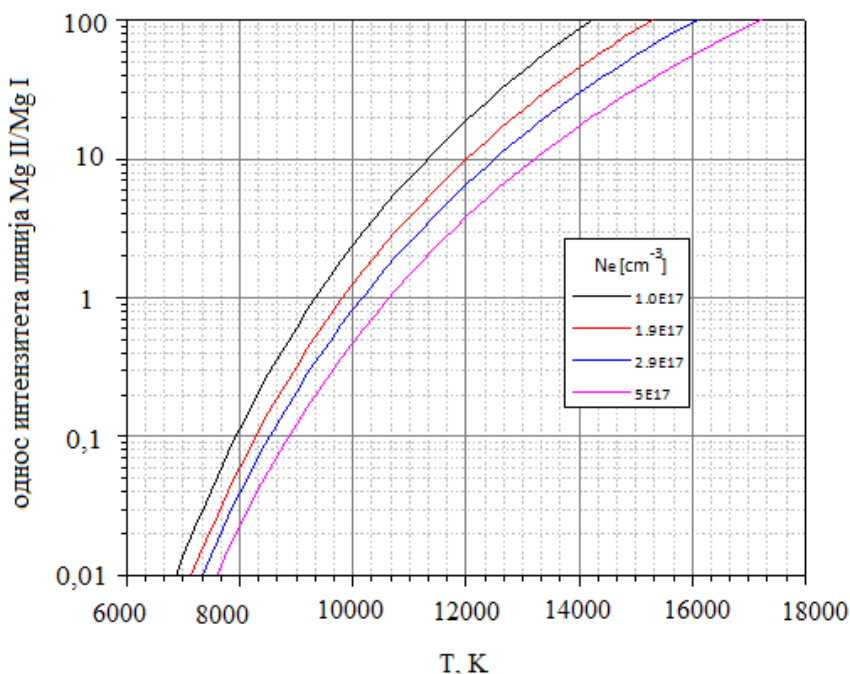
Однос интензитета јонске и атомске спектралне линије (истог елемента) је погодан за одређивање температуре јонизације ако је густина броја електрона унапред одређена. Израз за однос интегралних интензитета јонске (+) и атомске линије (а) дат је једначином 23:

$$I^+ / I^a = 4,83 \times 10^{15} \frac{g^+ A^+ \lambda^a}{g^a A^a \lambda^+} \frac{\sqrt{T^3}}{N_e} e^{-\frac{11605(E_{exc}^+ + E_{ion} - E_{exc}^a - \Delta E_{ion})}{T}} \quad (23)$$

где су g^+ и g^a одговарајуће статистичке тежине јона и атома, A^+ и A^a су вероватноће прелаза, N_e густина броја електрона у cm^{-3} , T је температура у К, E_{exc}^+ и E_{exc}^a енергије побуђивања изражене у eV, E_{ion} и ΔE_{ion} енергија јонизације и редукована вредност енергија јонизације услед Дебајевог заклањања, изражени у eV.

Температура јонизације израчуната је коришћењем Mg линија у спектралном подручју око 280 nm [88, 89]. Због довољно високог садржаја магнезијума у анализираном узорку кости, најинтензивније јонске и атомске линије показивале су значајну самоапсорпцију. Због тога су за одређивање температуре изабране слабије, нерезонантне линије: Mg I 278,30 nm и Mg II 279,08 nm. Однос интензитета линија Mg 279,08 nm и 279,80 nm показао је добро слагање са односом вредности g_A , што потврђује претпоставку да је у овом случају самоапсорпција била занемарљива. Тачност одређивања вероватноће прелаза за линије Mg I 278,30 nm и Mg II 279,08 nm је боља од 7 %, тако да тачност мерења температуре није била ограничена значајно [90]. Заменом одговарајућих константи за линије Mg I 278,30 nm и Mg II 279,08 nm у једначину 23, добија се следећи израз:

$$I^+ / I^a = 1,20 \times 10^{16} \frac{\sqrt{T^3}}{N_e} e^{-\frac{11605(9,334 - \Delta E_{ion})}{T}} \quad (24)$$



Слика 22 Температурска зависност односа јонских (279,08 nm) и атомских (278,30 nm) линија магнезијума за различите вредности електронске густине

Табела 3 Релевантни подаци за Mg спектралне линије које се користе за дијагностику плазме. (Асс је тачност вредности вероватноће прелаза; A_{ki} је вредност вероватноће прелаза; g_k и E_k су статистичка тежина и енергија побуђеног стања, а E_i је енергија нижег стања)

λ , nm	$g_k A_{ki}$ (s^{-1})	Асс.	E_i (eV)	E_k (eV)
Mg I 278,30	$6,42 \times 10^8$	< 7 %	2,717	7,170
Mg II 279,08	$1,60 \times 10^9$	< 3 %	4,422	8,864
Mg II 279,80	$2,87 \times 10^9$	< 3 %	4,434	8,864

Релевантни детаљи у вези са линијама које се користе за одређивање температуре и провере самоапсорпције дати су у табели 3. На слици 22 приказана је зависност односа интегралних интензитета јонских и атомских линија Mg, израчуната за неколико различитих вредности густине електрона које задовољавају релевантни интервал LIBS-а. Користећи концентрацију електрона од $1,9 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ израчуната је температура јонизације која је била у интервалу $T_{\text{ion}} = 11400\text{-}11800 \text{ K}$.

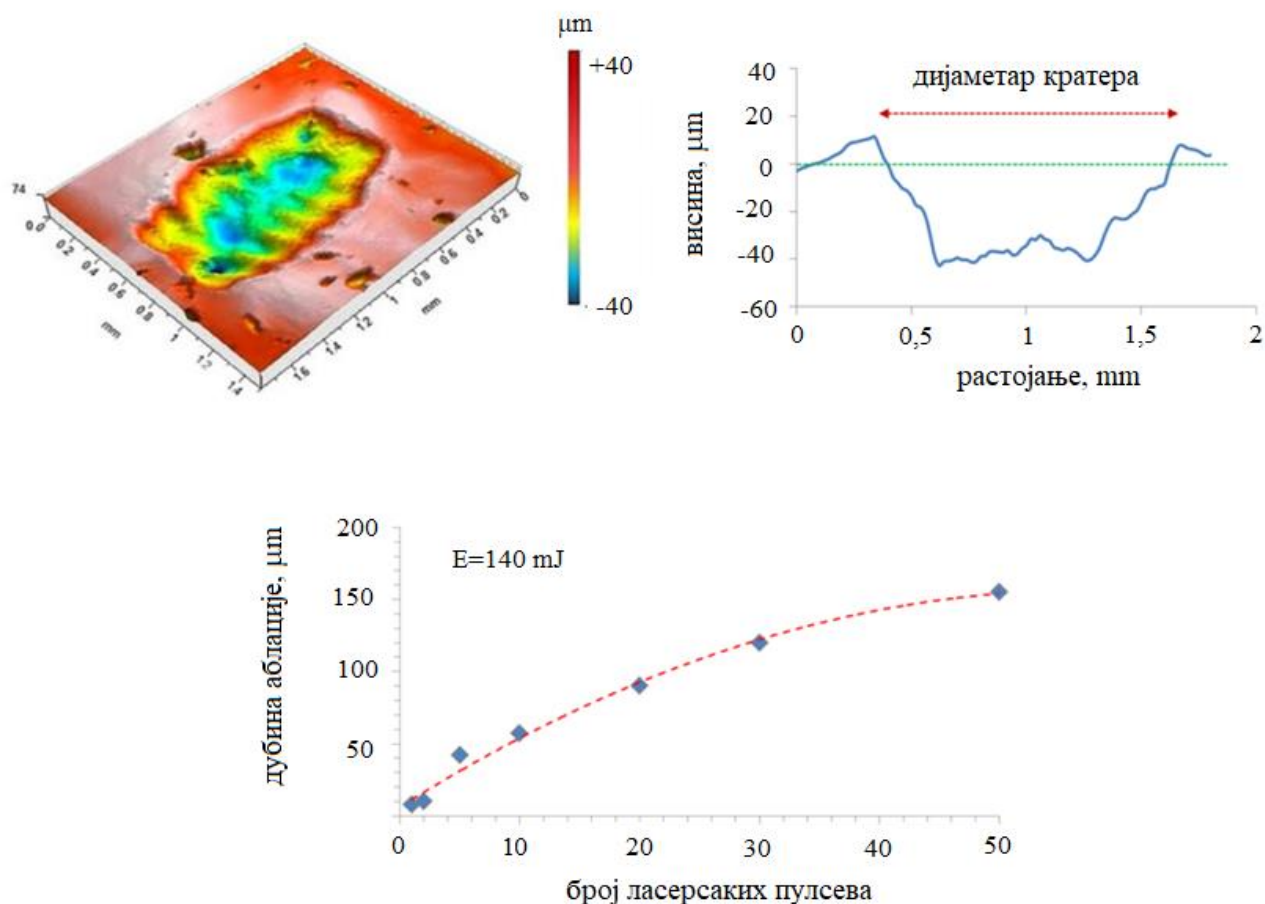
Из односа интензитета јонских и атомских линија угљеника, C II/C I на 250,91 nm и 247,86 nm, одређена је значајно виша температура јонизације (18 100 K). Детаљи у вези са одређивањем температуре коришћењем ових угљеничних линија дати су у референци Кузмановића и сарданика [91]. Може се констатовати да разлика у температурама јонизације потиче од разлика у енергијама јонизације угљеника и магнезијума, што има за последицу емитовања угљеника из топлијих зона плазме у односу на магнезијум.

6.3 Профилометријска анализа

Профилометријска анализа је примењена да би се добиле димензије и дубина аблацијских кратера повезаних са интеракцијом више импулса ТЕА-СО₂ ласерског зрачења са узорком свињске кости. Циљ је био да се процени деструктивност током LIBS анализе и да се процени максимална могућа резолуција за мапирање дубинског и површинског елементног састава (слика 23).

Енергија импулса коришћена за ова мерења варирала је између 100 mJ и 140 mJ. Димензија фокусираног зрака на површини узорка процењена је на око $1,1 \times 0,7 \text{ mm}$, што одговара примењеној (флуенс) густини енергије од $15,6 \text{ J cm}^{-2}$ до $18,2 \text{ J cm}^{-2}$. Расподела густине енергије на површини била је сложена пошто је ТЕА-СО₂ ласер радио у вишемодном режиму. Попречни пресек и 3D профил кратера који је настао на свињској раменој кости деловањем пет узастопних ласерских импулса помоћу ласерске енергије од 120 mJ приказани су на слици 23 (горњи панел). Слика 23, доњи панел, приказује измерене дубине аблације постигнуте различитим бројем упадних ласерских пулсева. Раст дубине аблације са повећаним бројем ласерских импулса који су погађали исту тачку на површини мете може се објаснити снижавањем прага аблације и бољом апсорпцијом услед акумулације топлоте. Истовремено, примењено је смањење брзине аблације масе у случају повећаног броја узастопних ласерских импулса. Ово би могло настати због губитака топлоте узрокованих интеракцијом аблиране паре са зидовима кратера.

Просечно повећање дубине кратера било је приближно 6 μm по импулсу. Добијена вредност указује да би примењена LIBS конфигурација могла бити одговарајућа за дубинско профилисање елементног састава кости. Међутим, боља резолуција дубине се може постићи контролом енергије ласерског импулса. Да би се смањиле стопе аблације и постигла боља резолуција, рад са нижим густинама енергије, тј. близу прага стварања плазме, могао би бити оптималан.



Слика 23 3D профил и попречни пресек кратера створеног на узорку свињске кости дејством 5 узастопних ласерских импулса коришћењем енергије ласера од 120 mJ (горњи панел) и дубина аблације у функцији броја примењених ласерских импулса (доњи панел)

Утицај повећаног броја узастопних ласерских импулса на услове екситације плазме праћен је мерењем односа интензитета атомских и јонских линија магнезијума, Mg II 280,271 nm и Mg I 285,213 nm, и његових атомских линија, Mg I 285,213 nm, и Mg I 277,983 nm, као индиректна мера концентрације електрона и температуре екситације. За дубину кратера до 50 μm, оба односа су остала непромењена у оквиру експерименталне грешке, што указује да се услови побуђивања у плазми нису значајно променили.

6.4 Анализа FTIR спектра кости: утицај хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселина

6.4.1 Анализа амид I домена

На сликама 24 и 25 приказани су инфрацрвени спектри кости држане у води и спектри кости у хлороводоничној, флуороводоничној и сирћетној киселини (0,1 и 1 M) са асигнацијом вибрационих трака. У табели 4 дат је приказ положаја и асигнације свих релевантних вибрационих трака у спектрима испитиваних киселина. На сликама 26 и 27 приказани су упоредо спектри кости у води и киселинама различитих концентрација у опсегу од 2000-400 cm⁻¹.

Табела 4 Положај и асигнација главних вибрационих трака у инфрацрвеним спектрима свињске кости држане у води и после третмана испитиваним киселинама

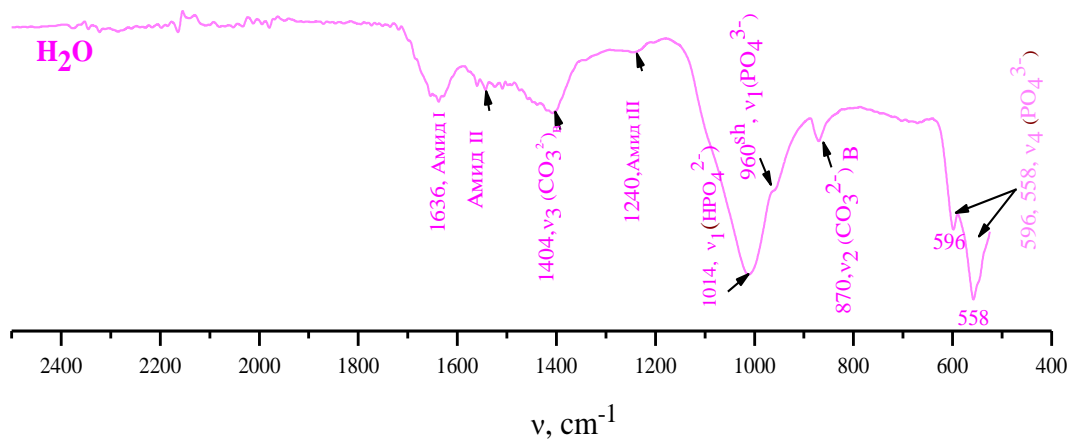
Асигнација трака	Положај трака (cm^{-1})			
	H_2O	HCl 0,1 М/1 М	HF 0,1 М/1 М	CH_3COOH 0,1 М/1 М
Амид I, β неорганизовани колаген		1641/-		-/1644
Амид I, β -плоче (β -sheet)	1636	-/1624	1638/1638	1639/-
Амид II		1540/1533	1538/1541	1544/1538
$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_{A+B}$		1452/1453	1450/1456	
$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_B$	1404	1415/1409	1409/	1408/1415
Амид III	1240	1241/1236	1237/1214	1239/1204
биолошки апатит са HPO_4^{2-}			-/1148	
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиометријски апатит са примесама HPO_4^{2-}				1116/-
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, стехиометријски апатит		1087 ^{sh} /-	1093 ^{sh} /-	
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-}) \text{ T}_2$ облик апатита		-/1078		
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-}) \text{ T}_2$ облик апатита			-/1063	-/1053
$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту			-/1028	
$\nu_3(\text{HO}_4^{2-})$ нестехиометријски апатит са примесама HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}	1014	1014/-	1018/	1008/-
$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту		-/989		-/986
$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$	960 ^{sh}	958 ^{sh} /-	960 ^{sh} /959	955 ^{sh} /-
$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})_B$	870	870/-	871/871	871/-
$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})_A$			-/877	
$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ (P-O асим. савијајућа)	596	599/-	600/604	599/602
$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ (P-O асим. савијајућа)	558	558/-	559/-	558/575

*sh (*shoulder*), раме, инфлексција

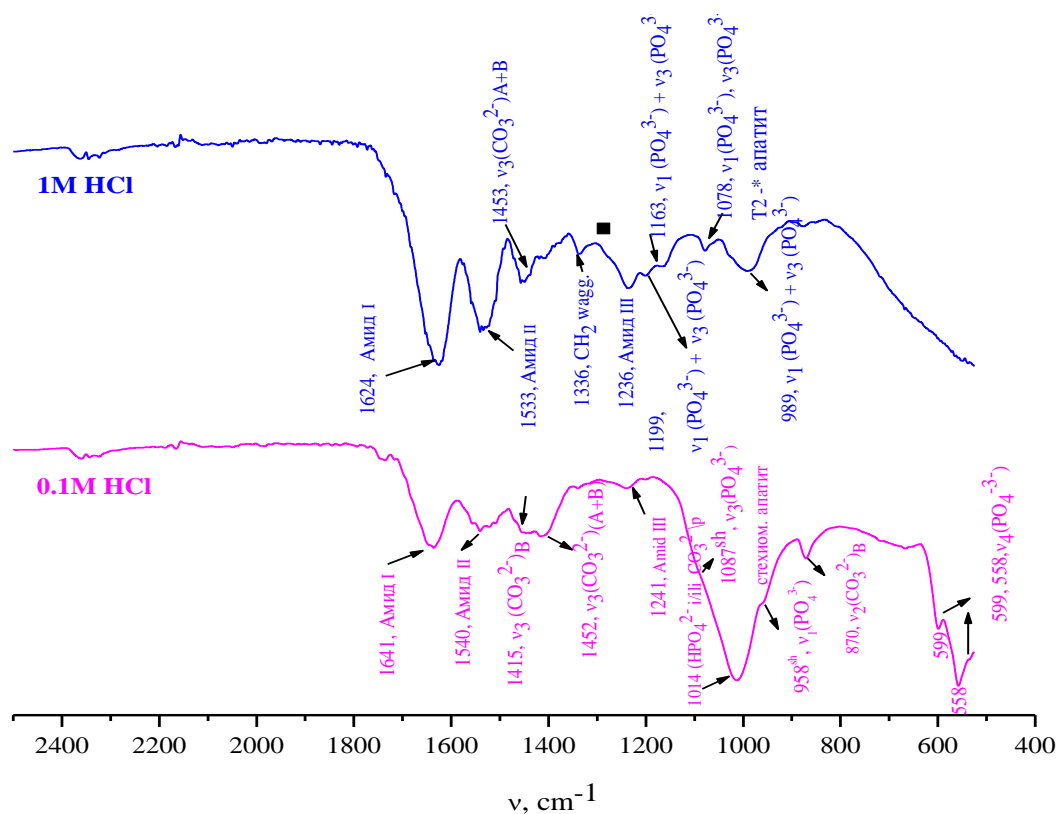
Са слика је евидентно да интензитет најистакнутијих вибрационих трака у спектрима кости у растворима киселина значајно расте у поређењу са референтним узорком кости у води. Интензитет траке која се асигнира комбинацији истежућих вибрација C=O (70-85%) и C-N (10-20%) веза у пептидном скелету протеина се назива амид I трака. У структури колагена ова трака се налази на око 1650 cm^{-1} и у свима анализираним спектрима има мали интензитет, значајно мањи од интензитета траке која се асигнира вибрацијама фосфатне групе (око 1100 cm^{-1}).

У референтном спектру, интензитет амид I траке (слика 26а) је нижи у односу на интензитет исте траке у спектрима кости у испитиваним киселинама, што подржава претходне налазе да деловањем киселина долази до уклањања површинског слоја кости [72,92,93]. Најприметније промене у интензитету амид I траке се уочавају у спектрима кости у хлороводоничној киселини, (10% (0,1 М HCl) и 22,5% (1 М HCl)) уз такође присутан померај траке за 12 cm^{-1} (слика 26б). У случају флуороводоничне и сирћетне киселине (слика 27а) положај амид I траке је скоро непромењен и за неколико процената већи у односу на

спектар кости у хлороводоничној киселини. Промена у интензитету амид I траке је у сагласности са литературским подацима у којима се посебно наглашава деминерализациона моћ хлороводоничне киселине и њен утицај на садржај органске матрице кости [72,92,93]. Сматра се да услед деминерализације кости долази до раскидања водоничних веза између минералне матрице кости и протеина чиме се повећава вибрациона слобода кретања молекула протеина што има за последицу промену интензитета трака [73, 94, 95].

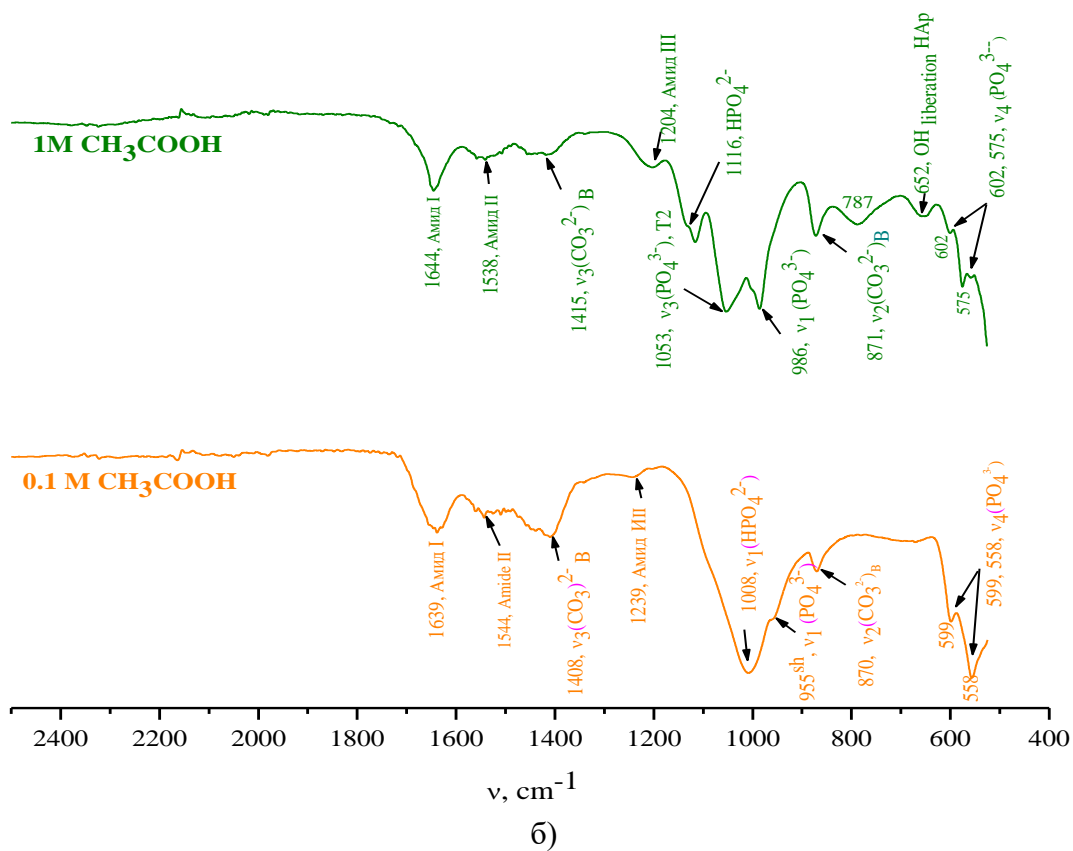
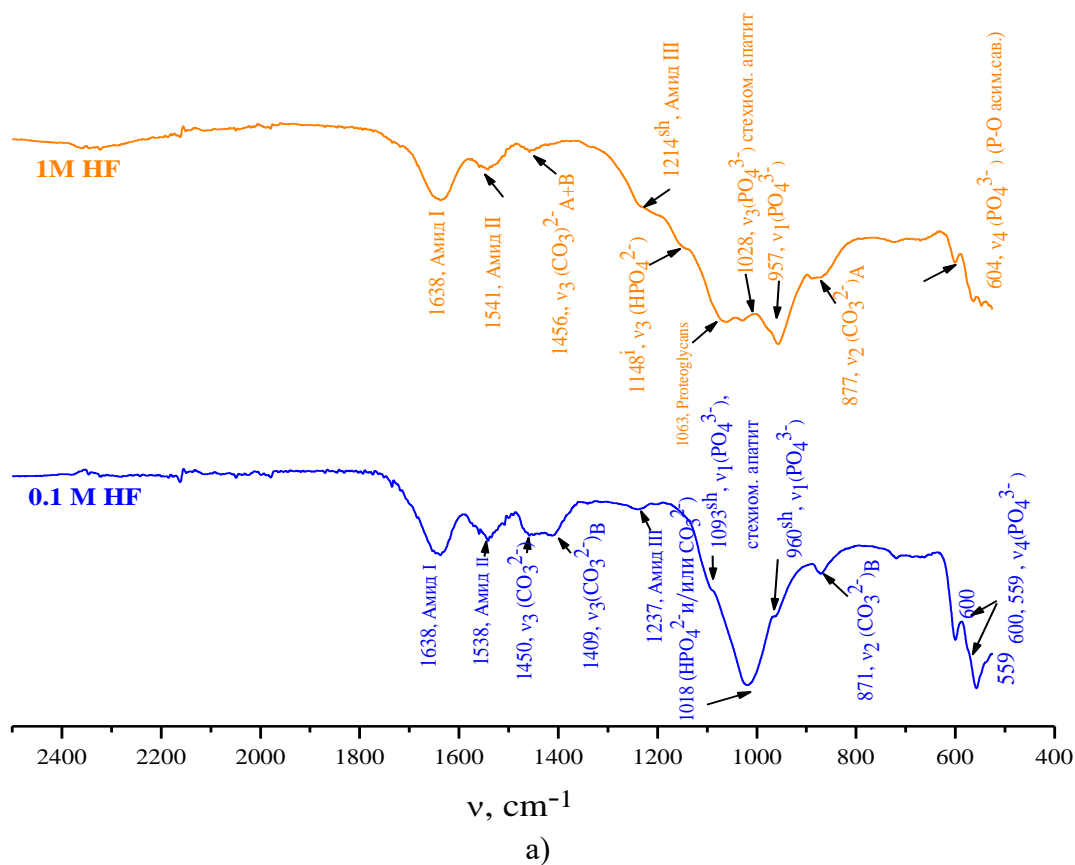


a)



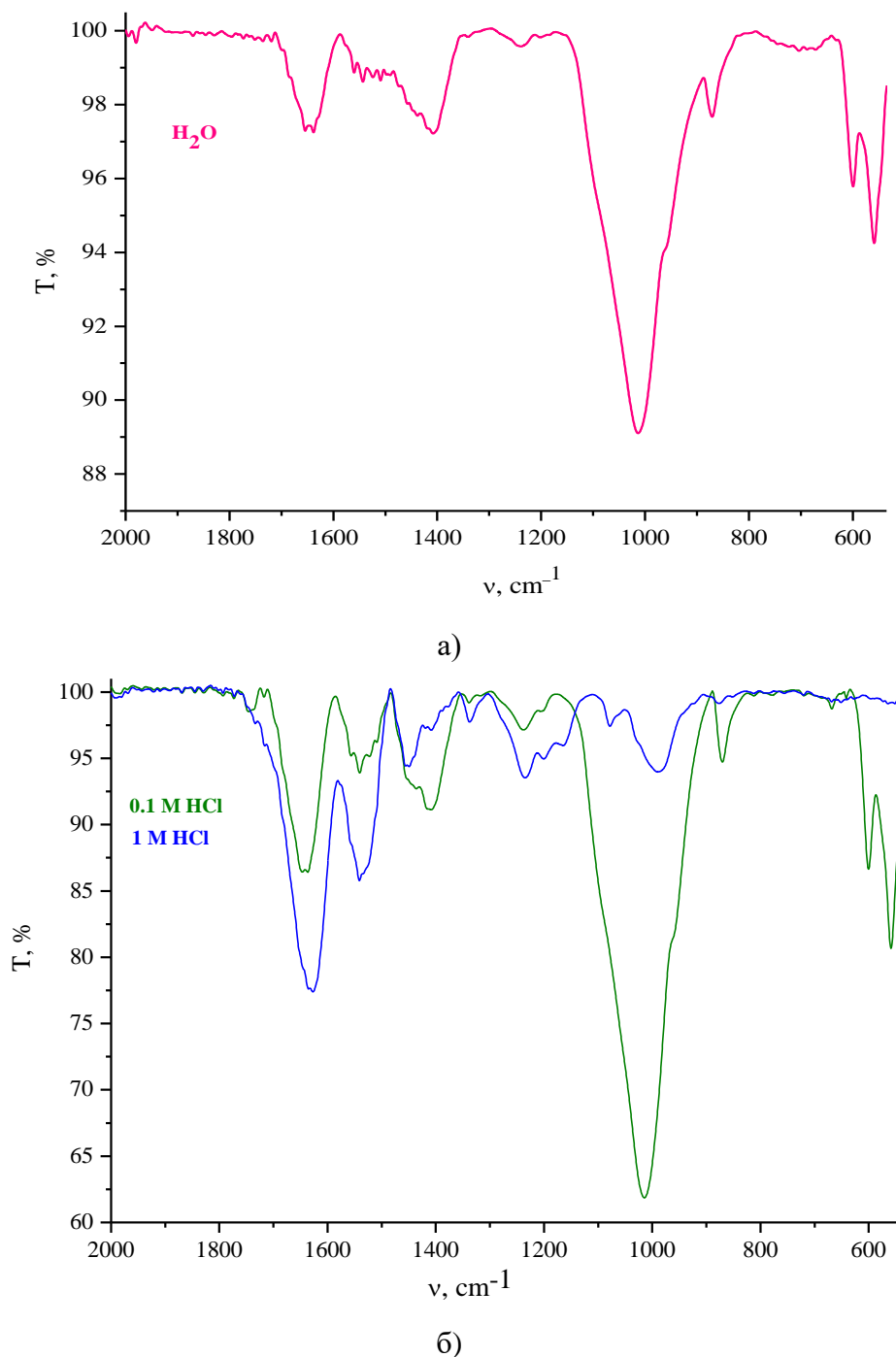
б)

Слика 24 Асигнација вибрационих трака у инфрацрвеним спектрима свињске кости у води (а) и хлороводоничној киселини (б)

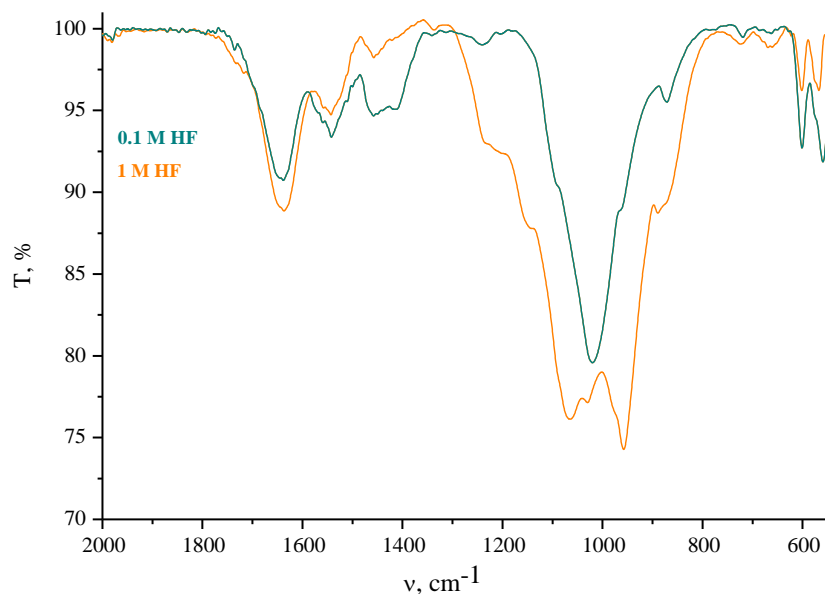


Слика 25 Асигнација вибрационих трака у инфрацрвеним спектрима свињске кости у флуороводоничној (а) и сирћетној киселини (б)

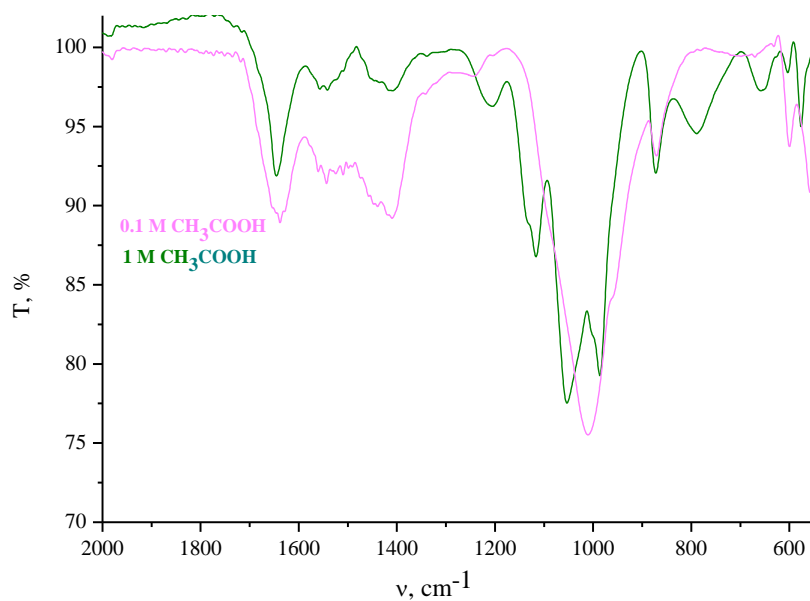
Анализа структуре амид I траке домену дала је увид у секундарну структуру колагена. У табели 5 приказани су резултати деконволуције вибрационих спектра у области амид I траке а на сликама 28 и 29 спектри деконволуције свих испитиваних раствора кости у киселинама. Након деконволуције, идентификоване су вишеструке траке на основу литературских података за асигнацију трака секундарне структуре колагена, траке β -плоча, β -структуре, α -хеликса, неуређеног колагена, и тзв. β -turn-а (нерегуларна секундарна структура у протеинима која изазива промену смера полипептидног ланца) [48,49,50, 52,53,74]. Амид I трака референтног узорка у води садржи три подтраке приближно истих интегралних површина (30,1; 38,8 и 31,0%, редом) које се асигнирају β -плочи, α -хеликсу и β -структури колагена.



Слика 26 Упоредни приказ инфрацрвених вибрационих спектра свињске кости у води (а) и хлороводоничној киселини (б)



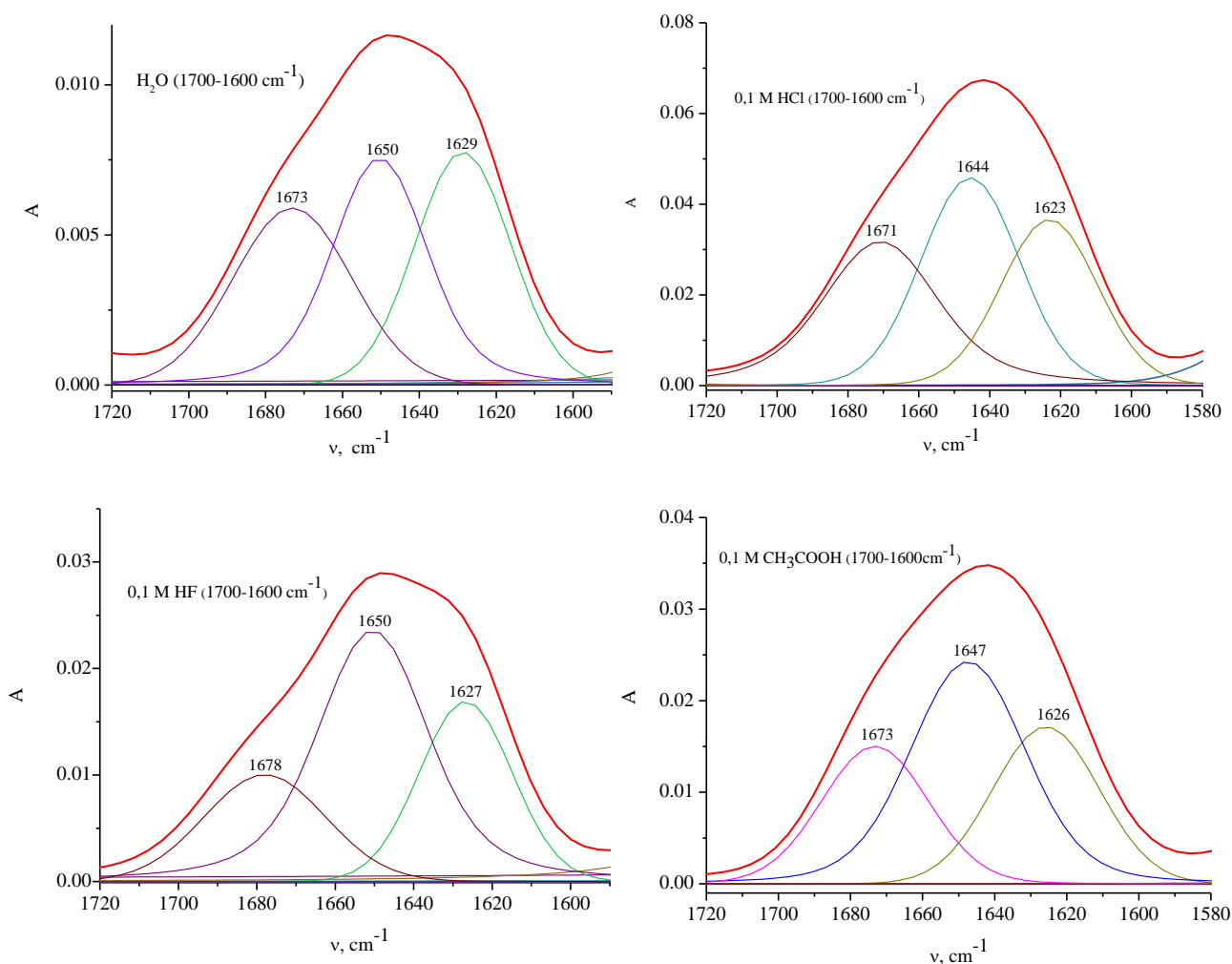
a)



б)

Слика 27 Упоредни приказ инфрацрвених вибрационих спектра свињске кости у флуороводоничној (а) и сирћетној киселини (б)

У спектрима узорка костију у флуороводоничној и сирћетној киселини (обе концентрације), структура амид I траке остаје иста, али са променом интегралних површина подтрака нарочито израженом у случају површине трака асигнираним β -плочи и α -хеликсу колагена. Површина траке β -плоче са повећањем концетрације киселине расте са 25,5 (0,1 М) на 43,4 % (1 М) док се површина траке асигниране α -хеликсу са повећањем концетрације киселине смањује са 51,7 (0,1 М) на 34,6% (1 М). Све наведено указују на квантитативне промене у саставу колагена (табела 5, слика 28). Подтрака која се асигнира β -структури колагена остаје скоро непромењена. У спектрима деконволуције кости растворене у 1 М хлороводоничној киселини површина траке која је асигнирана β -плочи колагена је двоструко већа (58,0%) у поређењу са површином исте траке у 0,1 М раствору (28,6%) (табела 5, слика 29). Такође, неуређени (случајно оријентисани) и β -структурни колаген (у 0,1 М раствору киселин) се трансформишу у α -хеликс и β -turn облике (1 М) редом, при чему је површина траке асигниране β -turn облику најмања, 8,9% (Табела 5).

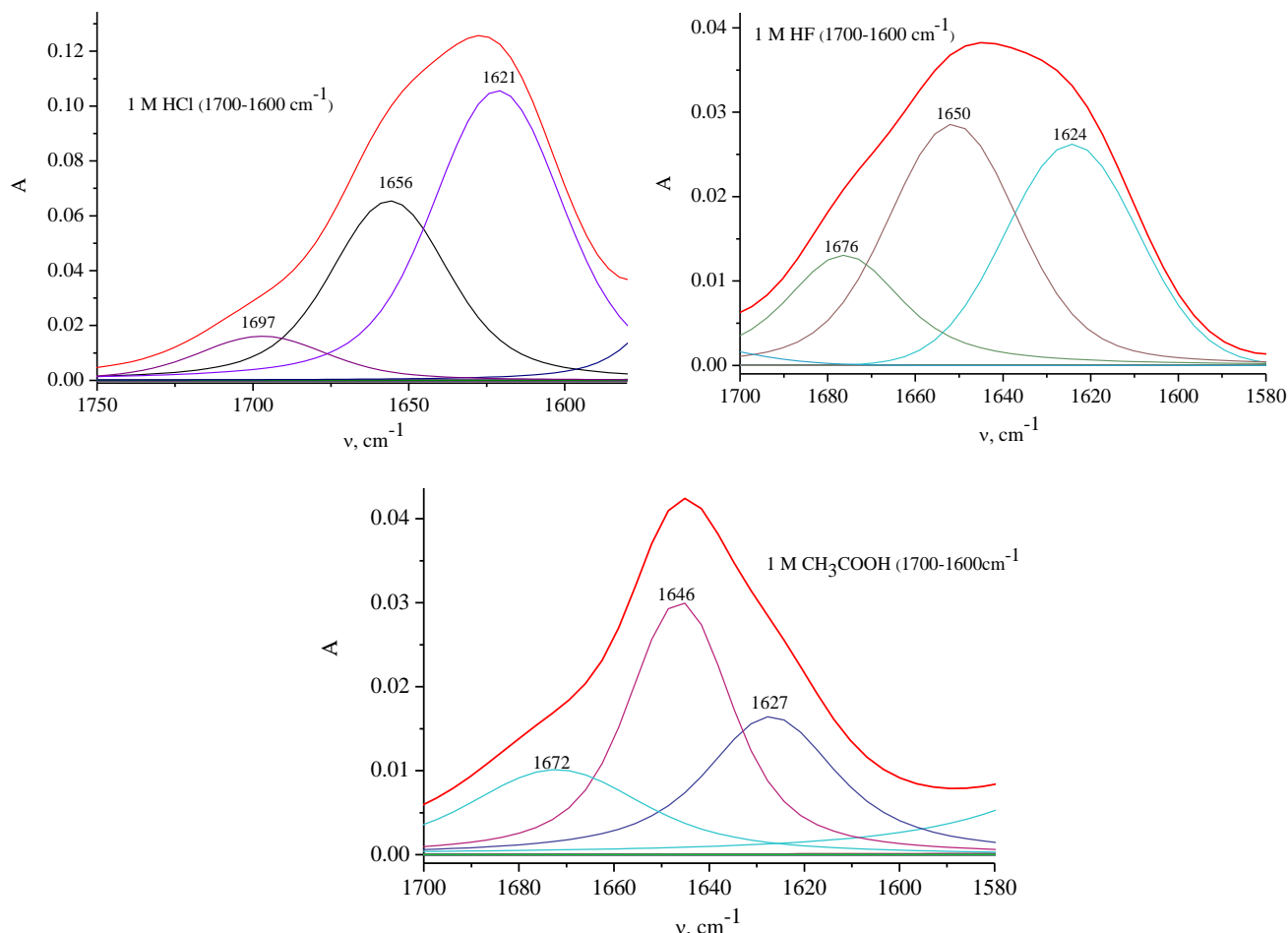


Слика 28 Спектри деконволуције у домену амида I траке за кост у референтном раствору и 0,1 M растворима испитиваних киселина ($1720-1600\text{ cm}^{-1}$)

Табела 5 Резултат деконволуције вибрационих спектра свињске кости после третмана испитиваним киселинама у домену амид I траке ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$)

Медијум	Конц. (mol dm^{-3})	Положај подтрака (cm^{-1})	Интегрална површина (%)	Асигнација подтрака колагена [48, 49, 50, 52, 53, 74]
H₂O	/	1629	37,4	β-плоча
		1650	37,1	α-helix
		1673	25,5	β-структура
HCl	0,1	1623	28,6	β-плоча
		1645	36,6	неуређени колаген
	1,0	1671	34,8	β-структура
		1621	58,0	β-плоча
HF	0,1	1656	33,1	α-хеликс
		1697	8,9	„β-turn“
		1627	25,5	β-плоча
	1,0	1650	51,7	α-хеликс
		1678	22,8	β-структура
		1621	43,4	β-плоча
		1650	34,6	α-хеликс

CH₃COOH	0,1	1676	22,1	β-структура
		1626	28,1	β-плоча
		1647	46,7	неуређени колаген
	1,0	1673	25,2	β-структура
		1627	32,2	β-плоча
		1646	43,1	неуређени колаген
		1672	24,7	β-структура



Слика 29 Спектри деконволуције у домену амида I траке за кост у 1 М растворима испитиваних киселина ($1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$)

6.4.2 Анализа $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домена

Траке које се асигнирају вибрационим облицима биолошких апатита ($\nu_1\text{-}\nu_4$) јављају се у три различита фреквентна опсега средње инфрацрвене области спектра. Биолошки апатити садрже два неорганска ортофосфатна јона, PO_4^{3-} и HPO_4^{2-} . Апатитични калцијум-фосфат може имати више различитих хемијских састава као што су стехиометријски хидроксиапатит, добро кристализован апатит са недостатком Са (карбонатни апатит типа Бе или апатит који садржи HPO_4^{2-}) и слабо кристализовани апатит са недостатком Са који садржи HPO_4^{2-} јоне. Слободни фосфатни јон има тетрадарску симетрију (T_d) тако да су само $\nu_3(T_2)$ (антисиметрична истежућа вибрација, $1200\text{-}960\text{ cm}^{-1}$) и $\nu_4(T_2)$ (антисиметрична савијајућа вибрација, дублет на 563 и 604 cm^{-1}) вибрациони облици инфрацрвено активни. У случају да је симетрија функционалне групе нарушена, $\nu_1(A_1)$ (симетрична истежућа

вибрација, трака на око 960 cm^{-1}) и $\nu_2(\text{E})$ (симетрична савијајућа вибрација, трака на око 473 cm^{-1}) облици се такође примећују у инфрацрвеним спектрима. Трака која се асигнира симетричној истежућој ν_1 вибрацији је у слабо кристалним апатитима уска, обично видљива као раме траке која се асигнира ν_3 облику [47].

Анализа комплексне траке у области од $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, приписане вибрацијама кристалне и некристалне структуре фосфата, и траке у области $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, асигниране $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ вибрацији, указала је на промене у структури и интензитету наведених трака услед растварање фосфата (слике 26 и 27) [53, 96-100]. Добијени резултати сугеришу да повећање концентрације киселина првенствено утиче на интензитет и структуру фосфатне траке, јер је садржај фосфата подложнији деминерализацији. Приметне промене у интензитету и структури траке видљиве су у спектрима свих узорака. Интензитет $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ траке у референтном спектру свињске кости је низак (89% Т), што је у сагласности са могућим растварањем фосфата у води у којој је присутна ниска концентрација раствореног CO_2 [97, 98]. Интензитет фосфатне траке у спектрима кости у хлороводоничној киселини знатно опада са порастом концентрације киселине (од 62% Т до 94% Т), што указује на растварање фосфата. Предпоставља се да у хлороводоничној киселини долази до реакције између киселине и калцијум-фосфата/калцијум-карбоната из кости, при чему се граде калцијум-дихидрохенфосфат $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ и калцијум-хлорид (CaCl_2), оба растворљива у киселини (уз формирање угљен-диоксида који излази из система као гас) [53, 96-100]. Најизраженија промена се уочава на фосфатној траци у спектру кости третиране флуороводоничном киселином (слике 27а). Интензитет траке се у растворима обе концентрације не мења знатно (79% Т у 0,1 М и 75% Т у 1 М раствору), али су приметне велике промене у ширини и структури траке што су показали и резултати деконволуције. Промене у интензитету се такође примећују на дублетној траци у области $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ која се асигнира $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ облику [97-101]. Најдрастичнија промена је евидентна у спектру 1 М раствора хлороводоничне киселине (слика 26б), где трака $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ облика потпуно нестаје, што указује на изражену деминерализацију.

Област од $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ у којој се јављају вибрације фосфатне групе, $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$, је у спектрима минерализованих ткива сложена и састоји се од више подтрака које указују на динамичку природу апатитских кристала, који настају услед специфичног хемијског окружења. Резултати деконволуције спектра у наведеној области приказани су у табели 6 и на сликама 30 и 31. Након деконволуције, идентификоване су подтраке које су асигниране специфичним вибрационим облицима у складу са литературским подацима [48, 49, 50, 52, 53, 96]. Поред квалитативних промена спектри деконволуције указују и на квантитативне промене у структури кости.

У спектру деконволуције референтног узорка налази се пет трака које припадају различитим фосфатним облицима, у распону од ортофосфатних вибрација, вибрација фосфатне групе у апатитској средини, нестехиометријског хидроксиапатита који садржи ваканције типа HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-} , тип Бе карбонатног апатита и стехиометријски хидроксиапатит. Највећа интегрална површина (28,9%) је констатована код подтраке која се асигнира фосфатној групи у апатитском окружењу, док је најмања интегрална површина констатована код подтраке која се асигнира ортофосфатном јону (13,5%).

Структура подтрака трака у спектрима кости третиране хлороводоничном киселином је исти, уз појаву додатне траке у спектру 0,1 М раствора, која је асигнирана $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ облику карактеристичном за стехиометријски апатит (слика 30). Ако се посматра површина подтрака евидентно је да постоји разлика у интегралној површини траке која се асигнира $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ облику у апатитском окружењу, а која заузима четири пута већу површину у спектру 1 М раствора (45%) (слика 31) у поређењу са 0,1 М раствором (11,2 %), и подтраке која се асигнира $\nu_3(\text{T}_2)$ вибрационом облику и која заузима три пута већу површину у спектру 0,1 М раствора (29,5%) у поређењу са 1 М раствором (9,3%) (табела 6).

Табела 6 Резултат деконволуције вибрационих спектра свињске кости после третмана испитиваним киселинама у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрација фосфатне групе ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)

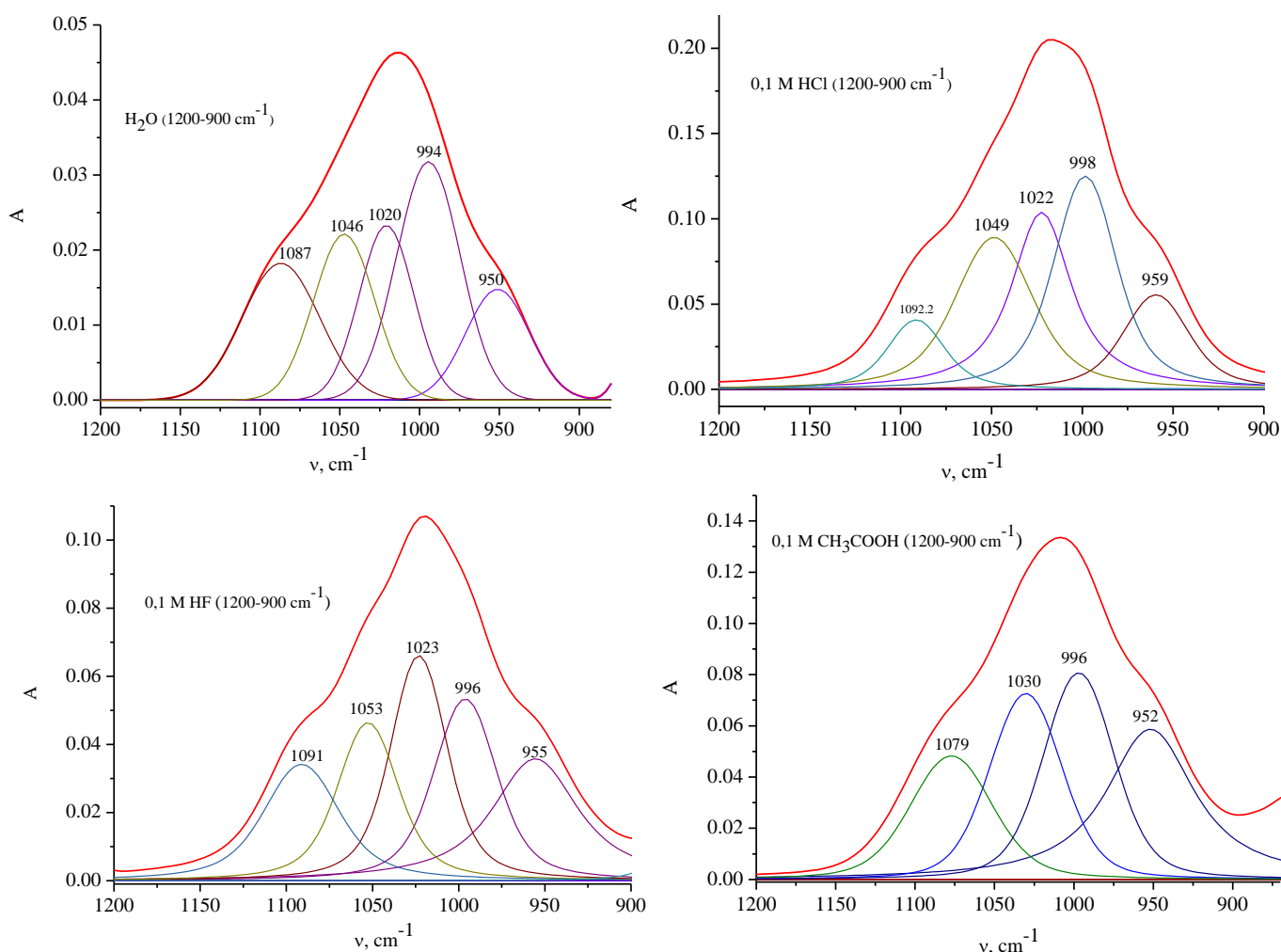
Медијум	Конц. (mol dm^{-3})	Положај подтрака (cm^{-1})	Интегрална површина (%)	Асигнација подтрака [48, 49, 50, 52, 53,96]
H₂O	/	950	13,5	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$
		994	28,9	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
		1020	18,2	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
		1046	19,3	Бе тип карбонатног апатита, хидоксиapatит
		1087	20,1	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, стехиометријски апатит
HCl	0,1	959	12,4	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$
		998	11,2	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
		1022	26,7	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
		1049	29,5	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
		1092	20,2	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, стехиометријски апатит
		HCl	1,0	964
989	45,0			PO_4^{3-} у апатитском окружењу
1021	26,7			$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
1075	9,3			$\nu_3(T_2)$ облик апатита
HF	0,1			955
		996	20,7	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
		1023	23,0	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
		1053	17,6	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
		1091	16,3	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен у стехиометријском апатиту
		HF	1,0	959
990	19,6			PO_4^{3-} у апатитском окружењу

CH₃COOH		1029	21,9	$\nu_3(PO_4^{3-})$ у стехиом. апатиту
		1066	10,7	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
		1103	7,8	$\nu_3(PO_4^{3-})$ слабо кристалан апатит
		1153	7,0	апатит са присуством HPO_4^{2-} (биолошки апатит)
		952	30,6	$\nu_1(PO_4^{3-})$
		997	26,1	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
	0,1	1030	23,7	$\nu_3(PO_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту
		1079	19,6	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
		963	8,5	$\nu_1(PO_4^{3-})$
		987	17,3	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
		1016	22,1	$\nu_3(PO_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
	1,0	1054	35,7	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
		1118	13,5	HPO_4^{2-}
		1142	2,9	апатит са присуством HPO_4^{2-} (биолошки апатит)

У случају спектра кости у флуороводоничној киселини структура траке $\nu_1/\nu_3(PO_4^{3-})$ вибрације је веома сложена (слика 27а). За бољу и прецизнију анализу спектра 1 М раствора, извршена је деконволуција у ширем опсегу таласних бројева, укључујући области у којој се јављају траке вибрација карбонатне групе и амида III траке (табела 6, слика 31) из разлога што наведене вибрације утичу на облик и интензитет $\nu_1/\nu_3(PO_4^{3-})$ вибрације фосфатне траке. У спектру 1 М раствора кости у флуороводоничној киселини поред трака које се асигнирају ортофосфатном јону, PO_4^{3-} у апатитској средини, нестехиометријском хидроксиапатиту и T_2 вибрационим облицима апатита, јављају се и две додатне подтраке релативно малих површина, које су карактеристичне за слабо кристалне апатите (7,8%) и апатите који садрже HPO_4^{2-} јон (7,0%) (слика 31). Највећу интегралну површину има подтрака у спектру деконволуције 0,1 М раствора, која се асигнира нестехиометријском хидроксиапатиту који садржи ваканције типа HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-} (23,0%), а у спектру деконволуције 1 М раствора подтрака која се асигнира $\nu_3(PO_4^{3-})$ вибрацији карактеристичној за стехиометријски апатит (21,9%) (табела 6).

У спектрима узорка третираног сирћетном киселином, постоје разлике у структури домена $\nu_1/\nu_3(PO_4^{3-})$ и, последично, у површини коју заузимају траке које су додељене специфичним облицима вибрација. Подтрака која се асигнира ортофосфатој вибрацији $\nu_1(PO_4^{3-})$ у спектру 0,1 М раствора узорка је скоро четири пута већи по површини (30,6%) у односу на исту траку у концентрисанијем раствору узорка (8,5%). Добијени резултат одражава степен супституције апатита и указује да долазази до смањења количине ортофосфата у концентрованијим растворима (табела 6). Овај резултат је у складу са повећаним односом карбоната у односу на фосфат у спектрима 1 М раствора узорка (слика 31). Идући од спектра 0,1 М ка спектру 1 М раствора узорка у сирћетној киселини види се да трака која се асигнира стехиометријском апатиту мења положај што указује на

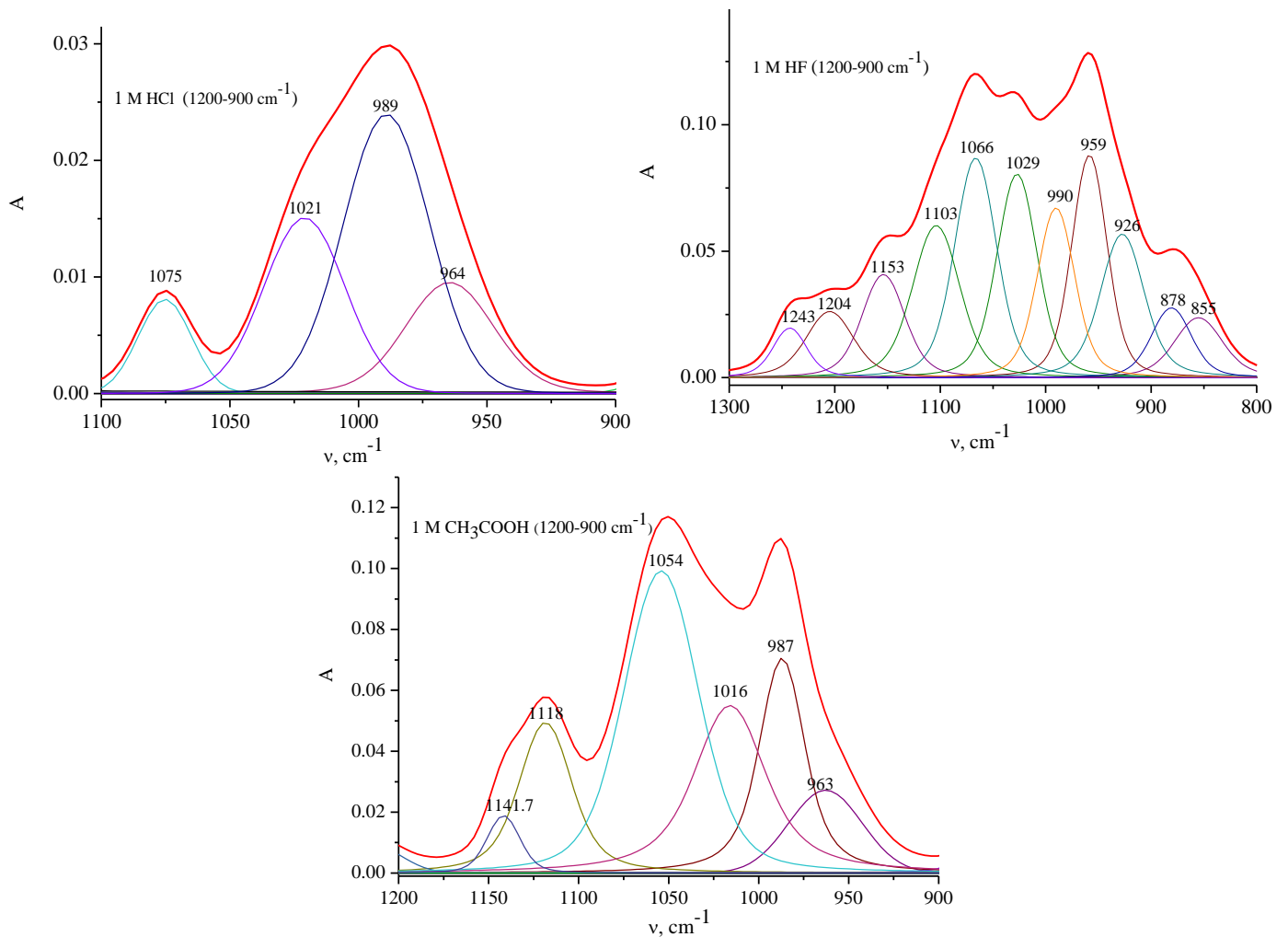
трансформацију у нестехиометријски апатит који садржи вакансиије типа HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-} што је резултат потврђен и израчунатим односом карбонат/фосфат. Такође, спектар 1M раствора узорка кости садржи подтраку карактеристичну за биолошке апатите са примесамма HPO_4^{2-} јона (1142 cm^{-1}).



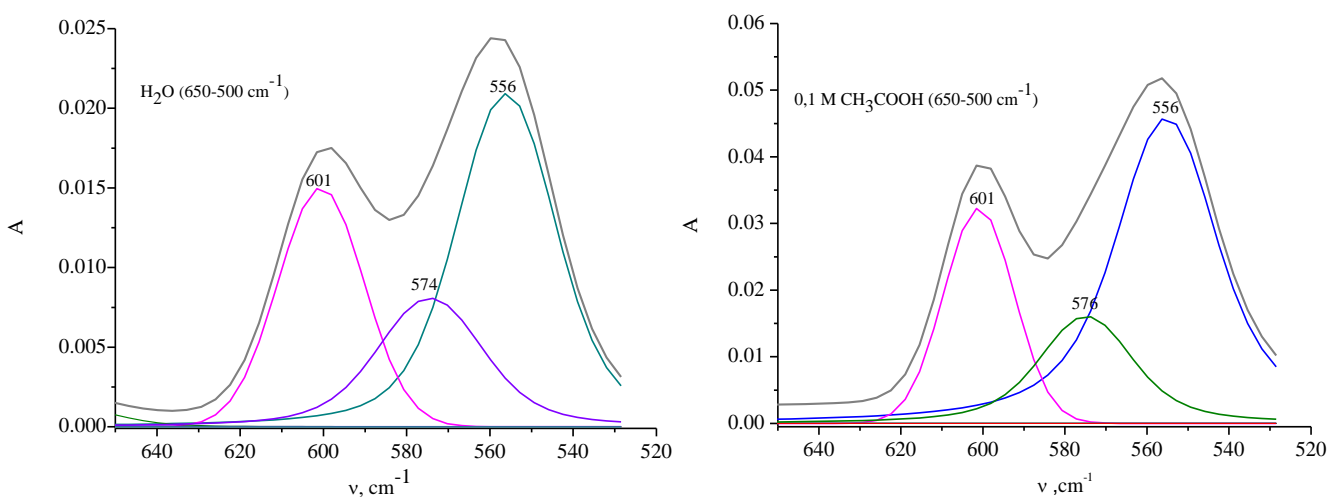
Слика 30 Спектри деконволуције у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације за кост у 0,1 М растворима испитиваних киселина ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)

Процена садржаја фосфатног јона, PO_4^{3-} , у апатитском окружењу такође је добијена деконволуцијом траке $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације (табела 7) у области $650\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Основни $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ облик се у вибрационом спектру појављује као сложена трака састављена од три подтраке, асигниране основном $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ облику (трака на око 560 cm^{-1}), PO_4^{3-} јону у кристалном апатиту (трака на око 580 cm^{-1}), и лабилно везаном PO_4^{3-} јону (трака на око 600 cm^{-1}) (фосфатни јони који се лако замењују или мобилишу унутар коштаног ткива, они нису чврсто везани за минералну фазу, хидроксиапатит, и могу се лакше ослободити или уградити у ћелијске процесе од оних који су део стабилне минералне структуре) [48, 49, 50, 52, 53].

Интегралне површине одговарајућих подтрака $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ облика у спектру референтног узорка кости у води (слика 32) крећу се од 18% (кристално апатитно окружење) до 61,1% (табела 7). Интегралне површине подтрака у спектрима флуороводоничне киселине (0,1 и 1 М) су приближно исте док је у спектрима узорка третираног сирћетном киселином, интегрална површина траке PO_4^{3-} јона у кристалном апатиту скоро 2,5 пута већа у 1 М



Слика 31 Спектри деконволуције у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације за кост у 1 М растворима испитиваних киселина (1200-900 cm⁻¹)



Слика 32 Спектри деконволуције у домену $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације фосфатне групе за кост у референтном раствору и 0,1 М раствору сирћетне киселине (с лева на десно) (650-500 cm⁻¹)

раствору киселине (48,2%) у поређењу са мање концентрованим раствором (19,9%) (табела 7, слика 32). Ова промена је такође праћена двоструким смањењем површине траке која се асигнира лабилно везаном PO_4^{3-} јону у спектру кости у 1 М раствору киселине (са 23,1% на

11,8%). Најизраженија промена у области од 650-500 cm^{-1} се види у спектру 1 М раствора хлороводоничне киселине (слика 26, табела 7), где трака основног $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ облика потпуно нестаје услед деминерализације кости.

Табела 7 Резултат деконволуције вибрационих спектра свињске кости после третмана испитиваним киселинама у домену $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ вибрација фосфатне групе (650-500 cm^{-1})

Медијум	Конц. (mol dm^{-3})	Положај трака (cm^{-1})	Интегрална површина (%)	Асигнација подтрака [48, 49, 50, 52, 53]
H₂O	/	556	61,1	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
		574	18,0	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, кристално апатитско окружење
		601	20,9	лабилни PO_4^{3-}
HCl	0,1	556	45,6	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
		572	26,2	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, кристално апатитско окружење
		600	28,2	лабилни PO_4^{3-}
	1,0	нама трака	нама трака	/
HF	0,1	558	51,0	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
		575	20,7	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, кристално апатитско окружење
		601	29,3	лабилни PO_4^{3-}
	1,0	564	45,5	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
		573	24,3	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, кристално апатитско окружење
		603	30,2	лабилни PO_4^{3-}
CH₃COOH	0,1	556	57,0	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
		576	19,9	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, кристално апатитско окружење
		601	23,1	лабилни PO_4^{3-}
	1,0	569	40,0	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$
		578	48,2	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, кристално апатитско окружење
		603	11,8	лабилни PO_4^{3-}

6.4.3 Анализа $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ домена

Траке инфрацрвено активних вибрација карбонатног ањона у структури хидроксиапатита јављају се у две области спектра. Трака у области од 1540-1400 cm^{-1} се

асигнира $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ асиметричној истежућој вибрацији групе и представља комбинацију тзв. (А+Б) типа карбоната. Друга трака, у области од $900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$, се асигнира ν_2 савијајућој вибрацији карбонатног ањона изван равни, ($\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$). У табели 8 су приказани резултати деконволуције вибрационих спектра свињске кости у за $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ вибрација.

Анализа дела спектра карактеристичног за карбонатни ањон се обично ради деконволуцијом траке $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ вибрације чија структура одражава различита окружења карбонатних јона у структури хидроксиапатита [102]. Деконволуцијом у овом делу спектра добијају се три подтраке, трака на $881\text{-}878\text{ cm}^{-1}$ се асигнира карбонату типа А, трака на $873\text{-}870\text{ cm}^{-1}$ се карбонату типа Бе и трака на 865 cm^{-1} се лабилно везаном карбонату познатом и као тип А2. Прве две подтраке одговарају апатитском окружењу карбонатног ањона који замењује фосфатни и хидроксилни јон, редом. Трећа подтрака одговара лабилном карбонату у неапатитској средини који се налази насумично распоређен по површини коштаног апатита. Резултати деконволуције приказани у табели 8 показују да је доминантан образац супституције испитиваног узорка свињске кости у референтном медијуму, хлороводоничној и сирћетној киселини, карбонат Б типа, а у флуороводоничној киселини супституције типа Бе и А2. Добијени резултат је очекиван с обзиром да је супституција карбонатом Бе типа доминантна у биолошким апатитима.

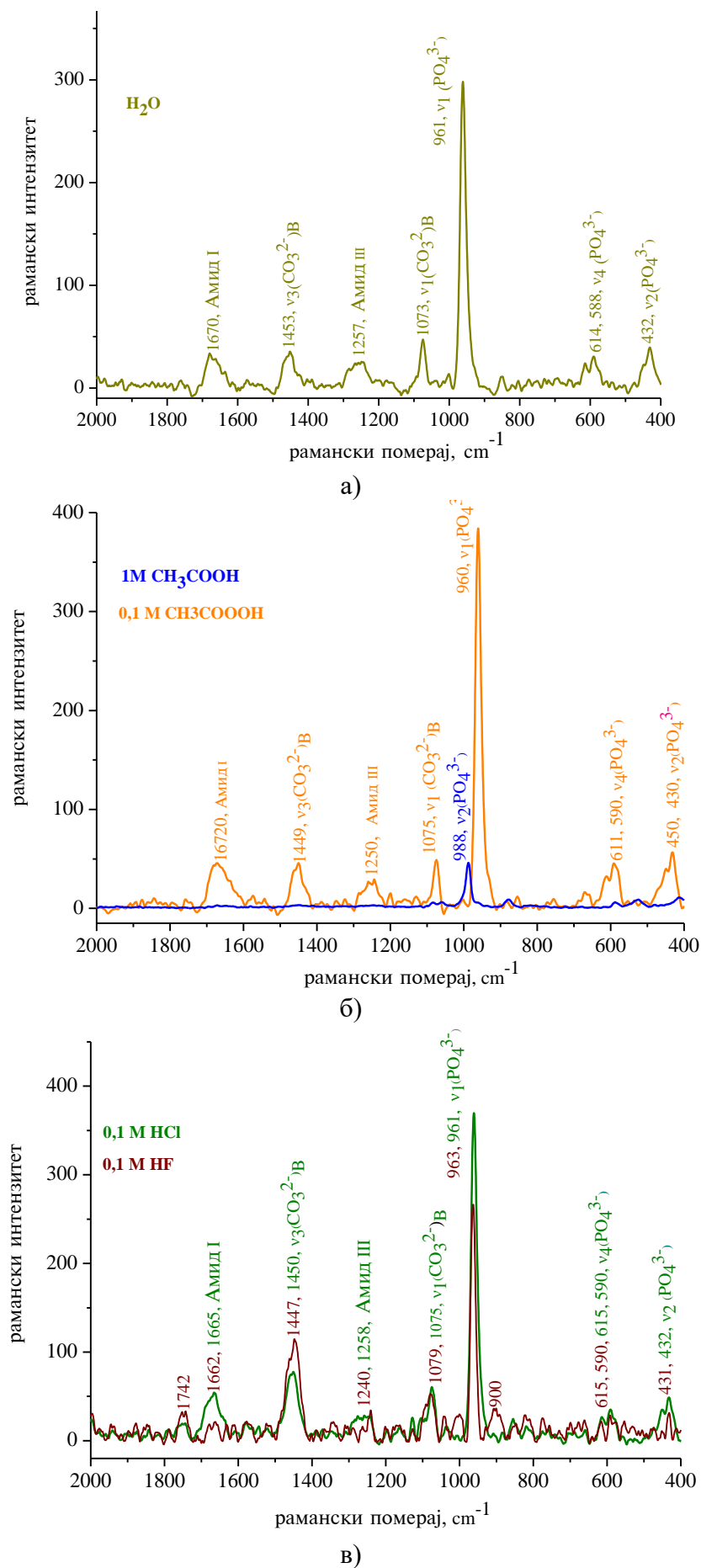
Табела 8 Резултат деконволуције вибрационих спектра свињске кости после третмана испитиваним киселинама у домену $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ вибрација карбонатне групе ($900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$)

Медијум	Конц. (mol dm^{-3})	Положај подтрака (cm^{-1})	Интегрална површина (%)	Асигнација подтрака [48, 49, 50, 52, 53]
H_2O	/	869	100	Бе тип CO_3^{2-}
HCl	0,1	870	100	Бе тип CO_3^{2-}
	1,0	нема трака	нема трака	/
HF	0,1	871	100	Бе тип CO_3^{2-}
	1,0	855	48,5	лабилни јон CO_3^{2-}
		878	51,5	А тип CO_3^{2-}
CH_3COOH	0,1	870	100	Бе тип CO_3^{2-}
	1,0	871	100	Бе тип CO_3^{2-}

6.5 Анализа раманских спектра: утицај хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселина

6.5.1 Анализа $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ домена

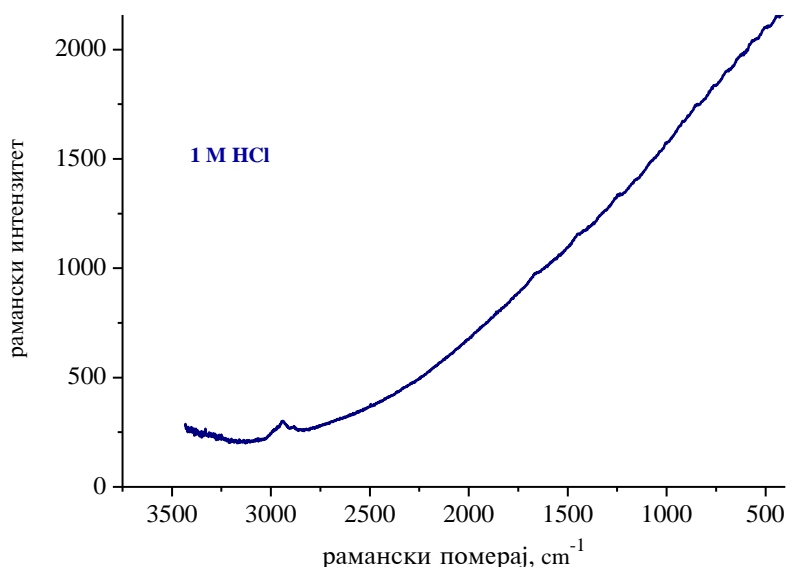
Генерално у раманским спектрима свињске кости доминира веома интензивна трака асигнирана симетричној истежућој вибрацији фосфатне групе, $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$, на око 960 cm^{-1} [68]. Присутне су и траке других фосфатних вибрационих облика, $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ ($440\text{-}400\text{ cm}^{-1}$), $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ ($590\text{-}570\text{ cm}^{-1}$) и $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ ($1060\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$), као и траке које се асигнирају вибрацијама компонената органске матрице, амид I, амид II и амид III облика, као и трака



Слика 33 Рамански спектри кости у води (а), сирћетној киселини (0,1 и 1 М) (б) и хлороводоничној и флуороводоничној киселини (0,1 М) (в)

$\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$ вибрације карбонатног јона (Бе тип супституције, трака на око 1070 cm^{-1} која се обично преклапа са траком $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације фосфатне групе).

Рамански спектри кости у референтном раствору, оба раствора сирћетне киселине и 0,1 М растворима флуороводоничне и хлороводоничне киселине, приказани су на слици 33. У спектрима 0,1 М раствора присутна је веома интензивна трака $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације која се налази у опсегу области $963\text{-}959\text{ cm}^{-1}$ (слика 33). Такође су присутне и траке асигниране амид I, амид III вибрацијама као и траке $\nu_1(\text{CO}_3^{2-})$, $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ и $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ облику, све приближно једнаких интензитета. Трака која припада $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ облику је скоро истог интензитета у спектрима узорка снимљеним у води и 0,1 М растворима киселина. У 1 М раствору кости у сирћетној киселини интензитет траке $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације значајно опада и помера се ка вишим таласним бројевима што указује на промену вибрационог облика, који се може, највероватније, асигнирати $\nu_3(\text{HPO}_4^{2-})$ вибрацији (986 cm^{-1}) брушитног облика киселог калцијум-фосфата који се понекад може јавити у киселим растворима [103]. Са порастом концентрације киселина све остале вибрационе траке, осим траке $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ облика, постају занемарљиво малог интензитета. Рамански спектри узорака костију у концентрованим растворима флуороводоничне и хлороводоничне киселине (1 М) нису могли бити снимљени због јако интензивне флуоресценције раствора (слика 34).



Слика 34 Рамански спектар свињске кости у 1М хлороводоничној киселини који приказује изражену флуоресценцију

6.6 Квантитативни параметри квалитета кости испитиване у растворима хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселине

Квантитативни параметри квалитета кости, који се користе за описивање промена у хемијском саставу кости, израчунати из инфрацрвених спектра су однос минерала према органској матрици, ММ, индекс кристалинчности, CI, и однос карбоната према фосфату [54, 104, 105].

Највише анализирани квантитативни параметар инфрацрвених спектра је однос минерала према органској матрици који одражава однос фосфата и садржаја органске матрице и који се узима као добра мера јачине костију на савијање [54]. Обично се израчунава као однос интегралних површина трака асигнираних $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ или $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$

(1200-900 cm^{-1}) вибрацијама и трака асигнираних амида I (1700-1600 cm^{-1}) или амида II (1620-1520 cm^{-1}) вибрацијама.

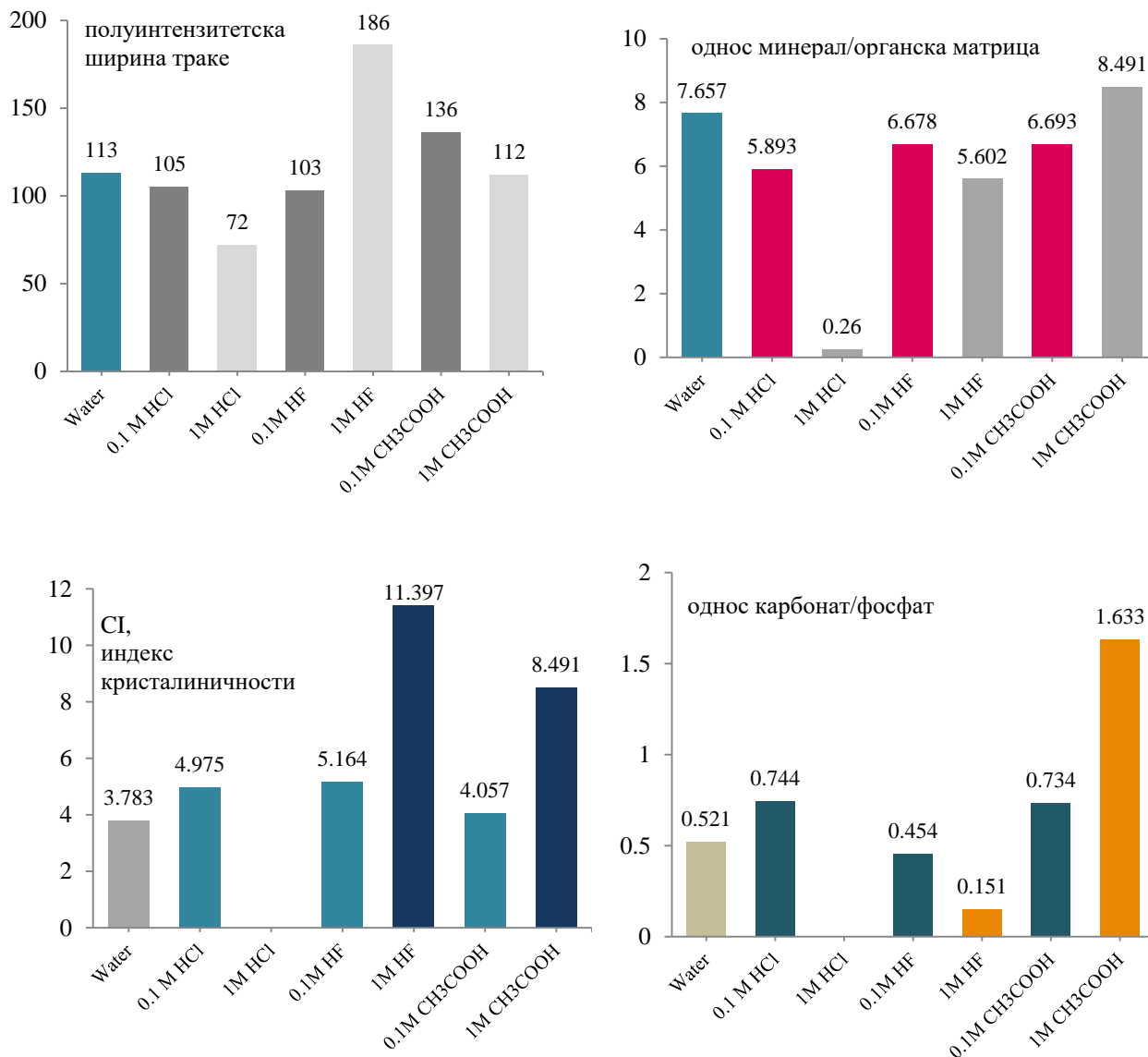
Однос карбоната према фосфату даје информације о садржају карбоната, који се генерално може одредити на неколико начина. Иако је трака која се асигнира $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ вибрацији карбонатног јона релативно изолована од главних трака које се асигнирају вибрацијама фосфатне групе њен положај, структура и интензитет могу бити под утицајем садржаја протеина што се може манифестовати преклапањем са тракама које се асигнирају протеинским облицима у области од 1900-1250 cm^{-1} . Из тог разлога ова чињеница се увек мора узет у обзир уколико се за израчунавање односа карбоната према фосфату узима интегрална површина траке $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ облика [106]. У случају супституције карбонатним јоном Бе типа, која је доминантна у испитиваном узорку свињске кости (табела 8), и биолошким апатитима уопштено, садржај карбоната се такође може израчунати као однос интензитета трака асигнираних датој вибрацији ($\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$, 1415 cm^{-1}) и фосфатној вибрацији $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ (603 cm^{-1}). Претпоставља се да семиквантитативна процена карбоната добијена коришћењем ових трака даје релативно поуздане резултате о укупном структурном садржају карбоната у узорку хидроксиапатита [11].

Кристалинност биоапатита се користи за дијагнозу патолошких стања у калцификованим ткивима, стања очуваности фосилних остатака костију, као и стања било које третиране кости. Веће вредности индекса кристалинности одражавају већи степен кристалног реда у решетки, док ниже вредности указују на деформацију решетке и мање кристале апатита. Индекс кристалинности се обично израчунава као збир интензитета максимума трака на 604 и 565 cm^{-1} ($\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ вибрациони облик) подељен са интензитетом минимума (долине) између ова два максимума. На вредност CI утиче и садржај карбоната, што је већи садржај карбоната, то су мањи кристали апатита и, последично, нижа вредност CI [107,108]. Полуинтензитетска ширина вибрационих трака, FWHM, се може такође узети као мера структурних промена хидроксиапатита. Како се структура хидроксиапатита мења и како он све више добија карактер нестехиометријског апатита трака која се асигнира $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрацији постаје шира, што даље указује на смањење реда кристала у структури апатита, а последично и смањење вредности CI индекса.

Квантитативни параметри израчунати из инфрацрвених спектра приказани су на слици 35. У референтном спектру, садржај фосфата је највећи у поређењу са садржајем у мање концентрованим растворима киселина, што је у складу са очекиваним најмањим нивоом деминерализације кости у води. Уколико се упореде MM вредности израчунате за 0,1 и 1 М растворе киселина тада се може закључити да се најмањи MM, за обе концентрације, добија у случају хлороводоничне киселине (5,893 (0,1М) и 0,260 (1 М)), што указује на већу способност јаких киселина да деминерализују неорганску матрицу кости. Најнижи ниво деминерализације (највећа вредност MM) се добија за сирћетну киселину (6,693 (0,1 М) и 8,491 (1 М)) док су вредности MM параметра за флуороводоничну киселину између (6,678 (0,1 М) и 5,602 (1 М)). Исти тренд промена прати и атомски садржај фосфора у проучаваним узорцима, у 0,1 и 1 М растворима, што потврђују и резултати SEM-EDX мерења који ће бити приказани у поглављу 6.9.

Индекс кристалинности израчунат за референтни узорак кости је најмањи у поређењу са растворима киселина испитиваних концентрација (0,1 и 1 М). Када се посматра утицај киселина, највећи CI индекс у 0,1 М растворима има флуороводонична киселина (5,164), затим хлороводонична (4,975) и сирћетна киселина (4,057), што указује на смањење кристалног реда и величине кристала у структури апатита (вода < сирћетна киселина < хлороводонична киселина < флуороводонична киселина). Исти тренд показују и вредности CI индекса у 1 М растворима уз напомену да је CI највећи за 1 М раствор флуороводоничне киселине (11,397) при чему CI није могао бити израчунат за раствор кости у 1 М хлороводоничној киселини због потпуног одсуства трака у области од 650-500 cm^{-1} (слика 26).

У 0,1 М растворима киселина повећање FWHM вредности траке асигниране фосфатној $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрацији прати смањење вредности CI како се структура хидроксиапатита мења. У случају 1 М раствора могуће је рећи да повећање FWHM вредности такође прати смањење вредности CI ако се пође од чињенице да су вредности FWHM траке $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације у референтном спектру кости и спектру кости у 1 М сирћетној киселини веома блиске.



Слика 35 Карактеристични параметри израчунати из ATR-FTIR спектара

$$\left(\text{MM} = \frac{A(\nu_1(\text{PO}_4^{3-}))}{A(\text{Амид I})}\right); \text{CI} = \frac{\text{Abs}(604 \text{ cm}^{-1}) + \text{Abs}(565 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(595 \text{ cm}^{-1})}; \text{C/P} = \frac{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(604 \text{ cm}^{-1})}$$

A—интегрална површина испод вибрационе траке; *Abs*—вредност апсорбанције на максимуму вибрационе траке

Недостајуће клоне у дијаграмима указују на недостајуће траке у инфрацрвеном спектру или траке које су занемарљиво малог интензитета (пад интензитета преко 85% у односу на најинтензивније траке)

Садржај карбоната у односу на фосфат у референтном узорку је нижи у поређењу са вредностима израчунатим за 0,1 М растворе хлороводоничне и сирћетне киселине и нешто већи у поређењу са вредношћу за 0,1 М раствор флуороводоничне киселине. Упоредјујући вредности односа карбонат/фосфат у растворима киселина он је у 0,1 М растворима највећи

у случају хлороводоничне киселине (0,744), затим у сирћетној (0,743) и флуороводоничној киселини (0,454). У 1 М растворима, однос карбоната и фосфата је највећи у сирћетној киселини (1,633), а много нижи у флуороводоничној киселини (0,151). Овај резултат је очекиван с обзиром да се у спектрима деконволуције за 1 М флуороводоничну киселину јавља само подтрака која се асигнира лабилном карбонату и карбонату А типа а не карбонату Бе типа (табела 8). Однос карбонат/фосфат није могао да се одреди за кост у 1 М раствору хлороводоничне киселине због потпуног одсуства фосфатних трака у области $650-500\text{ cm}^{-1}$ (слика 26). Ако се посматра утицај киселина у 0,1 М растворима, евидентно је да повећање садржаја карбоната доводи до смањења CI, што је у сагласности са литературним подацима. У 1 М растворима тренд промене односа карбонат/фосфат за сирћетну и флуороводоничну киселину је исти.

У раманским спектрима, најчешће коришћене траке за процену квантитативних односа који описују промене у хемијском саставу кости су траке које се асигнирају $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$, $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$, амид I и амид III траци. Као траке које су најмање под утицајем оријентације ткива најчешће се користе траке асигниране $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ и амид I облицима [102]. Квантитативни параметри квалитета који су израчунати из рамаских спектра су однос минерала и матрикса и индекс кристалинчности [109-111]. Однос минерал/матрикс је одређен као количник интегралних површина трака асигнираних $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ и амид I облицима. Однос зрелости према кристалинчности минерала је одређена као реципрочна вредност полуинтензитетске ширине траке асигниране $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ вибрацији (табела 9).

Табела 9 Карактеристични параметри квалитета кости израчунати из рамаских спектра

Параметар	Спектрални однос	H ₂ O	*HCl 0,1 M/1 M	*HF 0,1 M/1 M	CH ₃ COOH 0,1 M/1 M
Минерал/матрикс	$\frac{A(\nu_1(\text{PO}_4^{3-}))}{A(\text{Amide I})}$	4,658	2,981/*	7,390/*	2,817/**
Зрелост/кристалинчност	$\frac{1}{FWHM \nu_1(\text{PO}_4^{3-})}$	0,051	0,053/*	0,061/*	0.052 /0,060

A – интегрална површина испод раманских трака; *FWHM* - полуинтензитетска ширина траке

* рамански спектри 1 М раствора хлороводоничне и флуороводоничне киселине нису могли бити снимљени услед интензивне флуоресценције

Однос MM израчунат из раманског спектра референтног узорка кости у води износи 4,658 што је вредност између вредности за 0,1 М раствор флуороводоничне киселине (7,390) и 0,1 М хлороводоничне и сирћетне киселине (2,981 односно 2,817) (табела 9), што је није у сагласности са резултатима добијеним из инфрацрвених спектра (слика 35). Када се посматра утицај киселина, највећи степен деминерализације (најнижи MM) добија се за 0,1 М раствор сирћетне киселине, а затим следе хлороводонична и флуороводонична киселина. Овај тренд промене вредности MM добијених из инфрацрвених и раманских спектра такође није у корелацији због веома изражених разлика у структури фосфатне траке, која се приписује искључиво ортофосфатном облику вибрација у раманском спектру а комбинацији два вибрациона облика, $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$, у инфрацрвеним спектрима.

CI вредност за референтни узорак је блиска вредностима CI у 0,1 М растворима киселина (табела 9), са истим трендом смањења кристалног реда у структури апатита као што је добијено анализом инфрацрвених спектра (вода < сирћетна киселина < хлороводонична киселина < флуороводонична киселина). Корелација између CI вредности за 1 М растворе није направљена из разлога немогућности снимања раманских спектра 1 М раствора хлороводоничне и флуороводоничне киселине који су показали флуоресценцију

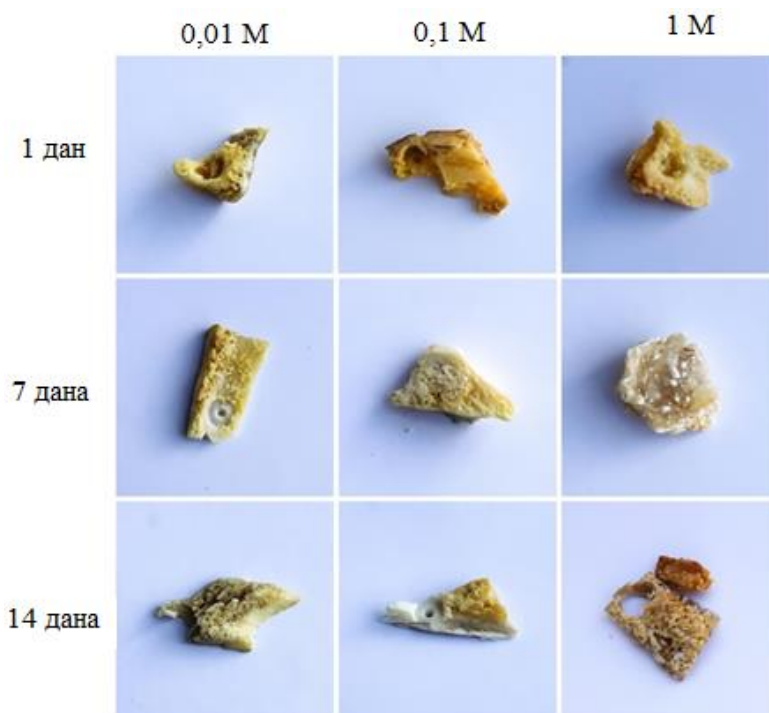
великог интензитета (слика 34). Такође је важно напоменути да су израчунате FWHM вредности за траку $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације у опсегу $16,39\text{-}19,61\text{ cm}^{-1}$ што је карактеристично за биолошке апатите и што указује на генерално нижу минералну кристаличност свињске кости у поређењу са синтетичким апатитима.

Могуће је констатовати да је одсуство потпуне корелације свих квантитативних параметара добијених из инфрацрвених и раманских спектра (слика 35, табела 9) очекивано не само због недостатка неких релевантних трака, услед интензивне флуоресцентне емисије концентрованих раствора киселина, и немогућности одређивања потпуно тачног редоследа повећања/смањења вредности специфичних параметара, али и због тога што се обе методе, иако комплементарне, заснивају на потпуно различитим феноменима, апсорпцији и расејању зрачења, што има за последицу различите вероватноће прелаза, правила избора, облик, ширину, број и интензитет трака асигнираних специфичним вибрационим облицима органске и неорганске матрице кости.

6.7 Анализа FTIR спектра: утицај сумпорне киселине

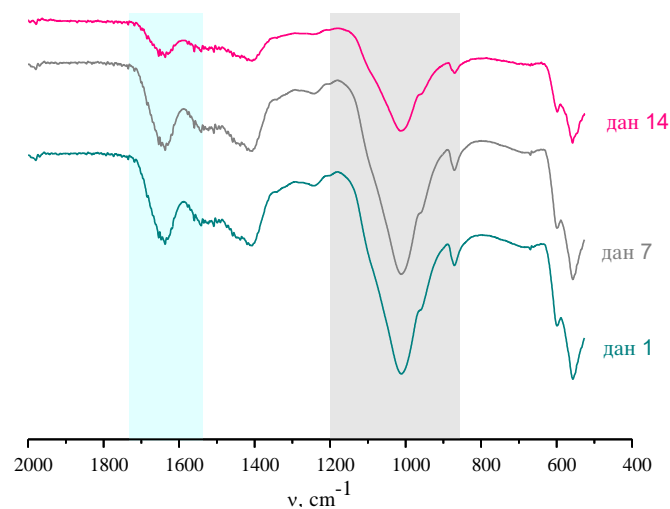
6.7.1 Анализа амид I домена

На слици 36 је приказан изглед узорка свињске кости после излагања дејству сумпорне киселине, различитих концентрација, у трајању од 1, 7 и 14 дана.

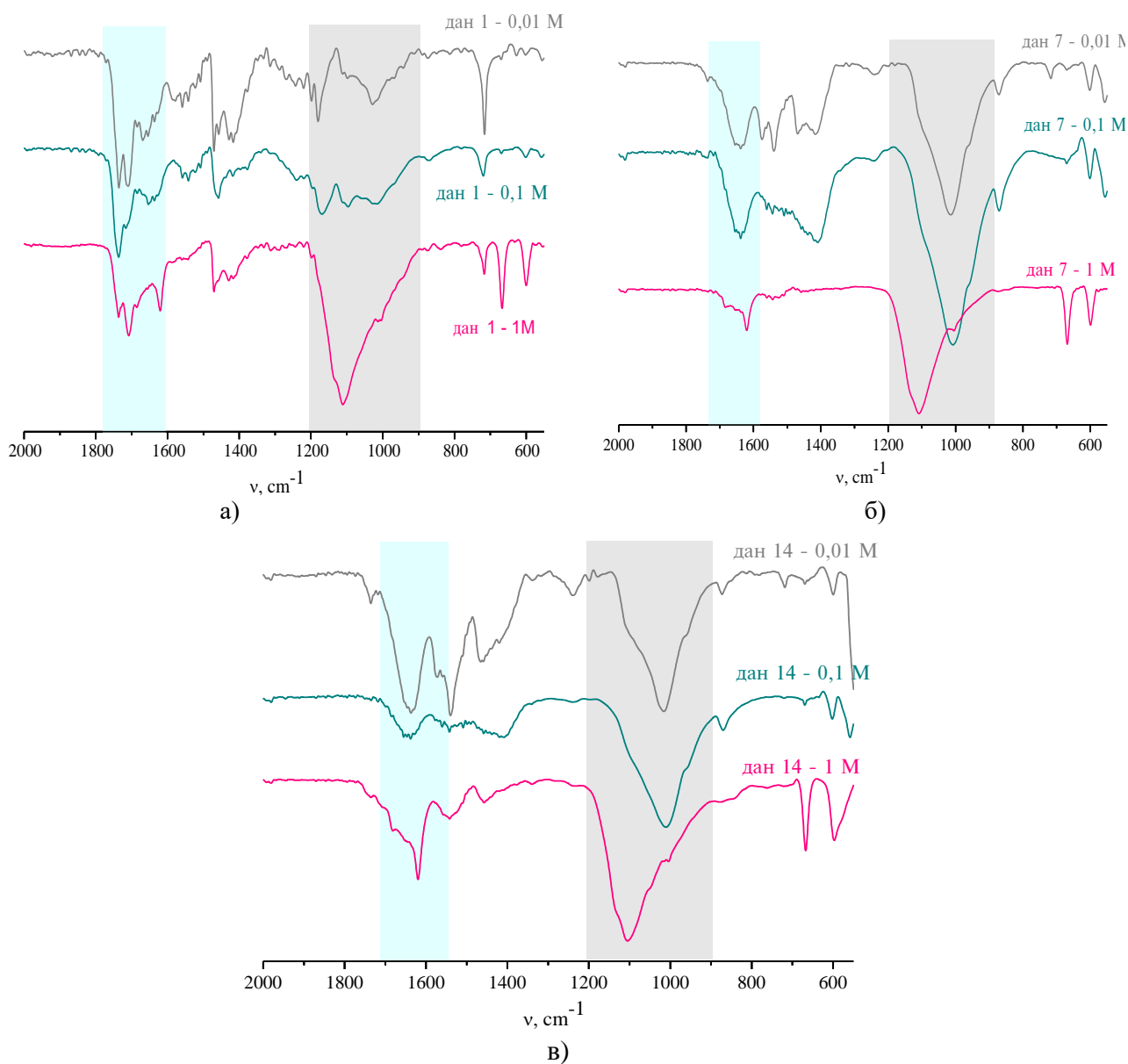


Слика 36 Изглед узорка свињске кости после излагања дејству сумпорне киселине

Трака амид I вибрације која се налази у области од $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ се, као што је већ наглашено у резултатима деловања осталих киселина, асигнира комбинацији истежућих вибрација C=O (70-85%) и C-N (10-20%) веза у пептидном скелету протеина (слике 37 и 38). Структура и положај ове траке су подложни променама услед промена у стабилности колагена, која зависи од интраланчаних сила дуж полипептидног ланца, а која се нарушава деловањем топлоте, влаге или хемикалија, укључујући киселине [112].

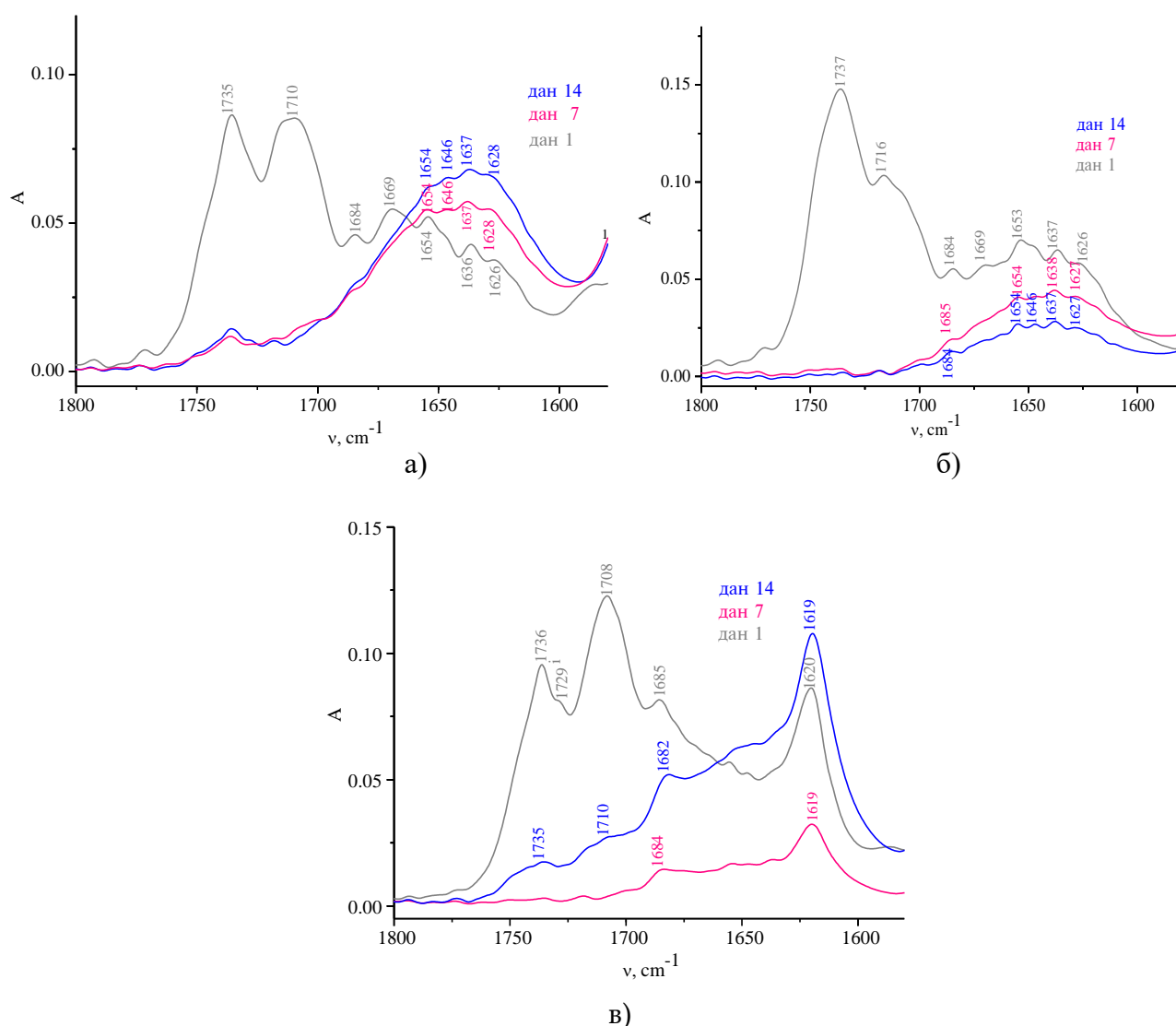


Слика 37 Упоредни приказ инфрацрвених спектра рамене кости свиње у води након периода урањања од 1, 7 и 14 дана



Слика 38 Упоредни приказ инфрацрвених спектра рамене кости свиње у сумпорној киселини (0,01; 0,1 и 1,0 М) након периода урањања од 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана

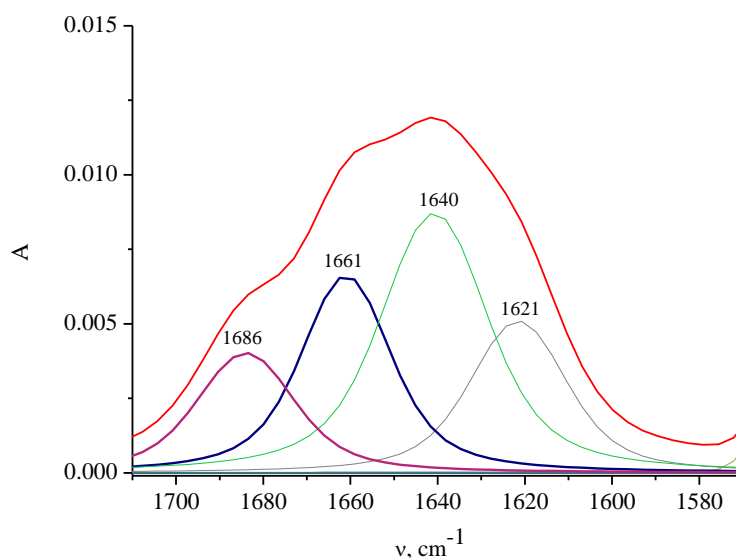
Инфрацрвени спектри референтног раствора се не мењају знатно деловањем воде, што се и види са слике 37. Деловањем сумпорне киселине мења се структура амид I траке што се тумачи као последица раскидања водоничних веза и нарушавања других нековалентних интеракција у структури колагена [112]. Значајне промене у интензитету (који је генерално веома низак, 71-93 % T), положају и структури амид I траке примећују се са повећањем концентрације и времена деловања сумпорне киселине (слика 38). У инфрацрвеним спектрима приказаним у апсорпцији (слика 39), евидентно је да је структура амид I траке веома сложена и да се чак протеже изнад 1700 cm^{-1} у свим спектрима снимљеним након прва 24 сата деловања киселине. Како се период деловања киселине продужава тако специфичности трака у области $1800\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ практично нестају или драстично опадају у интензитету што је видљиво на спектрима снимљеним седмог и четрнаестог дана.



Слика 39 Упоредни приказ $1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ области инфрацрвеног спектра кости третиране $0,01\text{ M}$ (а), $0,1\text{ M}$ (б) и $1,0\text{ M}$ (в) сумпорном киселином

Деконволуција спектра у области амида I траке (слике 40-42) показује сложу секундарну структуру матрице колагена у зависности од концентрације киселине и времена деловања. У табели 10 приказани су резултати деконволуције и асигнације подтрака у спектрима према подацима из литературе [113-117]. Као што се види из табеле 10 у наведеној области се јављају подтраке које се асигнирају вибрацијама различитих

конформационих облика секундарне структуре колагена: трострука спирала (хеликс), α -хеликс, паралелне β -плоче, неуређена структура колагена, пиридиноско умрежавање, антипаралелне β -плоче, као и траке карактеристичне за тзв. „ β -turn“ облик колагена (облик секундарне структуре колагена у коме се полипептидни ланац савија уназад на сам себе омогућавајући промену смера што је веома важно у 3D конформацији протеина) и DHLNL и HLNL умрежавање колагена. У спектрима деконволуције се јављају такође и подтраке вибрација бочних ланаца аминокиселина, бочних ланаца тирозина, аргинина и глутаминске киселине.



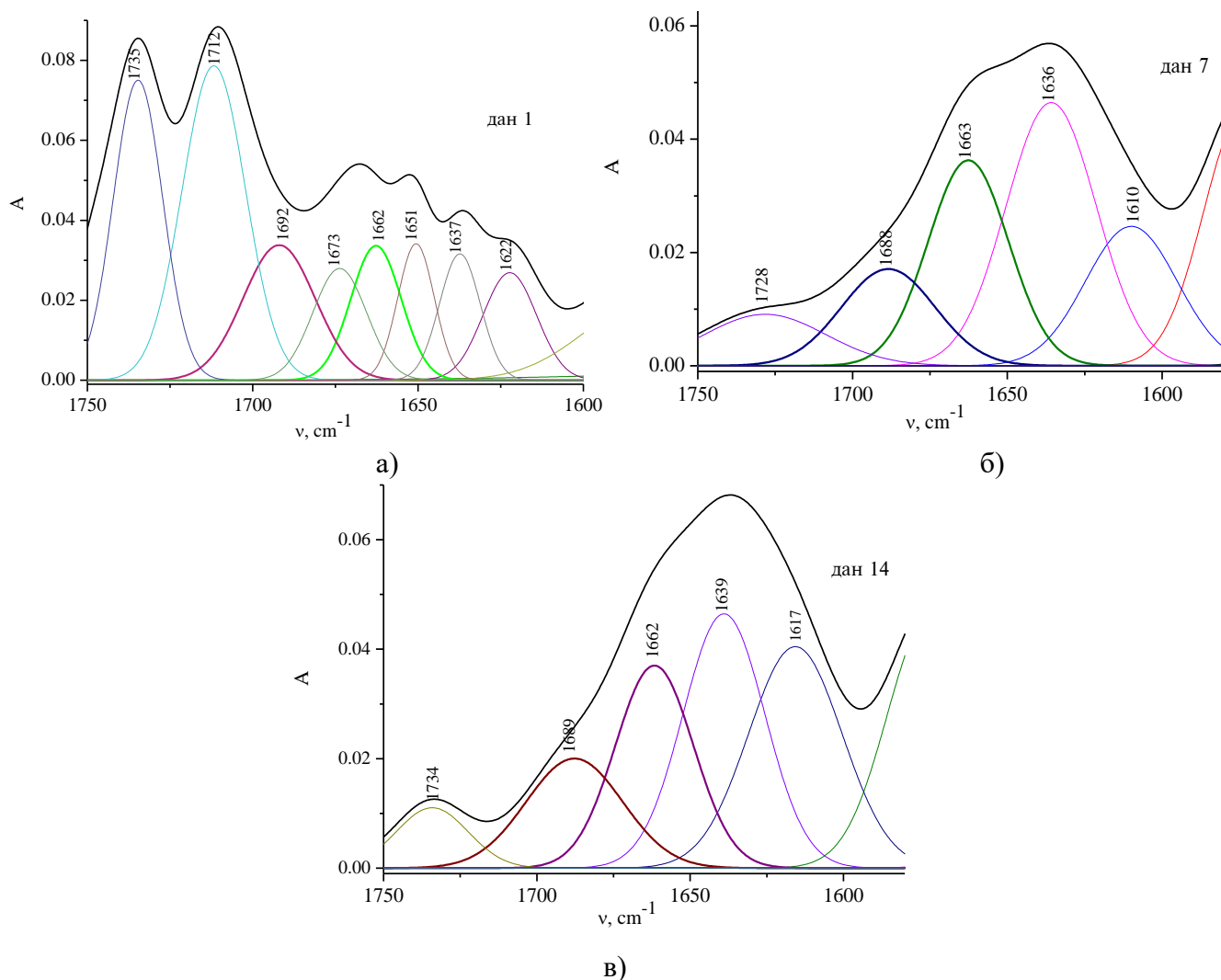
Слика 40 Спектри деконволуције у домену амид I вибрације за кост у референтном раствору ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$)

Табела 10 Резултат деконволуције вибрационих спектра свињске кости третиране сумпорном киселином у домену амид I траке ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) (0,1 и 1 М раствори)

Период потапања (дани)	Положај подтрака (cm^{-1})	Интегрална површина (%)	Асигнација подтрака [113-117]
H₂O			
1	1621	20,8	„ β -turn“
	1640	38,5	Троструки хеликс
	1661	23,1	3_{10} хеликс; пиридиноско умрежавање колагена
	1686	17,6	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
7	1621	20,2	„ β -turn“
	1640	38,0	Троструки хеликс
	1661	21,6	3_{10} хеликс; пиридиноско умрежавање колагена
	1686	20,2	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
14	1621	19,2	„ β -turn“
	1640	35,5	Троструки хеликс
	1661	20,0	3_{10} хеликс; пиридиноско умрежавање колагена

	1686	25,3	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
0,1 M H₂SO₄			
1	1619	7,8	„β-turn“
	1640	12,3	Троструки хеликс
	1662	13,0	З ₁₀ хеликс; пиролидинско умрежавање колагена
	1689	12,5	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
	1712	18,8	Бочни ланци глутаминке киселине
	1735	24,3	Карбонилна вибрација
	1748	11,3	Карбонилна вибрација
7	1601	12,7	Бочни ланац тирозина
	1619	18,1	„β-turn“
	1638	29,6	Троструки хеликс
	1660	26,1	З ₁₀ хеликс; пиролидинско умрежавање колагена
	1681	9,6	Деоксипиролидинско умрежавање колагена, паралелне β-плоче
	1699	3,9	Антипаралелне β-плоче
14	1602	12,4	Бочни ланац тирозина
	1622	20,3	„β-turn“
	1641	29,2	Троструки хеликс
	1663	24,0	З ₁₀ хеликс; пиролидинско умрежавање колагена
	1687	12,3	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
	1704	1,8	Бочни ланци глутаминке киселине
1,0 M H₂SO₄			
1	1603	4,3	Бочни ланац тирозина
	1620	9,7	„β-turn“
	1635	9,9	Троструки хеликс
	1661	15,9	З ₁₀ хеликс; пиролидинско умрежавање колагена
	1690	16,4	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
	1710	20,4	Бочни ланци глутаминке киселине
7	1737	23,4	Карбонилна вибрација
	1604	10,0	Бочни ланац тирозина
	1620	29,7	„β-turn“
	1640	20,6	Троструки хеликс
	1662	19,8	З ₁₀ хеликс; пиролидинско умрежавање колагена
	1686	12,0	DHLNL и HLNL умрежавање колагена

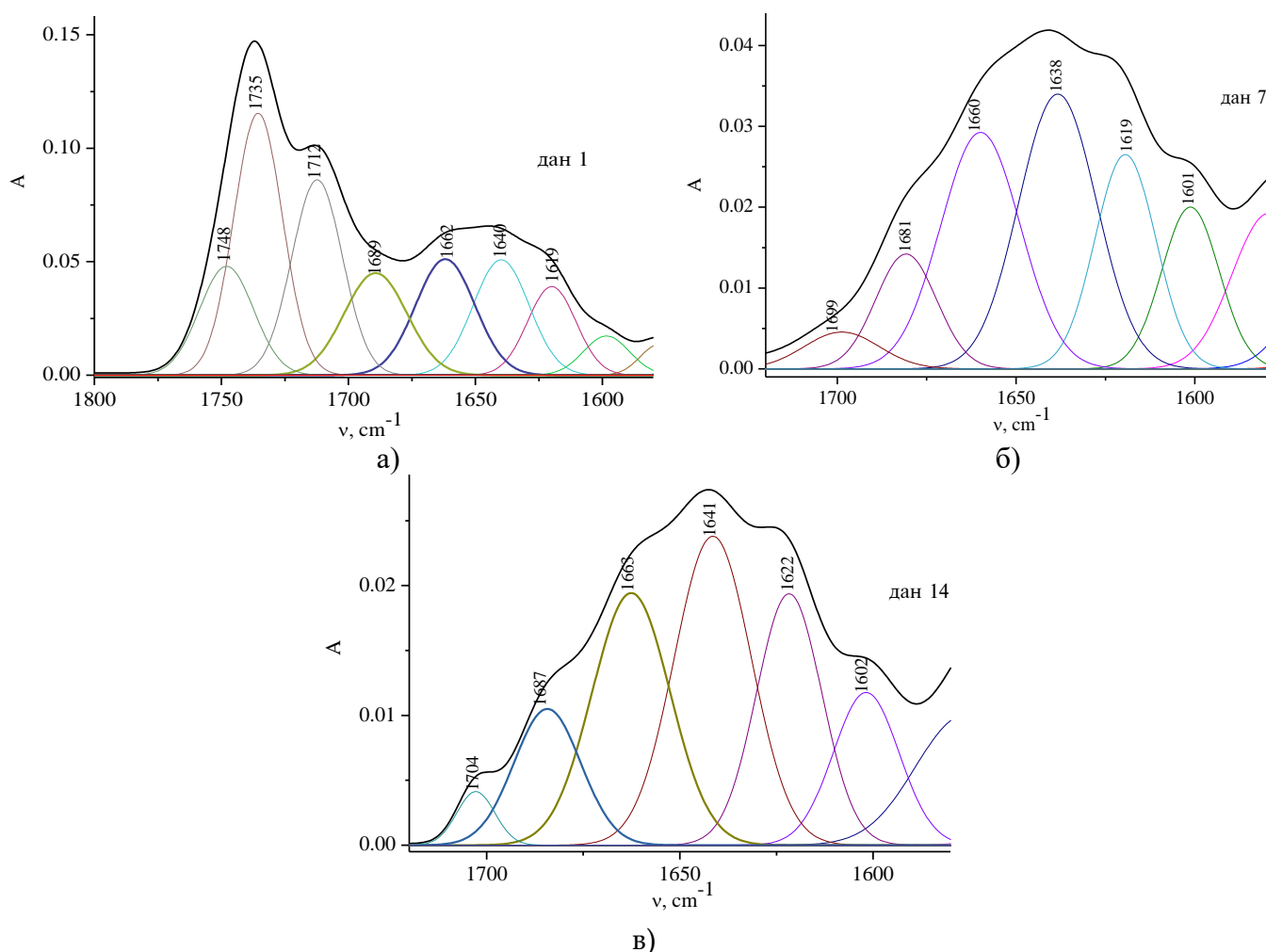
14	1710	7,9	Бочни ланци глутаминке киселине
	1602	11,2	Бочни ланац тирозина
	1620	19,7	„β-turn“
	1639	21,3	Троскруки хеликс
	1662	22,8	3 ₁₀ хеликс; пиролидинско умрежавање колагена
	1687	12,0	DHLNL и HLNL умрежавање колагена
	1710	5,6	Бочни ланци глутаминке киселине
	1735	7,4	Карбонилна вибрација



Слика 41 Спектри деконволуције у домену амид I вибрације за кост третирану 0,01 М раствором сумпорне киселине, период потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана (1750-1600 cm⁻¹)

Као што је види из табеле 10 главни облици секундарне структуре колагена остају у спектрима референтног узорка (слика 40). Благо смањење интегралних површина трака које су асигниране троскрукој спирали (~1640 cm⁻¹) и β-turn структури (~1609 и 1618 cm⁻¹), узроковано продуженим излагањем, може бити резултат хидратације и губитка структурног интегритета.

Насупрот томе, ако се посматра деловање киселине уочава се тренд повећања интегралних површина истих трака са повећањем времена урањања и концентрације сумпорне киселине. Добијени резултат наводи на закључак да се главни облик секундарне структуре колагена, троструки хеликс, очувава у некој мери насупрот одвијању деминерализације кости (слике 41-43). Очување структуре троструког хеликса, која је обележје механичких својстава колагена, имплицира да, упркос агресивном деловању сумпорне киселине примарни структурни мотив колагена, виталан за одржавање затезне чврстоће, још увек бива очуван. Ово може указати на могућност да се неке од структура троструке спирале могу под примењеним условима стабилизovati услед реорганизације или умрежавања и да би укупни механички интегритет кости могао донекле бити очуван и поред излагања киселини. Међутим, друга механичка својства, као што су чврстоћа на притисак/жилавост, не могу бити гарантована постојаношћу ових колагенских конформација. Дугорочни структурни интегритет кости и даље може бити угрожен процесом деградације, укључујући хидролизу и оксидацију изазвану сумпорном киселином, што потенцијално доводи до повећане ломљивости и смањене отпорности кости како се минералне компоненте растварају.

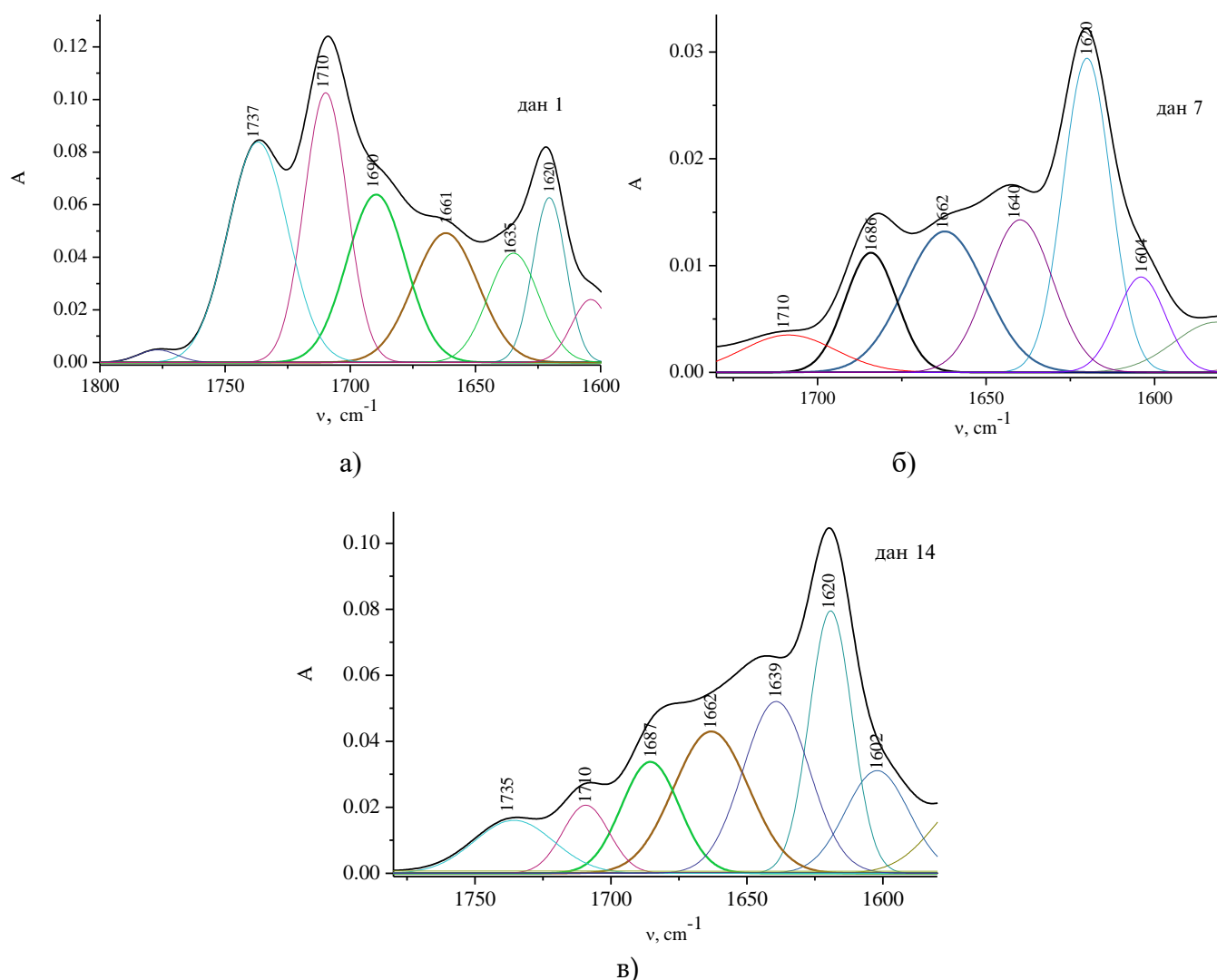


Слика 42 Спектри деконволуције у домену амид I вибрације за за кост третирану 0,1 M раствором сумпорне киселине, период потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана ($1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$)

Добијени резултати имају потенцијалне форензичке импликације јер доследно присуство одговарајућих подтрака у спекрима деконволуције, при различитим концентрацијама киселине и периодима потапања, може да укаже колико дуго су кости биле изложене таквим окружењима, и потенцијално помоћи форензичкој анализи у утврђивању

временских оквира или идентификацији специфичних третмана којима скелетни остаци могу бити подвргнути у реалним случајевима. Такође, овакви резултати би могли бити важни за тумачење стања очуваности кости и могли би помоћи у сагледавању поступака примењених на остацима.

Уопштено, деградација колагена је узрокована оксидацијом, хидролизом и денатурацијом. Сумпорна киселина као снажно хидролизујуће и оксидационо средство доводи до промена у структури колагена. Као последица оксидације колагена у спектрима деконволуције се поред подтрака које се приписују различитим облицима вибрација секундарне структуре колагена јављају и траке које се асигнирају карбонилним једињењима ($\sim 1730 - 1740 \text{ cm}^{-1}$) која настају приликом фрагментације полипептида [118,119]. Релативна површина траке која се асигнира карбонилној вибрацији у фрагментованим полипептидним ланцима је највећа током прва 24 сата деловања киселине, уколико се разматра деловање киселине на све узорке. После прва 24 сата релативна површина ове траке се смањује, што највероватније указује на даљу трансформацију формираних карбонила.

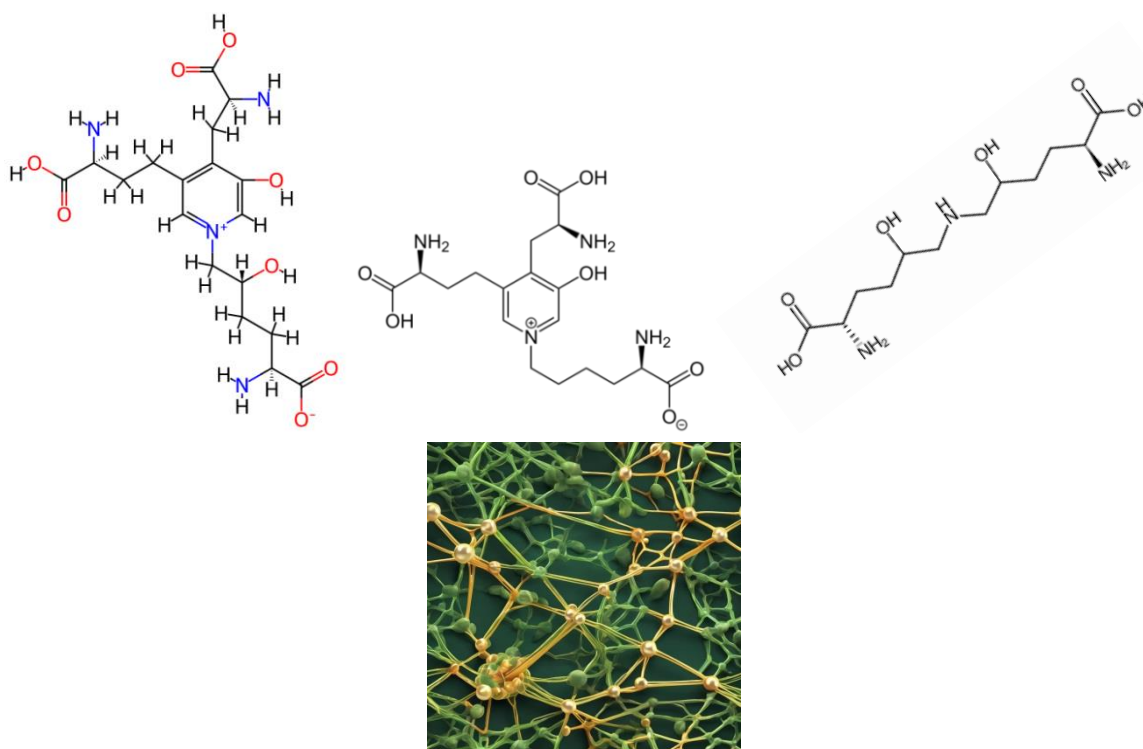


Слика 43 Спектри деконволуције у домену амид I вибрације за кост третирану 1 M раствором сумпорне киселине, период потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана ($1800-1600 \text{ cm}^{-1}$)

Анализа у домену амид I траке је фокусирана примарно на три подтраке, на око 1660, 1680 и 1690 cm^{-1} које се асигнирају умрежавању колагена што је једна од најистакнутијих карактеристика колагена типа I у минерализованом коштаном ткиву (слике 41-43) [74, 75, 120-125]. Умрежавање колагена је важно за затезну чврстоћу и вискоеластичност кости, то је кључни процес који доприноси структурном интегритету и механичким својствима ткива.

Умрежавање колагена је подложно променама изазваним старењем, одређеним болестима, укупним здрављем костију или спољним факторима као што су окружење закопаних остатака или дејство хемикалија. У контексту сазревања колагена умрежавање се може поделити на тзв. нередуцибилно (зрело) и редуцибилно (незрело) умрежавање.

Нередуцибилно, зрело, умрежавање колагена се остварује преко пиридинолина (*Pyridinoline*, Pyr) (трака на 1660 cm^{-1}) (слика 44), молекула који се формира ензимском реакцијом лизил-оксидазе у колагену током каснијих фаза синтезе и сазревања колагена. Пиридинолин олакшава ковалентно везивање колагених влакана и игра важну улогу у њиховој стабилизацији, доприносећи затезној чврстоћи и укупном интегритету ткива. Ово умрежавање се јавља у каснијим фазама сазревања колагена и оно обезбеђује стабилност и отпорност колагена на деградацију и редукцију, што га чини маркером зрелог колагена који се налази у здравим, добро зараслим ткивима. Нередуцибилна природа пиридинолина чини га корисним у клиничким испитивањима за процену интегритета ткива, процеса зарастања и разумевања различитих стања која утичу на везивно ткиво, као што су остеопороза или болести артритиса. Повишени нивои пиридинолина могу указивати на повећан промет колагена, који се може јавити у патолошким стањима или током активног ремоделирања ткива. Нередуцибилно, зрело, умрежавање колагена се може остварити и преко молекула деоксипиридинолина (*Deoxypyridinoline*, DPD) (трака на око 1681 cm^{-1}) (слика 44). То умрежавање настаје такође ензимском конверзијом колагена. Као и пиридинолин, умрежавање преко деоксипиридинолина има за поселедицу стабилна колаген отпоран на редукцију. DPD је такође важан маркер за процену интегритета и промета колагена у различитим ткивима. DPD се често се користи као биохемијски маркер у клиничким условима за процену ресорпције и обнову костију. Повишени нивои DPD-а у урину се обично користе за процену стања као што је остеопороза и обнова костију, где повећани нивоа овог молекула указује на већу деградацију колагена.



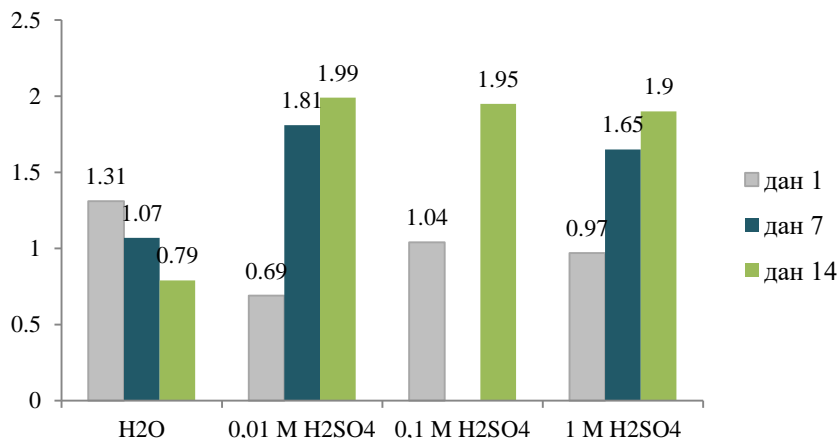
Слика 44 Структуре Pyr, DPD-а и DHLNL-а (горе, с лева на десно) и приказ умрежавања колагенских влакана (доле)

Редуцибилно, незрело, умрежавање је карактеристично за незрели (рана фаза развоја колагена) или новосинтетисани колаген. Овако формиране везе између молекула колагена

су подложније редукцији хемијским агенсима и указују на процесе ремоделовања унутар ткива. Овај тип умрежавања се остварује, између осталог, преко дихидроксинорлеуцина (*Dihydroxynorleucine*, DHLNL) (трака на 1690 cm^{-1}) (слика 44), који такође настаје ензимском конверзијом колагена. Као и други молекули који учествују у умрежавању колагенских влакана и DHLNL игра улогу у стабилизацији структуре колагена, доприносећи затезној чврстоћи и укупном интегритету везивног ткива. Повећани ниво DHLNL може указивати на активну синтезу колагена, која се може јавити у различитим физиолошким и патолошким стањима, као што су процеси зарастања, развој ткива или као одговор на одређене болести. Разумевање равнотеже између нередуцибилног и редуцибилног умрежавања је важно за процену здравља ткива, старења и динамике колагених ткива у различитим клиничким контекстима [74, 75, 120-125].

Однос површина трака које се асигнирају зрелом и незрелом колагену се назива маркером зрелости колагена (СММ, *Collagen Maturity Marker*) и повезан је са умрежавањем колагених влакана. Из табеле 10 и са слике 41 се види да постоји растући тренд у вредностима интегралне површине подтрака које се асигнирају зрелом колагену док површина подтрака које се асигнирају незрелом колагену остаје скоро непромењена (између 12,0-12,6%). Важно је напоменути да је у 0,1 М раствору након 7 дана потапања присутна трака која се асигнира умрежавању преко деоксиридинолина, DPD-а, (1681 cm^{-1}), за разлику од других раствора. DPD је такође молекул преко кога се врши специфичан вид умрежавања колагена током његовог процеса сазревања.

На слици 45 приказане су вредности СММ маркера кости третиране сумпорном киселином израчунате као однос интегралних површина подтрака на 1660 и 1690 cm^{-1} . У референтним узорцима како се време урањања продужава, вредност СММ се смањује што се може објаснити почетном хидратацијом и бубрењем колагена услед чега може да се промени размак између колагених влакана што утиче на структуру и стабилност унакрсних веза.



Слика 45 Вредности маркера зрелости колагена кости третиране сумпорном киселином, израчунате као однос интегралних површина подтрака на 1660 и 1690 cm^{-1}

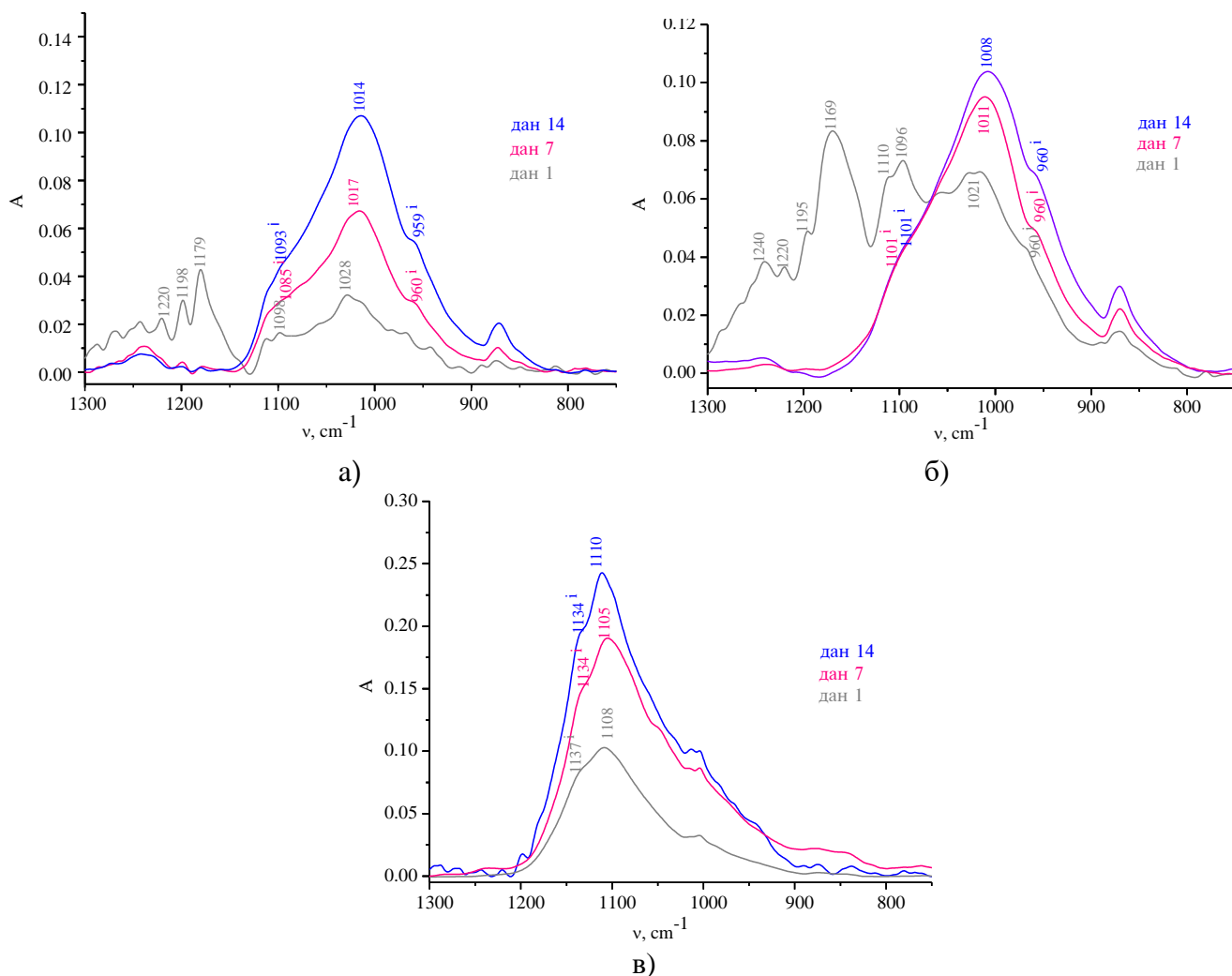
Ако се посматра дејство киселине види се да се за сваку концентрацију са продужењем деловања повећава удео зрелог умрежавања дајући слику „старења кости“. Могуће објашњење оваквог резултата би могао бити распад неколагенских протеина који могу инхибирати унакрсно повезивање колагенских влакана. Како се концентрација сумпорне киселине повећава и време излагања продужава, уклањање неколагенских компоненти је веће што може довести до повећаног умрежавања унутар, сада „чистијих“, молекула колагена. Продужењем деловања киселине омогућава се опсежнија реорганизација колагених влакана. Коначно, повећање индекса зрелости колагена у овим условима указује на трансформацију ка отпорнијој и структуриранијој мрежи колагена.

Генерално, тренд раста вредности СММ маркера је аспект ремоделирања кости у условима *in vivo*, где је већи удео зрихих унакрних веза уопштено карактеристичан за старије кости, под утицајем већ поменутих фактора, што је такође у сагласности и са биохемијским анализама [112]. Ипак, важно је разумети да су ове промене првенствено резултат деловања јаке киселине а не природне динамике ремоделирања кости која се види у физиолошким или патолошким условима и типичног биолошког старења. Ако се анализирају појединачни дани, вредности СММ маркера се мењају између 5 и 30 % са повећањем концентрације киселине и крећу се од 0,69-1,04 (1. дан), 1,81-1,65 (7. дан) до 1,90-1,99 (14. дан). Резултат указује да је ефикасност киселине израженија у концентрованијим растворима [120].

6.7.2 Анализа $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домена

Као што је већ речено, динамичка природа апатитних кристала се огледа у структури, интензитету и облику траке који се асигнира комбинацији два вибрациона облика, $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$. Трака асигнирана $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ облику у области од $1300-900 \text{ cm}^{-1}$ (слике 37 и 38) је широка и интензивна, што указује на сложену структуру састављену од више подтрака. Интензитет траке варира између 78-92 %Т (0,01 М), 78-85 %Т (0,1 М) и 57-78 %Т (1 М).

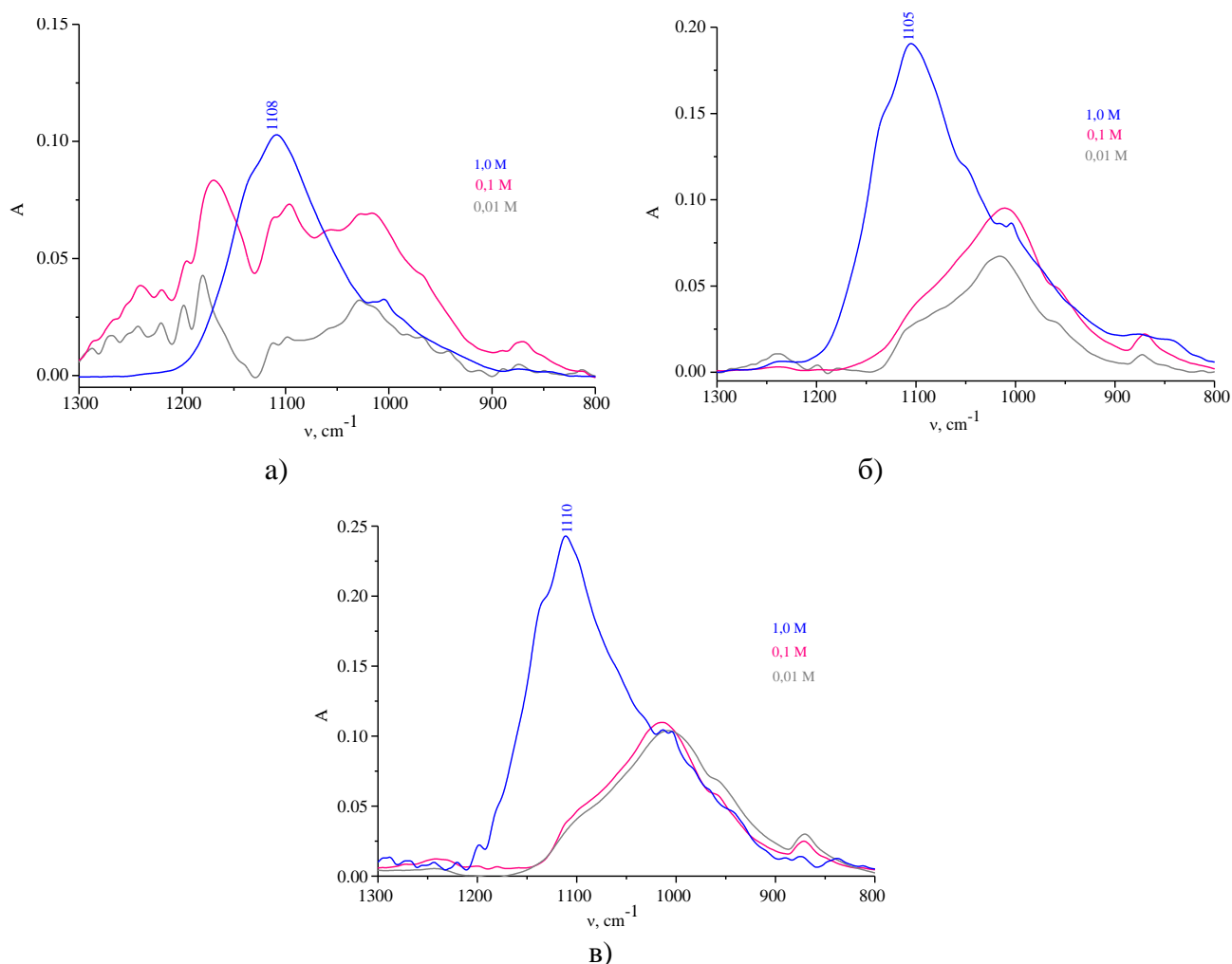
У инфрацрвеним спектрима референтног узорка (слика 37) нема значајних промена у структури и положају трака, већ само смањење интензитета током времена.



Слика 46 Упоредни приказ $1300-900 \text{ cm}^{-1}$ области инфрацрвеног спектра свињске кости третиране 0,01 М (а), 0,1 М (б) и 1,0 М (в) сумпорном киселином

Инфрацрвени спектри представљени у апсорпцији (слике 46 и 47) показују да трака $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације подлеже значајним променама у интензитету, структури и положају са повећањем концентрације киселине. Повећањем концентрације киселине за сваки период урањања (1, 7 и 14 дана) трака подлеже значајном помаку ка вишим енергијама, до 102 cm^{-1} , и значајном повећању интензитета. Током првог дана деловања киселине у спектрима 0,01 и 0,1 M раствора трака $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације је изузетно широка и протеже се изнад 1200 cm^{-1} . Са повећањем концентрације киселине интензитет траке се повећава а траке изнад 1200 cm^{-1} , карактеристичне за амид III вибрације, нестају.

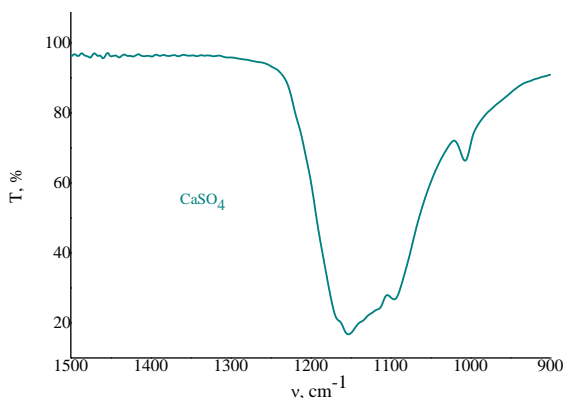
Како се време деловања киселине продужава (7 и 14 дана) трака PO_4^{3-} вибрације у спектрима 0,01 и 0,1 M раствора остаје и даље широка али промењеног облика и структуре (слике 47б, и 47в) у поређењу са спектрима раствора након 24 сата (слика 47а). Такође, после дужег излагања, 7 и 14 дана, интензитет траке се значајно повећава са повећањем концентрације киселине. Значајно повећање интензитета траке $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ фосфатне вибрације свакако може бити резултат формирања калцијум-сулфата (подручје између 1100 и 1150 cm^{-1} је карактеристично за вибрације сулфатне групе у калцијум-сулфату, слика 48), што је потврђено и ААС анализом.



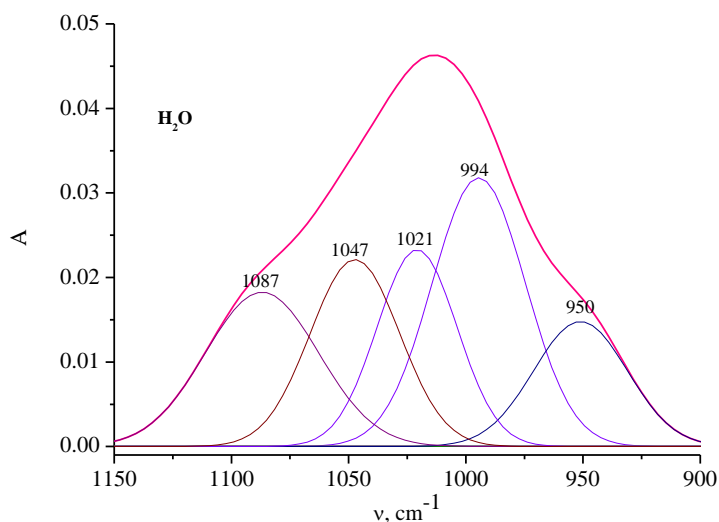
Слика 47 Упоредни приказ $1300\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ области инфрацрвеног спектра свињске кости третиране сумпорном киселином различитих концентрација, време потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана

Табела 11 и слике 49-51 приказују резултате деконволуције спектра у области вибрација фосфатне групе, од $1300\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$. И у овом случају је након деконволуције идентификовано више подтрака које су асигниране одређеним вибрационим облицима,

ортофосфатном јону, $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домену стехиометријског апатита, нестехиометријском апатиту са примесама ваканција и/или група као што су HPO_4^{2-} и CO_3^{2-} , $\nu_3(\text{T}_2)$ вибрационим облицима апатита, и др [48-50, 52, 53].



Слика 48 Инфрацрвени спектар калцијум-сулфата



Слика 49 Спектри деконволуције у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације за кост у референтном раствору ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)

Табела 11 Резултат деконволуције вибрационих спектра свињске кости у сумпорној киселини, у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрација фосфатне групе ($1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)

Период потапања (дани)	Положај подтрака (cm^{-1})	Интегрална површина (%)	Асигнација подтрака [48, 49, 50, 52, 53]
H₂O			
1	951	13,5	$\text{HPO}_4^{2-} - \text{PO}$ симетрична истежућа
	994	28,9	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ у апатитском окружењу
	1021	18,2	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
	1046	19,3	апатит са типом Бе карбоната, хидроксиапатит

	1087	20,1	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен у стехиометријском апатиту
	953	25,8	$\text{HPO}_4^{2-} - \text{PO}$ симетрична истежућа
	994	20,3	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ у апатитском окружењу
7	1022	24,9	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
	1055	17,1	$\nu_3(\text{T}_2)$ облик апатита
	1093	11,9	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен у стехиометријском апатиту
	953	26,1	$\text{HPO}_4^{2-} - \text{PO}$ симетрична истежућа
	993	19,7	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ у апатитском окружењу
14	1021	26,5	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
	1053	15,3	$\nu_3(\text{T}_2)$ облик апатита
	1089	12,4	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домен у стехиометријском апатиту
0,01 M H₂SO₄			
	943	1,6	$\text{HPO}_4^{2-} - \text{PO}$ симетрична истежућа
	965	4,0	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ симетрична истежућа
	987	4,8	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
	1007	8,3	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ асиметрична истежућа
	1029	13,3	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту
	1054	9,2	$\nu_3(\text{T}_2)$ облик апатита
	1079	4,2	$\nu_3(\text{T}_2)$ облик апатита
1	1098	4,5	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту
	1114	1,8	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ слабо кристалан апатит
	1163	6,7	*
	1180	10,8	*
	1198	7,3	*
	1224	7,6	*
	1246	8,8	*
	1269	5,0	*
	1289	2,8	*
	935	4,0	$\text{HPO}_4^{2-} - \text{PO}$ симетрична истежућа
7	961	11,4	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ симетрична истежућа

	993	18,2	$\nu_1(PO_4^{3-})$ у апатитском окружењу	
	1020	26,5	$\nu_3(PO_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}	
	1050	18,3	$\nu_3(T_2)$ облик апатита	
	1078	10,7	$\nu_3(T_2)$ облик апатита	
	1105	10,9	$\nu_3(PO_4^{3-})$ слабо кристалан апатит	
14	937	5,4	$HPO_4^{2-} - PO$ симетрична истежућа	
	965	11,4	$\nu_1(PO_4^{3-})$ симетрична истежућа	
	995	19,6	PO_4^{3-} у апатитском окружењу	
	1021	23,0	$\nu_3(PO_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}	
	1049	15,6	$\nu_3(T_2)$ облик апатита	
	1078	12,6	$\nu_3(T_2)$ облик апатита	
	1107	7,1	$\nu_3(PO_4^{3-})$ слабо кристалан апатит	
	1160	5,3	*	
	0,1 M H₂SO₄			
		921	2,6	$HPO_4^{2-} - PO$ симетрична истежућа
	961	7,4	$\nu_1(PO_4^{3-})$ симетрична истежућа	
	991	7,6	PO_4^{3-} у апатитском окружењу	
	1020	12,7	$\nu_3(PO_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}	
1	1055	11,7	$\nu_3(T_2)$ облик апатита	
	1089	10,8	$\nu_3(PO_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту	
	1113	8,2	*	
	1146	10,3	*	
	1173	10,5	*	
	1196	5,5	*	
	1221	4,1	*	
	1244	4,6	*	
	1266	2,5	*	
	1287	1,5	*	
7	920	7,1	$HPO_4^{2-} - PO$ симетрична истежућа	
	958	13,5	$\nu_1(PO_4^{3-})$ симетрична истежућа	
	994	21,7	PO_4^{3-} у апатитском окружењу	

		$\nu_3(PO_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
	1021	18,8
	1051	18,3
	1086	14,7
	1119	4,3
	1155	1,6
	921	9,2
	958	15,4
	991	22,4
14	1021	23,1
	1057	17,0
	1097	10,9
	1130	2,0
	1,0 M H₂SO₄	
	921	2,0
	965	5,0
	996	5,4
1	1021	7,8
	1053	12,8
	1086	21,0
	1110	20,4
	1136	18,3
	1164	7,3
7	921	3,9
	960	6,4
	993	7,8
	1021	10,7

	1056	16,4	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
	1089	21,8	$\nu_3(PO_4^{3-})$ у стехиометријском апатиту
	1114	14,8	$\nu_3(PO_4^{3-})$ слабо кристалан апатит
	1139	12,5	*
	1164	5,7	*
	930	1,9	$HPO_4^{2-} - PO$ симетрична истежућа
	961	5,9	$\nu_1(PO_4^{3-})$ симетрична истежућа
	994	9,9	PO_4^{3-} у апатитском окружењу
	1022	8,5	$\nu_3(PO_4^{3-})$ домен, нестехиом. апатит са примесама ваканција, HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-}
14	1053	11,6	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
	1081	15,0	$\nu_3(T_2)$ облик апатита
	1109	26,9	$\nu_3(PO_4^{3-})$ слабо кристалан апатит
	1136	13,3	*
	1160	7,0	*

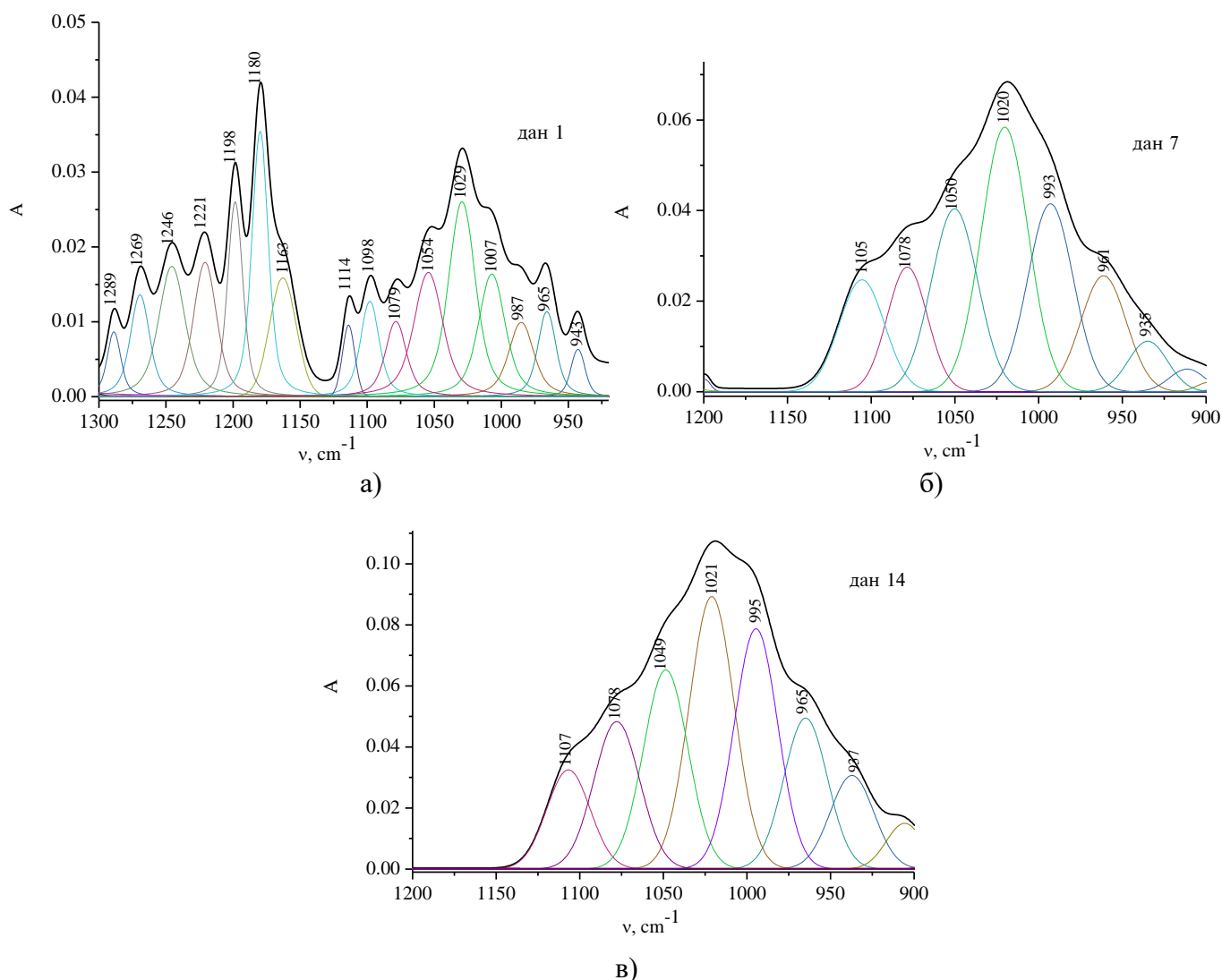
* траке изнад 1110 cm^{-1} не могу се недвосмислено приписати вибрацијама фосфатне групе због сулфатне траке (калцијум-сулфат настао као резултат растварања фосфата) која се такође појављују у истој области спектра

Спектром деконволуције узорка у референтном раствору (табела 11, слика 49) доминирају подтраке које се асигнирају $HPO_4^{2-} - PO$ симетричној вибрацији фосфатне групе, $\nu_1(PO_4^{3-})$ облику у апатитском /неапатитском окружењу, нестехиометријском хидроксиапатиту који садржи ваканције, и/или групе типа HPO_4^{2-}/CO_3^{2-} , хидроксиапатиту супституисаном карбонатом Бе, и $\nu_3(T_2)$ вибрационом облику апатита. Највећу интегралну површину има трака која припада $\nu_1(PO_4^{3-})$ вибрацији фосфата у апатитском окружењу која се полако смањује са временом излагања (28,9; 20,3; и 19,7 % редом). Са друге стране интегралне површине трака асигнираних $HPO_4^{2-} - PO$ и нестехиометријском хидроксиапатиту који садржи ваканције, и/или групе типа HPO_4^{2-}/CO_3^{2-} , се повећавају са временом излагања (13,5, 25,8 и 26,1; и 18,2, 269,5, редом). Како се минерална фаза кости мења излагањем киселини то нестехиометријски хидроксиапатит, који у својој структури има ваканције или дефекте, може да прими јоне као што су HPO_4^{2-}/CO_3^{2-} . Уградња ових јона може допринети интензитету FT-IR трака повезаних са овим врстама.

Спектри деконволуције кости у 0,01, 0,1 М и 1 М растворима сумпорне киселине, после 24 сата третмана, су веома сложени, са вишеструким подтракама који се протежу чак до области амид III вибрације (1300-1200 cm^{-1}) (табела 11, слике 50-52). Интегрална површина траке која се асигнира $\nu_1(PO_4^{3-})$ симетричној истежућој вибрацији варира између 5,0-14,4 % и нешто је нижа у концентрованијим растворима (1 М) (Табела 11). Трака асигнирана $\nu_3(PO_4^{3-})$ вибрацији ($\sim 1030 cm^{-1}$) у добро кристализованим стехиометријским апатитима присутна је само у спектру деконволуције 0,01 М раствора киселине након 24 сата потапања. Ова трака се са продуженим деловањем киселине помера на око 1020 cm^{-1} што указује на трансформацију у нестехиометријски апатит са примесама ваканција, су HPO_4^{2-} и/или CO_3^{2-} . У спектрима деконволуције 0,01 М (7. и 14. дан) и 0,1 М (од 1. до 14. дана) раствора сумпорне киселине (табела 11, слике 50 и 51) трака на $\sim 1020 cm^{-1}$ је

најинтензивнији са интегралном површином између 12,7- 26,5 %. У спектрима раствора 0,01 и 0,1 М сумпорне киселине, траке асигниране $\nu_3(\Gamma_2)$ вибрационим облицима апатита су такође релативно интензивне (табела 11, слике 50 и 51).

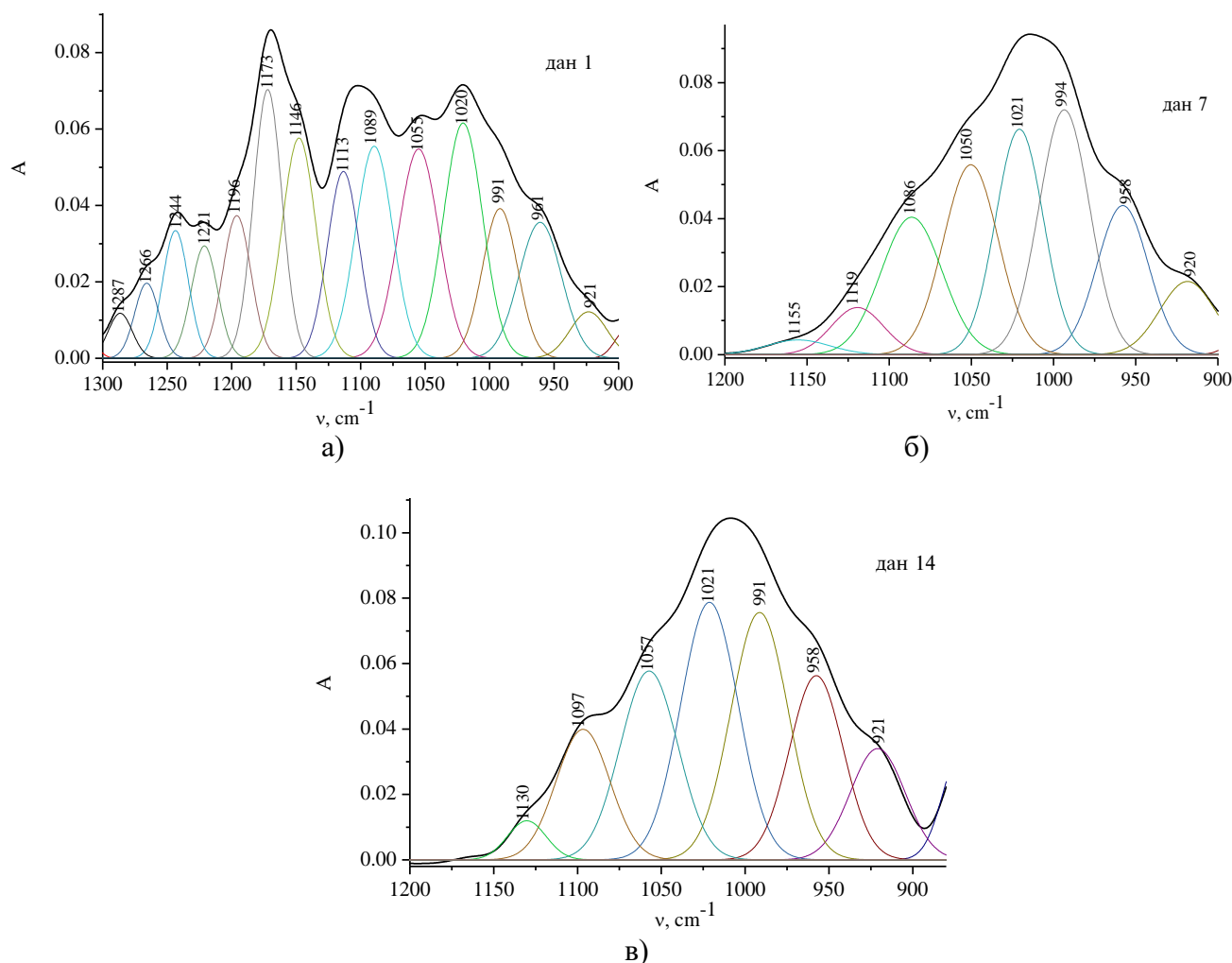
У 1М растворима (слика 52), посматрано за све временске интервале дејства киселине, трака асигнирана нестехиометријском облику апатита ($\sim 1020 \text{ cm}^{-1}$) има интегралну површину између 7,8-10,7 %, што је мање у поређењу са површином исте траке у спектрима деконволуције 0,01 и 0,1 М раствора сумпорне киселине. Траке асигниране $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домену у стехиометријским апатитима ($\sim 1090 \text{ cm}^{-1}$, интегрална површина између 21,0-21,8%) и $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ домену у слабо кристалним апатитима ($\sim 1110 \text{ cm}^{-1}$, интегрална површине између 14,8-26,9 %) постају интензивније у односу на исте траке у 0,01 (4,5% и 1,8-10,9 % редом) и 0,1 М растворима сумпорне киселине (10,8-14,7% и 4,3-8,2 редом) [50,51].



Слика 50 Спектри деконволуције у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације за кост у 0,01 М раствору сумпорне киселине, период потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана ($1300\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$)

Важно је напоменути да се квантитативни параметри, као мера хемијски изазваних промена у кости, као што је однос минерал-матрикс, не могу израчунати из инфрацрвених спектра због сложености траке амида I вибрације, постојеће фрагментације полипептида и преклапање фосфатних и сулфатних трака (услед формираног калцијум-сулфата), па чак и преклапања са траком амид III вибрације.

Сложеност амид I домена у инфрацрвеним спектрима је главни фактор који утиче на поузданост израчунавања квантитативних параметара као што је минерал-матрикс. Амид I трака, која представља комбинацију истежуће C=O вибрације пептидних веза унутар колагена, јавља се на око 1650 cm^{-1} . Међутим, потенцијална преклапања, која потичу од

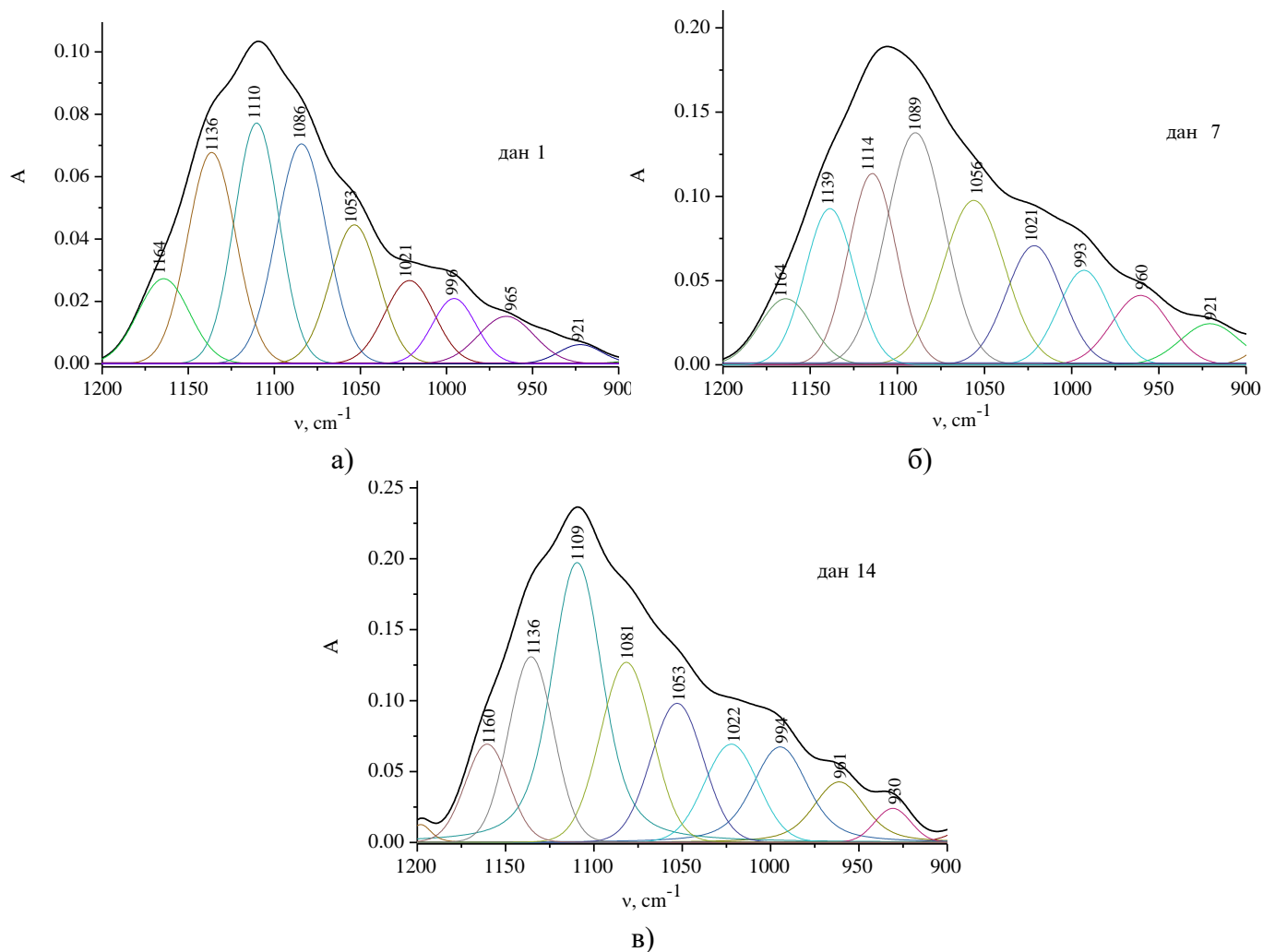


Слика 51 Спектри деконволуције у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације за кост у 0,1 М раствору сумпорне киселине, период потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана ($1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)

фрагментације полипептида, преклапања фосфатних и сулфатних трака, и интерференције у опсегу амид III траке (ова трака, која се јавља у опсегу од $1230\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$, такође може да се делимично преклапа са тракама фосфата и сулфата) могу „замагли“ траку амид I вибрације што отежава изоловање доприноса самог колагена датој траци од доприноса хидроксиапатита или других минерала који могу бити измењени током третмана киселином. Фрагментација колагенских полипептида доводи до формирања краћих ланаца пептида који могу у спектрима дати нове траке, померити или проширити постојеће, и то све у домену амид I вибрације што отежава разликовање доприноса самог колагена у односу на разложене фрагменте. Присуство различитог степена фрагментације колагена такође може променити интензитет траке амид I вибрације што додатно компликује одређивање односа минерал-матрикс. Поред тога, третирање кости сумпорном киселином изазива формирање калцијум-сулфата који може увести додатне траке у инфрацрвени спектар. Са друге стране сложена трака фосфата, која се јавља у области од $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ и повезана је са структуром хидроксиапатита, се такође преклапа са траком сулфатних јона који настају третирањем киселином. Преклапање ових трака чини прецизну квантификацију фосфата, који се приписује садржају минералне матрице кости, веома тешком а тиме и одређивање односа

минерал-матрикс. Без јасно дефинисаних граница између трака у наведеним областима тешко је изоловати појединачне доприносе из минералних фаза и поуздано проценити однос минерал-матрикс.

Присуство вишеструких преклапајућих трака умањује препознатљивост сваког опсега појединачно и отежава прецизно одређивање њиховог доприноса јер свака промена у одређеном саставу кости (минералне или органске фазе) која се осликава на структуру спектра може утицати на интензитет или положај других, што доводи до потенцијалних нетачности у квантитативним израчунавањима.



Слика 52 Спектри деконволуције у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације за кост у 1 М раствору сумпорне киселине, период потапања 1 (а), 7 (б) и 14 (в) дана ($1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)

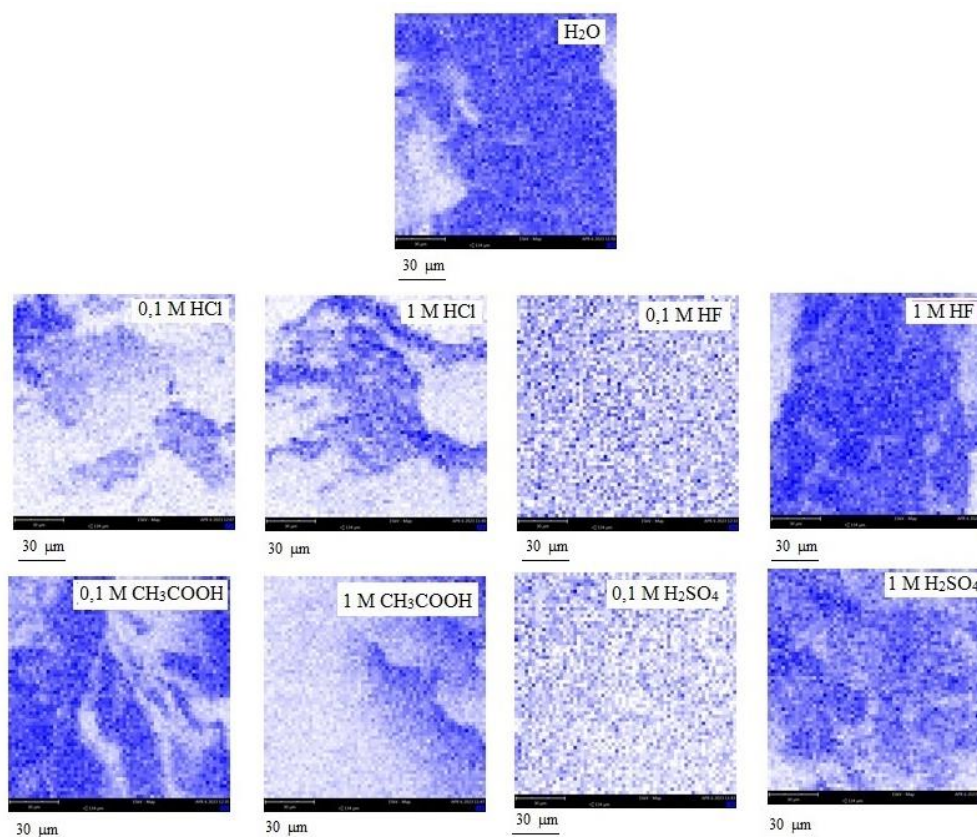
6.8 Анализа површине кости применом SEM-EDX методе

SEM-EDX анализа је извршена са циљем анализе морфологије и хемијског састава површине узорака костију након третмана испитиваним киселина. Радом са детектором за енергетски дисперзиону спектроскопију је истовремено добијен хемијски састав површине, а одговарајућим подешавањем детектора тако да реагује на одређену таласну дужину одређеног елемента, формирана је, на основу интензитета емисије карактеристичног X-зрачења добијеног из тачака на површини, слика расподеле одговарајућег елемента по испитиваним по површинама. Атомске фракције калцијума, угљеника и фосфора у овим узорцима приказане су у табели 12.

Атомске фракције наведених елемената за референтни узорак у води су 11,3; 26,6 и 5,5, редом. Након потапања у киселине примећене су значајне промене атомских фракција наведених елемената. На сликама 53-55 приказане су EDX мапе садржаја атомског калцијума, фосфора и угљеника у испитиваним узорцима. На слици 56 приказане су SEM слике узорака свињске рамене кости третиране испитиваним киселинама.

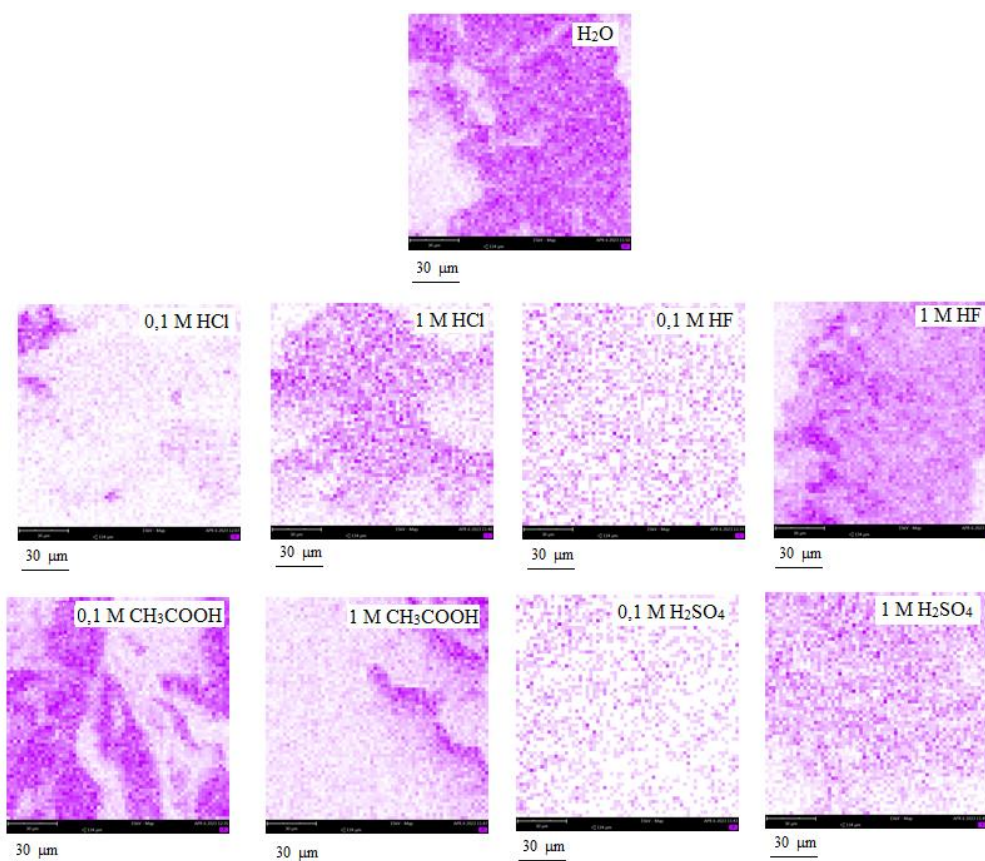
Табела 12 Атомски садржај калцијума, угљеника и фосфора у узорцима кости третиране хлороводоничном, флуороводоничном, сирћетном и сумпорном киселином

Елемент	Атомска фракција				
	H ₂ O	HCl 0,1 M/1 M	HF 0,1 M/1 M	CH ₃ COOH 0,1 M/1 M	H ₂ SO ₄ 0,1M/1M
Са	11,3	0,9/0,4	3,6/7,1	8,9/11,2	2,6/3,4
С	26,6	50,4/45,5	43,0/21,8	27,6/24,7	35,2/36,7
Р	5,5	0,5/0,3	1,4/3,5	4,4/4,4	0,6/0,2

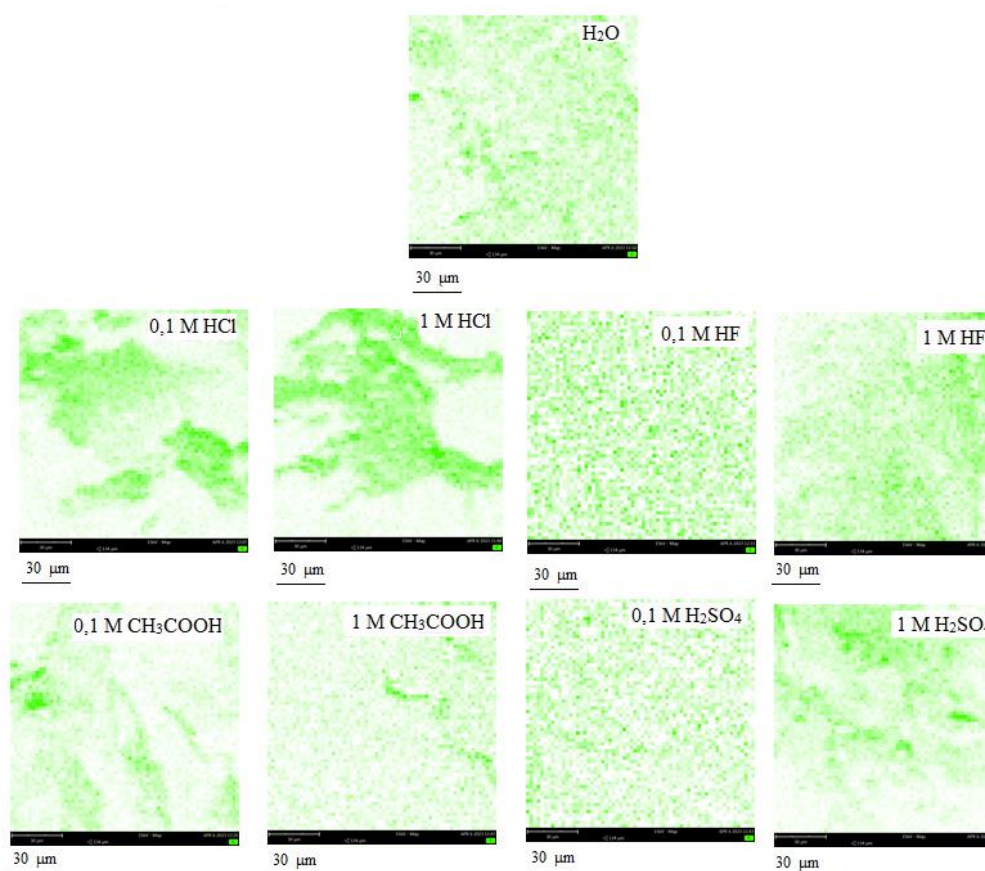


Слика 53 EDX мапа садржаја атомског калцијума у испитиваним узорцима

Најочигледнија промена се уочава на узорку кости третираном хлороводоничном киселином, коју прати значајно смањење калцијума (0,9/0,4) и фосфора (0,5/0,3) са порастом концентрације киселине (табела 12, слике 53-55). Овакав резултат указује на велику деминерализациону моћ хлороводоничне киселине. Може се претпоставити да јача киселина олакшава растварање хидроксиапатита, што доводи до губитка и калцијума и фосфора из коштане матрице. Наведене промене су у сагласности са резултатима који су добијени анализом инфрацрвених спектра. Смањене атомске фракције калцијума и фосфора могу



Слика 54 EDX мапа садржаја атомског фосфора у испитиваним узорцима



Слика 55 EDX мапа садржаја атомског угљеника у испитиваним узорцима

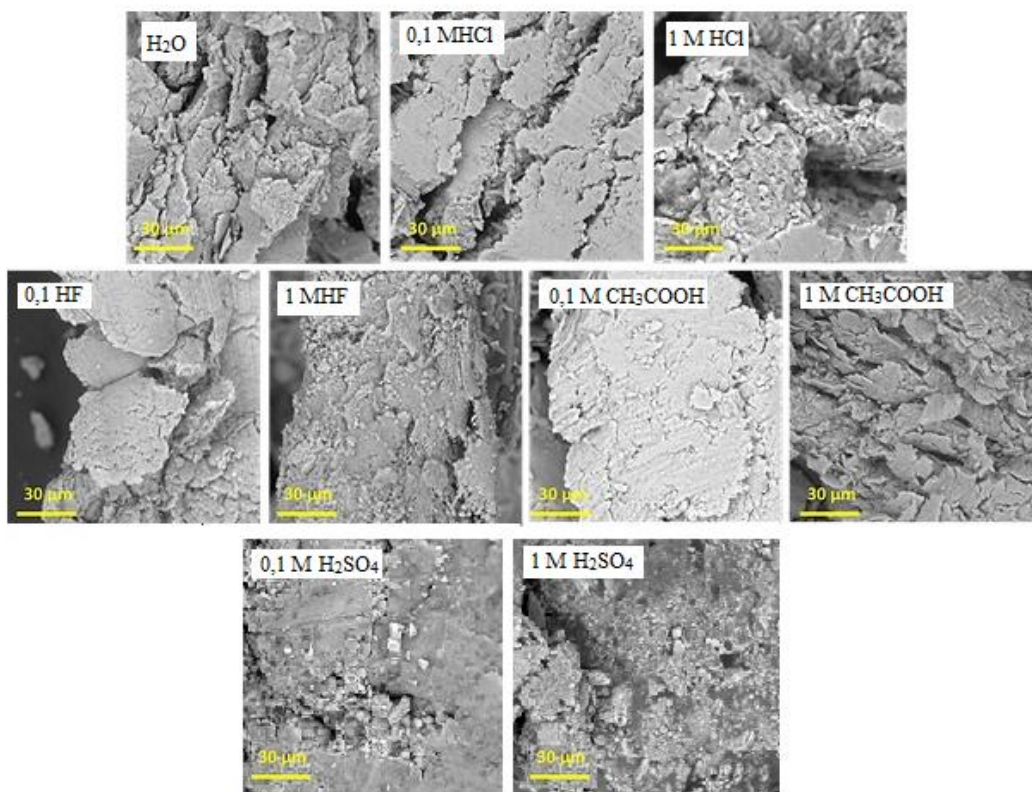
одражавати ресорпцију костију или деградацију, растварање минерала, пре свега хидроксиапатита, у условима ниског рН што нарушава интегритет кости. Мали пад садржаја угљеника под деловањем хлороводоничне киселине (50,4/45,5) указује да се третманом растварају обе фазе коштане матрице, и неорганска и органска коју чине колаген и липиди. Добијени резултати указују на важност рН нивоа у одржавању интегритета костију из разлога што више концентрације киселине могу довести до значајне ресорпције или деградације кости, утичући на укупну снагу и здравље коштаног ткива.

У случају флуороводоничне киселине садржај калцијума и фосфора расте са повећањем концентрације киселине (3,6/7,1 и 1,4/3,5 редом). Деловањем флуороводоничне киселине се такође види највећа промена у садржају угљеника где се са повећањем концентрације киселине садржај угљеника смањује два пута (43,0/21,8) (табела 12, слике 53-55). Смањење садржаја угљеника уз повећање садржаја калцијума и фосфора сугерише да се третманом киселином смањено садржај органске компоненте, као што су колаген и липиди, који се првенствено састоје од угљеника. Како се ове органске материје растварају, неорганска минерална фаза, која се углавном састоји од хидроксиапатита, постаје доминантнија. Наведене промене у садржају неорганске фазе су такође у сагласности са резултатима који су добијени анализом инфрацрвених спектра у области апсорпције фосфатне групе.

Деловање сирћетне киселине се одваја у односу на друге испитиване киселине. Сирћетна киселина као веома слаба не доводи до значајних промена у атомским фракцијама испитиваних елемената, угљеника, калцијума и фосфора (27,6/24,7; 8,9/11,2 и 4,4/4,4 редом), при чему је њихова концентрација веома слична концентрацији у узорку кости који је стајао у води (табела 12, слике 53-55). Овакво деловање сирћетне киселине наводи на закључак да третман не мења ефикасно минерални или органски састав коштане матрице. Ова, условно речено, стабилност може указивати на могућности да кост буде „засићена“ где додатно повећање концентрације киселине не доводи до растварања органске или неорганске фазе, или да су специфичне минералне карактеристике узорка отпорне на ефекте сирћетне киселине. Такође, овај тренд може одражавати равнотежу између уклањања неких компоненти и очувања других, што указује да је можда потребна нека гранична концентрација киселине да би се изазвале суштинске промене у структури кости.

Сумпорна киселина различитих концентрација проузрокује стабилан ниво угљеника (35,2/36,7), раст фракције калцијума (2,6/3,4) и знатан пад фракције фосфора (0,6/0,2). Резултати указују да третман сумпорном киселином селективно утиче на минерални састав кости. Стабилност нивоа угљеника указује на то да се органске компоненте, као што су колаген и липиди, не растварају значајно или мењају деловањем киселине, што значи да се структурни интегритет органске матрице одржава током процеса. Супротно томе, смањење садржаја фосфора имплицира да долази до растварања минералне фазе хидроксиапатита, што потенцијално указује на то да кисела средина првенствено „испира“ фосфор док омогућава задржавање калцијума. Овај селективни губитак може одражавати разлике у растворљивости између калцијума и фосфора у киселим условима, или може указивати и на делимично растварање минерала без потпуне деградације. Наведене промене у садржају неорганске фазе се не могу корелирати са резултатима који су добијени анализом инфрацрвених спектра у области апсорпције фосфатне групе из разлога што је наведена област у случају деловања сумпорне киселине на кост изузетно сложена и под утицајем преклапајућих трака из области амид I вибрације, сулфатног јона као и амид III вибрације.

Морфологија узорака (слика 56) указује на ерозију површине третиране кости што је у складу са претходно наведеним резултатима.



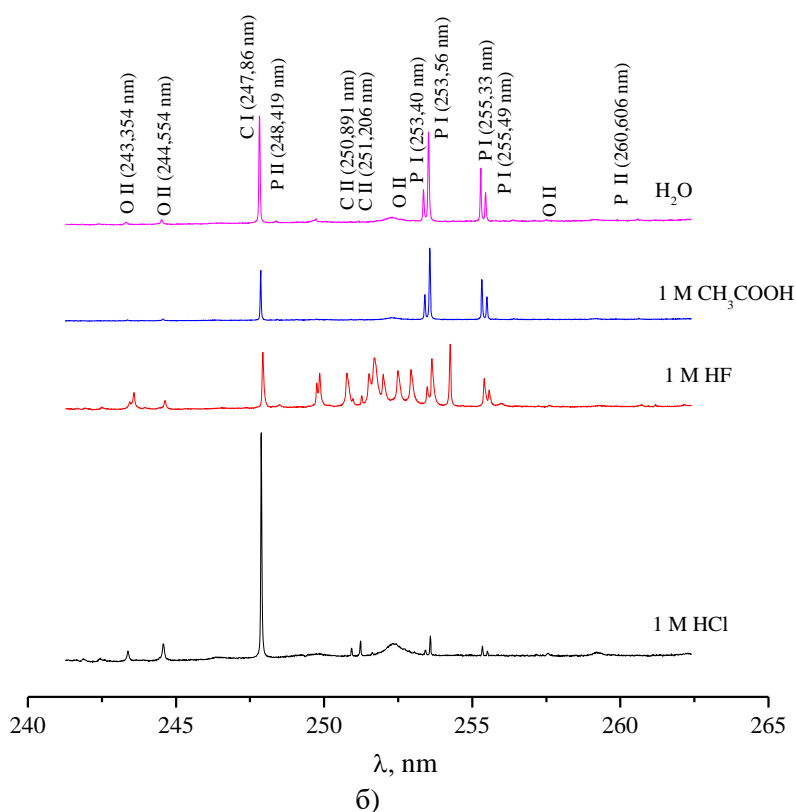
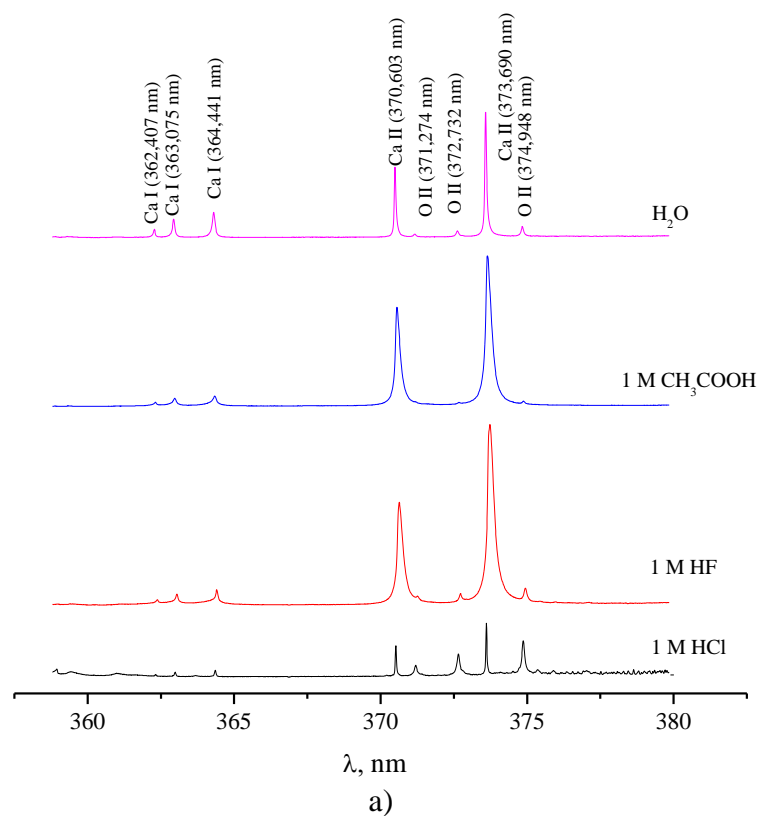
Слика 56 SEM слике испитиваних узорака свињске рамене кости третиране испитиваним киселинама, (увeћање од $\times 2,000$; видно поље $134 \mu\text{m}$)

Добијени резултати указују на сложене интеракције између органских и неорганских компоненти у кости под деловањем испитиваних киселина, наглашавајући важност разумевања специфичних промена које се дешавају током таквих процеса, посебно у контексту форензичке анализе, разумевања својстава материјала или биолошке релевантности.

6.9 Анализа LIBS спектра третиране кости

Дејство хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселине

LIBS спектроскопија је искоришћена за процену релативне површинске тврдоће кости након третмана одабраним киселинама. Као главна компонента коштаног ткива, калцијум је један од кључних елемената од интереса приликом анализе костију применом LIBS технике. Мерења су заснована на чињеници да однос интензитета јонских и атомских линија осликава тврдоћу материјала, јер потенцијал јонизације јонских и атомских врста зависи од тврдоће површине [126-130]. Према раду Касема и сарадника за поређење тврдоће кости користи се однос интензитета калцијумових јонских и атомских (Ca II/Ca I) спектралних линија ($364,441 \text{ nm}$ $370,603 \text{ nm}$, редом), јер наведене линије много мање подлежу само-апсорпцији од резонантних линија, због високе концентрације калцијума у костима (слика 57) [131].



Слика 57 LIBS спектри свињске рамене кости у интервалу таласних дужина од 360-380 nm (а) и 240-265 nm (б) (1 M раствори киселина)

Иако су LIBS спектри снимљени директно са површине кости а рамански спектри од уситњених узорака кости, било је могуће успоставити корелацију између квантитативних параметара квалитета кости одређених применом ове две методе. Тренд промене вредности

СI параметра израчунатих за кост у 0,1 М растворима киселина је у корелацији са трендом промене вредности односа интензитета калцијумових јонских и атомских (Ca II/Ca I) спектралних линија добијених из LIBS спектра (табеле 13 и 14). Такође, односа минерала и матрикса израчунат из инфрацрвених спектра корелиран је са односом интензитета линија фосфора и угљеника (P I/C I, 247,86 и 255,33 nm, редом), израчунатим из LIBS спектра (табела 13), за оквирно праћење односа између минералне и органске фазе кости.

Табела 13 Интензитети Ca I и Ca II линија у LIBS спектрима свињске рамене кости у различитим киселинама

Медијум	Конц. (mol dm ⁻³)	Ca I (364,44 nm)	Ca II (370,60 nm)	Ca II/Ca I
H ₂ O	/	4080,28	11077,75	2,71
HCl	1,0	1115,61	4884,25	4,38
	0,1	2901,97	32463,83	11,19
HF	1,0	2670,67	16206,63	6,07
	0,1	2620,45	19256,22	7,35
CH ₃ COOH	1,0	1765,34	15474,79	8,77
	0,1	3898,02	13534,20	3,47

Табела 14 Интензитети Ca I и P I линија у LIBS спектрима свињске рамене кости у различитим киселинама

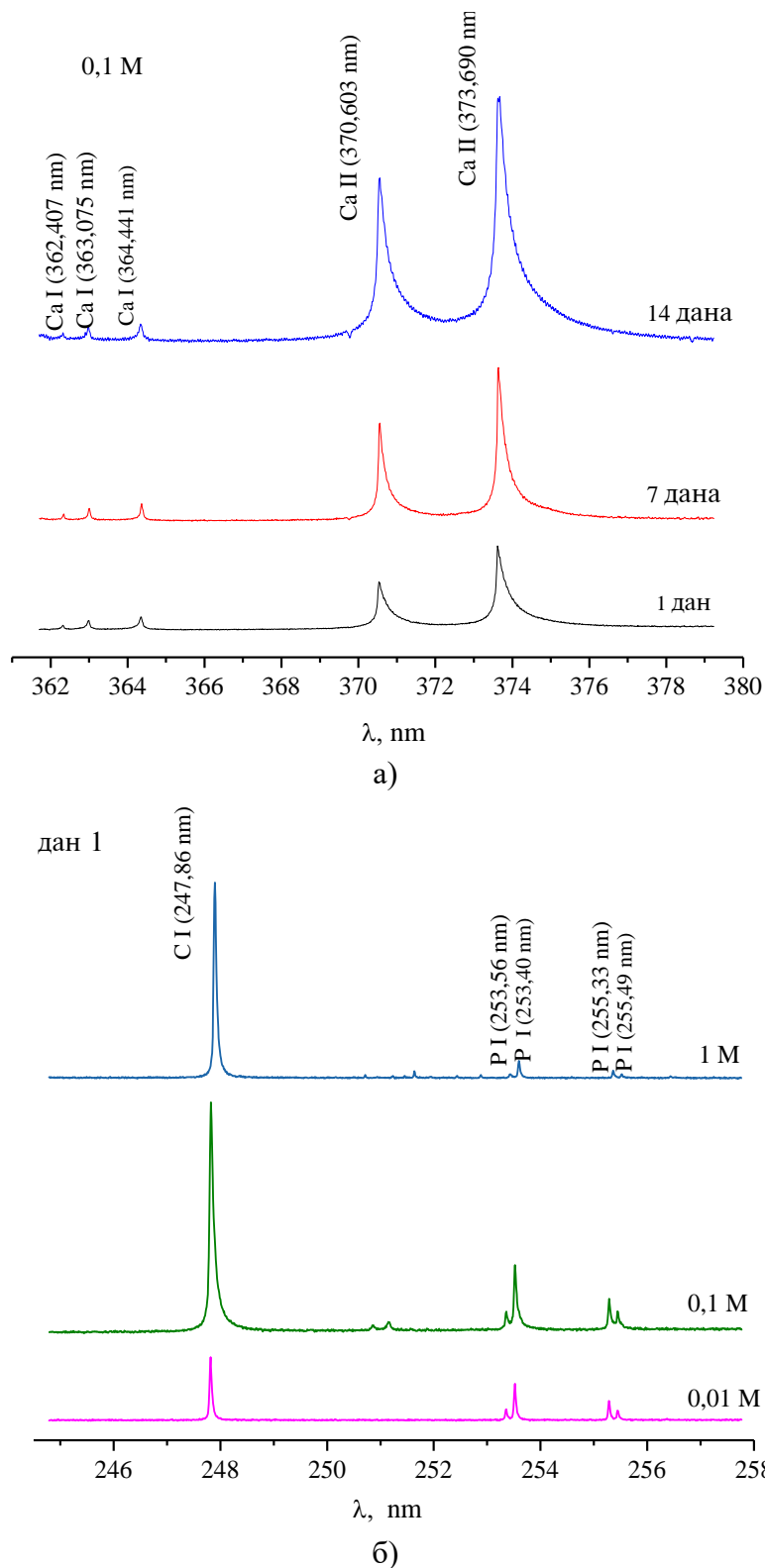
Медијум	Конц. (mol dm ⁻³)	С I (247,86 nm)	P I (255,33 nm)	P I/C I
H ₂ O	/	2962,63	1570,80	0,53
HCl	1,0	9057,73	496,68	0,05
	0,1	4037,78	1503,72	0,37
HF	1,0	1557,52	854,33	0,55
	0,1	3167,65	531,32	0,17
CH ₃ COOH	1,0	1385,03	1136,04	0,82
	0,1	2496,42	1341,34	0,53

Резултати указују на позитивну корелацију између ових параметара за кост третирану 1 М растворима испитиваних киселина. Резултати показују да се удео минерализованог дела кости смањује са повећањем концентрације јаког деминерализационог агенса, хлороводоничне киселине. Такође, тренд промене интензитета линија калцијума у мање и више концентрованим киселинама, одређен из LIBS спектра, и SEM-EDX методом је у сагласности (табеле 12-14). Исто важи и за тренд промена интензитета линија фосфора за кост третирану 0,1 и 1 М растворима хлороводоничне и флуороводоничне киселине (табеле 12 и 14).

Дејство сумпорне киселине

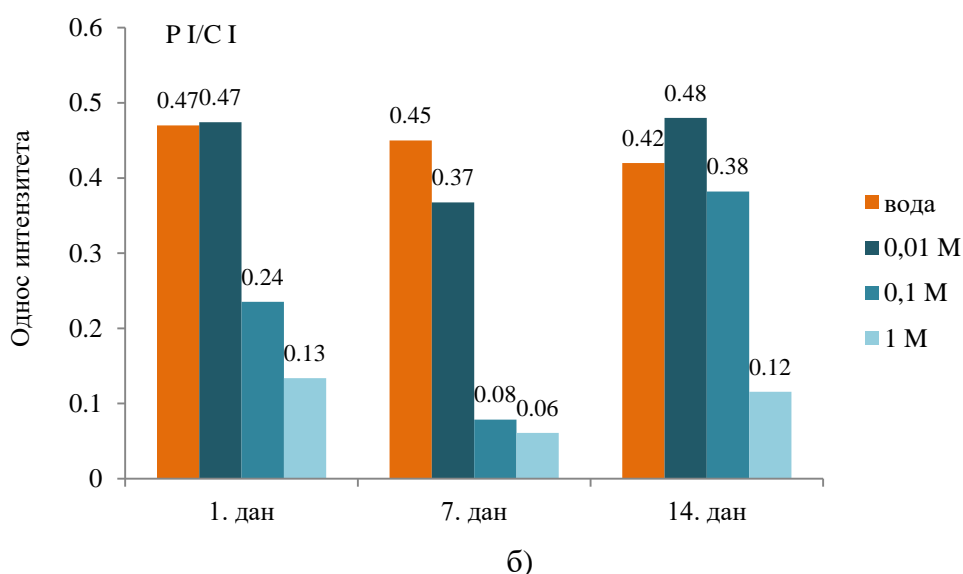
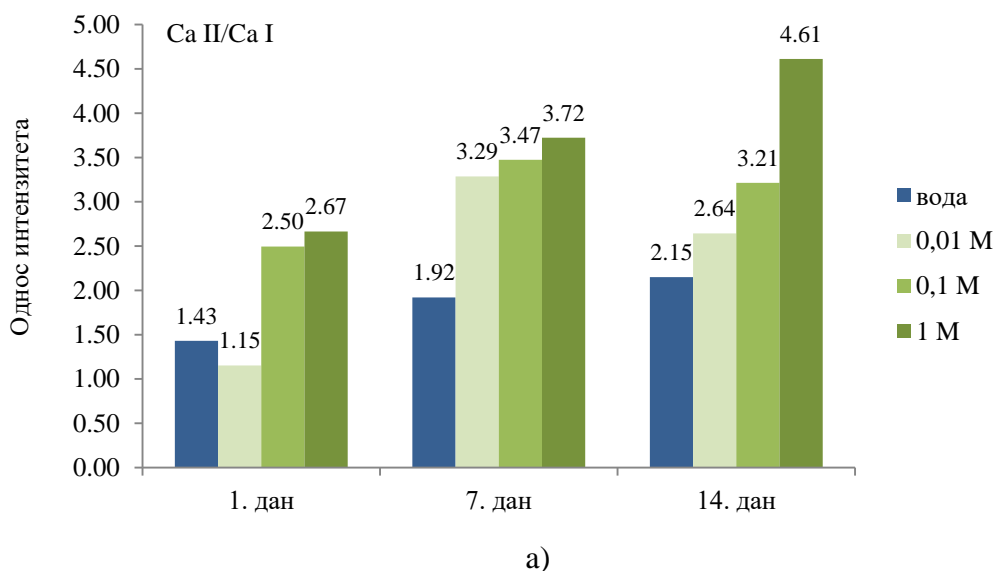
LIBS спектроскопија је искоришћена и за процену релативне површинске тврдоће кости након третмана сумпорном киселином. Резултати показују да формирање калцијум-сулфата на површини кости утиче на локалну температуру плазме и густину електрона и,

последично, стање јонизације атома калцијума. Степен јонизације атома калцијума у плазми генерисаној на чврстој површини кости је искришћен као показатељ температуре плазме и, индиректно, површинске тврдоће кости, односно минералне густине узорака кости [122,123]. И у овом случају је, да би се избегла самоапсорпција резонантних линија калцијума, коришћена јонска линија на 364,441 nm (Ca I) и атомска линија на 370,603 nm (Ca II) (слика 58) [122].



Слика 58 LIBS спектри свињске рамене кости: Ca II и Ca I линије (0,1 M раствор сумпорне киселине, различити дани) (а) и P I и Ca I линија (дан 1, различите концентрације) (б)

Дијаграм на слици 59а приказује однос интензитета Ca II/Ca I линија добијених из LIBS спектра. Евидентно је да се у референтном узорку тај однос полако повећава са временом (1,43; 1,92 и 2,15) што указује да током времена вода може постепено да раствори калцијум као и минерале. Ако се анализира сваки период дејства киселине, може се видети да се тај однос повећава са повећањем концентрације киселине (1,15-2,67 (1. дан); 3,29-3,72 (7. дан) и 2,64-4,61 (14. дан)), што указује на очвршћавање површине кости као резултат формирања калцијум-улата.



Слика 59 Однос интензитета Ca II/ Ca I линија (364,441/370,603 nm) (а) и P I/C I линија (247,86/255,33 nm) (б) у LIBS спектрима свињске рамене кости у растворима сумпорне киселине

Односи интензитета линија фосфора и угљеника (P I/C I; 247,86 и 255,33 nm, редом), добијени и из LIBS спектра (слика 58б), искоришћена је за праћење односа између минералне и органске матрице кости. Те линије су одабране на основу претпоставке да угљеник и фосфор подлежу истим условима екситације, односно да имају сличне енергије јонизације на око 250 nm. Приказани резултати показују да се садржај минералне коштане матрице у референтном узорку не мења значајно током времена. Мало смањење односа P/C (0,47; 0,45 и 0,42) указује на споро испирање фосфора током времена које може да промени

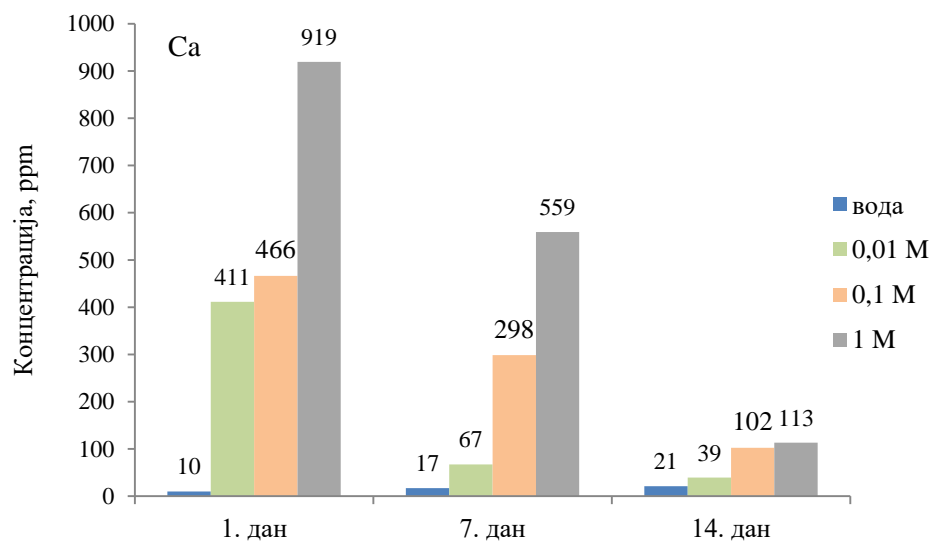
минерални садржај кости. Резултати показују да се удео минерализованог дела кости, посматрано по појединим данима, смањује са повећањем концентрације киселине (0,47-0,13 (1. дан); 0,37-0,06 (7. дан); 0,48-0,12 (14. дан)) (слика 59б). Међутим, када се упореде резултати добијени за све дане, овај однос је највећи након 14 дана дејства киселине за све концентрације, а затим следе 7. и 1. дан (14. дан > 7. дан > 1. дан) (слика 59б).

6.10 Анализа раствора после третмана кости сумпорном киселином, ААС анализа

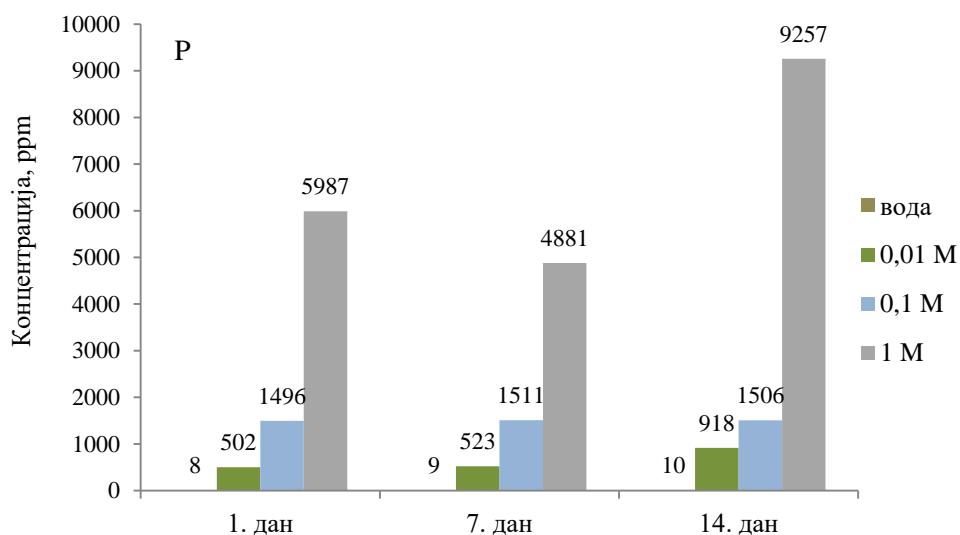
Садржај калцијума, фосфора и магнезијума у раствору, који је остао након уклањања кости, процењен је помоћу ААС (слика 60). Резултати показују високу ефикасност сумпорне киселине у деминерализацији кости. Ниво калцијума у референтном раствору показује благи пораст, (10-21 ppm) што се може сматрати последицом спорог „цурења“ калцијума из кости услед дејства воде (слика 60а). За разлику од референтног раствора како површина кости постаје тврђа са продуженим дејством и повећањем концентрације киселине концентрација калцијума у раствору, услед таложења калцијум-сулфата на површини кости, опада (411-39 ppm (0,01 M); 466-102 ppm (0,1 M) и 919-113 ppm (1 M)) (слика 60а). Штавише, како се органска матрица кости разлаже, минералне компоненте се такође уклањају, а фосфатни јони ослобађају у раствор. Слика 60б приказује промену концентрације фосфора у растворима различитих концентрација. У референтном раствору садржај фосфора се незнатно повећава (8-10 ppm), али у много мањој количини у поређењу са растворима сумпорне киселине.

У киселим растворима повећањем концентрације киселине повећава се и концентрација фосфора у раствору (502-4987 ppm (1. дан); 523-5881 ppm (7. дан)), достижући највећу вредност после 14 дана (918-9257 ppm). После 14 дана концентрација фосфора у референтном раствору је скоро хиљаду пута мања у односу на растворе киселине, након истог временског периода. Исти тренд прати и промене концентрације магнезијума. У референтном раствору, количина магнезијума је неколико стотина пута мања (1,8-3,3 ppm) у поређењу са киселим растворима киселине (22-311 ppm (1. дан), 142-546 ppm (7. дан) и 176-756 ppm (дан 14)) (слика 60в), што указује на значајно ефикаснију деминерализацију у киселој средини.

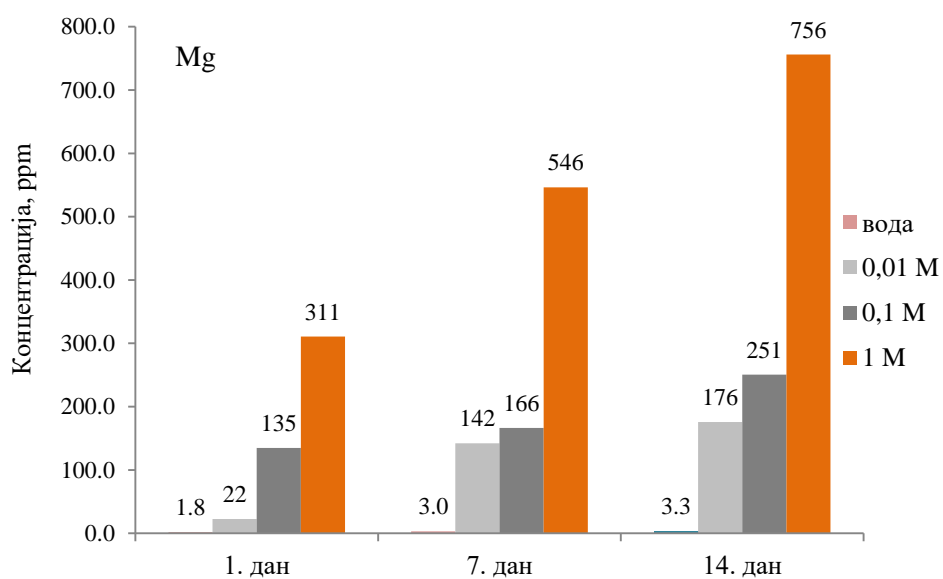
Резултати LIBS и ААС анализе могу се сматрати веома значајним јер указују на промену минералног састава кости, која зависи и од времена и концентрације и, према нашим сазнањима, први пут је представљена на овај начин.



а)



б)



в)

Слика 60 Концентрације калцијума (а) фосфора (б) и магнезијума (в) у растворима сумпорне киселине након уклањања кости

7. ЗАКЉУЧАК

Приказани резултати односе се на актуелну проблематику и пружају свеобухватан увид у деловање различитих деминерализујућих киселина на свињску кост. Применом комплементарних метода молекулске спектроскопије (FTIR-ATR, раманска спектроскопија), *in situ* атомске емисионе спектроскопије (LIBS) и техника високе резолуције за анализу површина узорака (SEM-EDX), добијени су вредни подаци и нови увид у структурне/морфолошке промене у свињској раменој кости изазване дејством хлороводоничне, флуороводоничне, сирћетне и сумпорне киселине различитих концентрација и времена деловања. Оваквим приступом пружена је могућност за свеобухватно разумевање ефеката киселина на свињске кости као модел система у форензичким испитивањима.

LIBS техника заснована на TEA CO₂ ласеру ниске енергије импулса се и у овим испитивањима показала као ниско инвазивна техника и брз дијагностички алат у елементној анализи узорака костију у реалном времену. Добијене ниске границе детекције за Mg (16 ppm) и Zn (12 ppm) указују на то да се ова техника може користити за детекцију већине метала у костима, са границама детекције између 10-100 ppm. Потврђена је могућност употребе C и Na линија за дијагностику плазме, одређене су оквирне вредности концентрације електрона од $2,9 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ и $1,9 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ и температуре јонизације у опсегу од 10500 до 18100 K, у зависности од својства елемента чије су линије коришћене за дијагностику. У раду је такође потврђена способност LIBS-а за анализу дубинског профила применом оптичке профилометрије. Констатовано је да је брзина аблације по просечном пулсу око 6 μm , за густину енергије ласера између 15,6 и 18,2 J cm⁻². Такође је констатовано да се дубина аблације по импулсу полако смањује са повећањем броја узастопних ласерских импулса примењених на истој циљној позицији.

Карактеристични параметри испитиване свињске кости показали су концентрацијски зависне промене у садржају минерала у матрици кости, кристаличности минерала и садржају карбоната под дејством хлороводоничне, флуороводоничне и сирћетне киселине. Праћење промена у саставу органске и неорганске матрице кости дало је увид у степен структурног интегритета и функционална својства кости. Асигнација трака у спектрима деконволуције у областима вибрација карактеристичним за неорганску (хидроксиапатит) и органску матрицу (колаген) кости указала је на различите степене очуваности структуре колагена и састава фосфата услед деловања испитиваних киселина при чему се садржај фосфата, иначе динамичан по природи, показао као подложнији променама.

Уколико се анализирају вредности квантитативних параметра израчунатих из инфрацрвених спектра тада се на основу вредност односа минерала према органској матрици може закључити да се најмањи MM, за обе концентрације, добија у случају деловања хлороводоничне киселине што указује на њену већу способност да деминерализује првенствено неорганску матрицу кости.

Више вредности индекса кристаличности кости после третмана киселинама у односу на референтни раствор потврђују селективно растварање органских и некристалних компоненти унутар коштане матрице. Третман киселинама има за последицу разградњу како органске фазе кости, попут колагена, тако и аморфних облика минерала остављајући за собом више концентровану и добро уређену кристалну фазу која се првенствено састоји од хидроксиапатита. Овај процес побољшава укупну кристаличност преостале минералне структуре елиминисањем мање уређених фаза. Насупрот томе референтни раствор, вода, генерално не изазива исти степен растварања органских и слабо кристалних компоненти кости иако у води може доћи до извесног испирања растворљивих материја.

Већи однос карбонат-фосфат у кости третираној 1 M сирћетном киселином у поређењу са 1 M флуороводоничном киселином резултат је селективних карактеристика растварања обе киселине, при чему сирћетна киселина као слаба органска киселина

првенствено циља органску матрицу кости, као што је колаген, док има мање изражен ефекат на минералну фазу. Умерено растварање сирћетном киселином омогућава да више карбонатних јона остане повезано са минералом кости. Немогућност израчунавања односа карбоната-фосфат у кости третираној 1 М хлороводоничном киселином последица је агресивнијег растварања хидроксиапатита и ослобађања угљен-диоксида што има за последицу губитак карбоната.

Одсуство потпуне корелације свих квантитативних параметара добијених из инфрацрвених и раманских спектра је последица недостатка неких релевантних трака као и интензивне флуоресцентне емисије компонената кости (услед разградње минералне фазе и присуства аминокиселина, нуклеотида, ћелијских метаболита) услед третмана киселинама. Такође ове две методе се, иако комплементарне и често веома повезане, заснивају на потпуно различитим феноменима, апсорпцији и расејању зрачења, што има за последицу различит број, интензитет и ширину трака у спектрима.

Анализа утицаја сумпорне киселине на свињску кост указују на сложену секундарну структуру колагена и присуство карбонилних једињења насталих фрагментацијом полипептида. Најочљивије промене у структури амид I траке су евидентне након прва 24 сата деловања киселине. Како се концентрација киселине повећава а време деловања продужава то траке које се асигнирају структурним компонентама колагена, као што су троструки хеликс (спирала), и β -turn облик показују смањење интензитета док траке других компонената не мењају знатно интензитет, што указује да се примарни структурни интегритет, неопходан за затезну чврстоћу колагена, донекле одржава, упркос деградацији кости. Важно је напоменути да иако се примећује очување троструког хеликса колагена, дугорочни структурни интегритет кости може, и вероватно јесте, и даље угрожен због механизма деградације који су повезани са растварањем минералних компоненти кости. Вредности индекса зрелости колагена одражавају нарушену равнотежу између зрелог (пиридинолинског) и незрелог (дихидроксинорлеуцинског) умрежавања колагена уз растући тренд зрелог умрежавања током времена. Ова промена одражава потенцијални ефекат „старења кости“ изазван агресивним хемијским третманом пре него природни процес тзв. ремоделовања кости. Конзистентност у карактеристикама спектра деконволуције у области амид I траке, у различитим условима (концентрација и време деловања киселине) сугерише форензичке импликације резултата, јер ове спектралне карактеристике могу помоћи у процени трајања изложености кости киселинама и идентификацији потенцијалних хемијских третмана који су примењени.

Третман сумпорном киселином је такође значајно утицао на минералну компоненту, хидроксиапатит, кости. Анализа инфрацрвених спектра у домену $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације указују на приметне промене у интензитету, ширини, структури и положају наведене траке. Комплексна структура трака у областима где се јавља амида I трака и трака $\nu_1/\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ вибрације онемогућила је поуздано успостављање квантитативних односа, попут односа минерала и матрице, за процену хемијски изазваних промена на кости на основу података из инфрацрвених спектра, што је кључна разлика у деловању сумпорне киселине у односу на остале испитиване киселине. Овакви резултати се могу објаснити фрагментацијом полипептида, растварањем минерала, преклапањем фосфатних и сулфатних трака (од формираног калцијум-сулфата), као и преклапањем са траком амид III вибрације.

LIBS и AAS анализе су додатно потврдиле ове резултате, указујући да процес деминерализације зависи од времена урањања и концентрације киселине. Константовано је да однос интензитета линија Ca II/Ca I индиректно одражава минералну густину и тврдоћу кости. Повећање односа Ca II/Ca I са концентрацијом киселине и трајањем деловања киселине указује на очвршћавање површине кости услед стварања калцијум-сулфата. Резултати AAS анализе раствора преосталих након уклањања кости показују да садржаји калцијума, фосфора и магнезијума значајно варирају између референтних узорака и узорака третираних киселином као и то да су временски и концентрационо зависни. Како површина кости постаје тврђа због формирања калцијум-сулфата, концентрација калцијума у

растворима опада осам пута од првог до четрнаестог дана третмана сумпором киселином (1 М раствори) док насупротив томе, концентрација фосфора и магнезијума у растворима расте 1,8 и 2,5 пута, редом, од првог до четрнаестог дана третмана сумпором киселином (1 М раствори).

SEM-EDX анализа указала је на значајне ефекте различитих третмана киселинама на морфологију и хемијски састав узорака кости, откривајући различите обрасце у растварању неорганских и органских компоненти. Хлороводонична киселина је показала највећу моћ деминерализације, што има за последицу значајна смањења садржаја и калцијума и фосфора, што је у складу са резултатима добијеним анализом инфрацрвених спектра. Насупрот томе, третман флуороводоничном киселином повећао је нивое калцијума и фосфора док је значајно смањио садржај угљеника, што указује на мањи утицај на садржај минералне у односу на органску фазу кости. Сирћетна киселина, као слаба киселина, показала је минималан утицај на атомске фракције калцијума, фосфора и угљеника, што указује на одживост структурног интегритета коштане матрице. Третман сумпорном киселином указао је на селективно испирање фосфора уз одржавање стабилних нивоа угљеника, што имплицира да органска фаза кости остаје очувана растварањем минерала.

У закључку се може рећи да резултати ове дисертације пружају могућност да се уобличи наше разумевање о томе како се кадавери људи могу разградити у различитим срединама и откривају значајан утицај киселина на органски и минерални састав биолошких апатита, наглашавајући сложену везу између хемијских и физичких промена у структури кости. Гледано са аспекта форензичких/археолошких/медицинских испитивања, сложене интеракције уочене у органској и неорганској матрици свињске кости у киселим условима могле би помоћи у форензичким и археолошким испитивањима да се разуме како фактори животне средине и они изазвани људским деловањем доприносе деградацији костију. У овом контексту веома су важне промене у структурном интегритету, посебно промене у секундарној структури колагена и садржају минерала, које одражавају како хемијски третмани могу утицати на скелетне остатке. Такво знање је кључно када се испитују стварни форензички случајеви или археолошка налазишта где стање очуваности костију може бити угрожено услед излагања киселинама или другим хемикалијама.

8. ЛІТЕРАТУРА

1. Hemanth K, Tharmavaram M, Pandey G. History of Forensic Science. In: Rawtani D, Hussain CM, eds. *Technology in Forensic Science*. 1st ed. Wiley; 2020:1-16. doi:10.1002/9783527827688.ch1
2. Tilstone WJ, Savage KA, Clark LA. *Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques*. Bloomsbury Academic; 2006. <https://books.google.rs/books?id=zIRQOssWbaoC>
3. Von Euw S, Wang Y, Laurent G, et al. Bone mineral: new insights into its chemical composition. *Sci Rep*. 2019;9(1):8456. doi:10.1038/s41598-019-44620-6
4. Rauf A. Animal bone – A brief introduction. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2014;3:1458-1464.
5. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_38_02_04.png
6. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78(1):929-958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833
7. <https://www.learnskin.com/articles/vegan-alternatives-for-collagen-supplementation>
8. Silvipriya K, Kumar K, Bhat A, Kumar B, John A, Lakshmanan P. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *J App Pharm Sci*. Published online 2015:123-127. doi:10.7324/JAPS.2015.50322
9. https://semmelweis.hu/oralbiologia/files/2016/02/16-Bioapatites_Keremi.pdf
10. Talal A, Hamid SK, Khan M, Khan AS. Structure of biological apatite. In: *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*. Elsevier; 2020:1-19. doi:10.1016/B978-0-08-102834-6.00001-X
11. Mamede AP, Gonçalves D, Marques MPM, Batista De Carvalho LAE. Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-induced diagenesis. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2018;53(8):603-635. doi:10.1080/05704928.2017.1400442
12. Legros R, Balmain N, Bonel G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif Tissue Int*. 1987;41(3):137-144. doi:10.1007/BF02563793
13. Matuszewski S, Hall MJR, Moreau G, Schoenly KG, Tarone AM, Villet MH. Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research. *Int J Legal Med*. 2020;134(2):793-810. doi:10.1007/s00414-019-02074-5
14. Payne JA. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus. *Ecology*. 1965;46(5):592-602. doi:10.2307/1934999
15. Gentile G, Tambuzzi S, Andreola S, Bailo P, Bilato G, Gorini I, Zoja R, Analysis of the corrosive effects of hydrochloric acid (HCl) on human bone: Preliminary microscopic study and observations for forensic purposes. *Forensic Sci Int*. 2021;329: 111095. doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111095
16. Debras-Guédon NL. De l'utilisation du faisceau d'un amplificateur à ondes lumineuses par émission induite de rayonnement (laser à rubis), comme source énergétique pour l'excitation des spectres d'émission des éléments. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*. 1963;257:3336.
17. Cremers DA, Radziemski LJ. *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. John Wiley & Sons; 2006.
18. Winefordner JD, Gornushkin IB, Correll T, Gibb E, Smith BW, Omenetto N. Comparing several atomic spectrometric methods to the super stars: special emphasis on laser induced breakdown spectrometry, LIBS, a future super star. *J Anal At Spectrom*. 2004;19(9):1061. doi:10.1039/b400355c
19. Miziolek AW, Schechter I, Palleschi V, eds. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS): Fundamentals and Applications*. Cambridge University Press; 2006.
20. Jolivet L, Leprince M, Moncayo S, Sorbier L, Lienemann CP, Motto-Ros V. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2019;151:41-53. doi:10.1016/j.sab.2018.11.008

21. Cremers DA, Chinni RC. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2009;44(6):457-506. doi:10.1080/05704920903058755
22. Hahn DW, Omenetto N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma—Particle Interactions: Still-Challenging Issues within the Analytical Plasma Community. *Appl Spectrosc*. 2010;64(12):335A-336A. doi:10.1366/000370210793561691
23. Guo K, Chen A, Xu W, Zhang D, Jin M. Effect of sample temperature on time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy. *AIP Advances*. 2019;9(6):065214. doi:10.1063/1.5097301
24. Aragón C, Aguilera JA. Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2008;63(9):893-916. doi:10.1016/j.sab.2008.05.010
25. Chaudhary K, Rizvi SZH, Ali J. Laser-Induced Plasma and its Applications. In: Mieno T, ed. *Plasma Science and Technology - Progress in Physical States and Chemical Reactions*. InTech; 2016. doi:10.5772/61784
26. Harilal SS, Phillips MC, Froula DH, Anoop KK, Issac RC, Beg FN. Optical diagnostics of laser-produced plasmas. *Rev Mod Phys*. 2022;94(3):035002. doi:10.1103/RevModPhys.94.035002
27. Radić-Perić J, Kuzmanović M. *Fizička Hemija Plazme*. Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju; 2019.
28. Anabitarte F, Cobo A, Lopez-Higuera JM. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals, Applications, and Challenges. *ISRN Spectroscopy*. 2012;2012:1-12. doi:10.5402/2012/285240
29. Tian Y. Characterization of Laser-Induced Plasma and Application to Surface-Assisted LIBS for Powder and Liquid Samples. 2017. <https://theses.hal.science/tel-01724709v1/file/TH2017TIANYE.pdf>
30. Harilal SS, Bindhu CV, Nampoori VPN, Vallabhan CPG. Temporal and Spatial Behavior of Electron Density and Temperature in a Laser-Produced Plasma from YBa₂Cu₃O₇. *Appl Spectrosc*. 1998;52(3):449-455. doi:10.1366/0003702981943671
31. Chalmers JM, Edwards HGM, Hargreaves MD, eds. *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. 1st ed. Wiley; 2012. doi:10.1002/9781119962328
32. Muro CK, Doty KC, Bueno J, Halámková L, Lednev IK. Vibrational Spectroscopy: Recent Developments to Revolutionize Forensic Science. *Anal Chem*. 2015;87(1):306-327. doi:10.1021/ac504068a
33. Lewis IR, Edwards H. *Handbook of Raman Spectroscopy*. 0 ed. CRC Press; 2001. doi:10.1201/9781420029253
34. Antić-Jovanović A. *Molekulska Spektroskopija, Spektrohemijski Aspekt*. Fakultet za fizičku hemiju; 2016.
35. Dimitrić Marković J. *Odabrana Poglavlja Molekulske Spektrohemijske*. Fakultet za fizičku hemiju; 2008.
36. https://wanda.fiu.edu/boeglinw/courses/Modern_lab_manual3/michelson.html
37. https://www.researchgate.net/publication/275021699_Attenuated_total_reflectance_infrared_spectroscopy_A_powerful_method_for_the_simultaneous_study_of_structure_and_spatial_orientation_of_lipids_and_membrane_proteins/figures?lo=1
38. Tu AT. *Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications*. Wiley; 1982.
39. Dodo K, Fujita K, Sodeoka M. Raman Spectroscopy for Chemical Biology Research. *J Am Chem Soc*. 2022;144(43):19651-19667. doi:10.1021/jacs.2c05359
40. Allakhverdiev ES, Khabatova VV, Kossalbayev BD, et al. Raman Spectroscopy and Its Modifications Applied to Biological and Medical Research. *Cells*. 2022;11(3):386. doi:10.3390/cells11030386

41. Boyde A. Scanning Electron Microscopy of Bone. In: Helfrich MH, Ralston SH, eds. *Bone Research Protocols*. Vol 816. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2012:365-400. doi:10.1007/978-1-61779-415-5_24
42. Love JC. Sharp force trauma analysis in bone and cartilage: A literature review. *Forensic Science International*. 2019;299:119-127. doi:10.1016/j.forsciint.2019.03.035
43. Shah FA, Ruscsák K, Palmquist A. 50 years of scanning electron microscopy of bone—a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Res*. 2019;7(1):15. doi:10.1038/s41413-019-0053-z
44. Weber A, Hoplight B, Ogilvie R, MuuuroC, Khandasammy SR, Perez-Almodovar L, Sears S, Lendev IK. Innovative Vibrational Spectroscopy Research for Forensic Application. *Anal Chem*. 2023;95(1):167-205. doi:10.1021/acs.analchem.2c05094
45. George SD, Kartha VB, Chidangil S, V K U. Hybrid LIBS-Raman-LIF systems for multi-modal spectroscopic applications: a topical review. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2021;56(6):463-491. doi:10.1080/05704928.2020.1800486
46. Hilario FF, Lima De Mello M, Pereira-Filho ER. Forensic analysis of hand-written documents using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics. *Anal Methods*. 2021;13(2):232-241. doi:10.1039/D0AY02089C
47. Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the 3 PO₄ domain. *Calcif Tissue Int*. 1991;49(6):383-388. doi:10.1007/BF02555847
48. Lopes CDCA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2018;53(9):747-769. doi:10.1080/05704928.2018.1431923
49. Taylor EA, Donnelly E. Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties. *Bone*. 2020;139:115490. doi:10.1016/j.bone.2020.115490
50. Paschalis EP, Mendelsohn R, Boskey AL. Infrared Assessment of Bone Quality: A Review. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 2011;469(8):2170-2178. doi:10.1007/s11999-010-1751-4
51. Kourkoumelis N, Tzaphlidou M. Spectroscopic Assessment of Normal Cortical Bone: Differences in Relation to Bone Site and Sex. *The Scientific World JOURNAL*. 2010;10:402-412. doi:10.1100/tsw.2010.43
52. Morris MD, Finney WF. Recent developments in Raman and infrared spectroscopy and imaging of bone tissue. *Journal of Spectroscopy*. 2004;18(2):155-159. doi:10.1155/2004/765753
53. Wegrzyn J, Roux JP, Farlay D, Follet H, Chapurlat R. The role of bone intrinsic properties measured by infrared spectroscopy in whole lumbar vertebra mechanics: Organic rather than inorganic bone matrix? *Bone*. 2013;56(2):229-233. doi:10.1016/j.bone.2013.06.006
54. Wehrle-Martinez A, Waterland MR, Naffa R, et al. Bone quality changes as measured by Raman and FTIR spectroscopy in primiparous cows with humeral fracture from New Zealand. *Front Vet Sci*. 2023;10:1063427. doi:10.3389/fvets.2023.1063427
55. Kourkoumelis N, Zhang X, Lin Z, Wang J. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Bone Tissue: Bone Quality Assessment in Preclinical and Clinical Applications of Osteoporosis and Fragility Fracture. *Clinic Rev Bone Miner Metab*. 2019;17(1):24-39. doi:10.1007/s12018-018-9255-y
56. Scaggion C, Marinato M, Dal Sasso G, et al. A fresh perspective on infrared spectroscopy as a prescreening method for molecular and stable isotopes analyses on ancient human bones. *Sci Rep*. 2024;14(1):1028. doi:10.1038/s41598-024-51518-5
57. Querido W, Kandel S, Pleshko N. Applications of Vibrational Spectroscopy for Analysis of Connective Tissues. *Molecules*. 2021;26(4):922. doi:10.3390/molecules26040922

58. Singh VK, Kumar V, Sharma J. Importance of laser-induced breakdown spectroscopy for hard tissues (bone, teeth) and other calcified tissue materials. *Lasers Med Sci.* 2015;30(6):1763-1778. doi:10.1007/s10103-014-1549-9
59. Tofanelli M, Pardini L, Borrini M, et al. Spectroscopic analysis of bones for forensic studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 2014;99:70-75. doi:10.1016/j.sab.2014.06.006
60. Kasem MA, Gonzalez JJ, Russo RE, Harith MA. LIBS analysis of artificial calcified tissues matrices. *Talanta.* 2013;108:53-58. doi:10.1016/j.talanta.2013.02.062
61. Rusak DA, Marsico RM, Taroli BL. Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy to Assess Preservation Quality of Archaeological Bones by Measurement of Calcium-to-Fluorine Ratios. *Appl Spectrosc.* 2011;65(10):1193-1196. doi:10.1366/11-06364
62. Cárdenas-Escudero J, Galán-Madruga D, Cáceres JO. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy as an Accurate Forensic Tool for Bone Classification and Individual Reassignment. *Appl Spectrosc.* Published online October 3, 2024:00037028241277897. doi:10.1177/00037028241277897
63. Mazalan E, Chaudhary K, Haider Z, Abd Hadi SF, Ali J. Determination of calcium to phosphate elemental ratio in natural hydroxyapatite using LIBS. *J Phys: Conf Ser.* 2018;1027:012013. doi:10.1088/1742-6596/1027/1/012013
64. Moncayo S, Manzoor S, Ugidos T, Navarro-Villoslada F, Cáceres JO. Discrimination of human bodies from bones and teeth remains by Laser Induced Breakdown Spectroscopy and Neural Networks. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy.* 2014;101:21-25. doi:10.1016/j.sab.2014.07.008
65. Mehari F, Rohde M, Knipfer C, et al. Laser induced breakdown spectroscopy for bone and cartilage differentiation - ex vivo study as a prospect for a laser surgery feedback mechanism. *Biomed Opt Express.* 2014;5(11):4013. doi:10.1364/BOE.5.004013
66. Querido W, Shanas N, Bookbinder S, Oliveira-Nunes MC, Krynska B, Pleshko N. Fourier transform infrared spectroscopy of developing bone mineral: from amorphous precursor to mature crystal. *Analyst.* 2020;145(3):764-776. doi:10.1039/C9AN01588D
67. Velraj G, Karthikeyan S, Chitra A. Mineralization changes substituted type B carbonate of PO₄³⁻ ion in the bone minerals of an archaeological sample studied using fourier self deconvolution technique. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 2020;57:277-282.
68. Mamede AP, Gonçalves D, Marques MPM, Batista De Carvalho LAE. Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-induced diagenesis. *Applied Spectroscopy Reviews.* 2018;53(8):603-635. doi:10.1080/05704928.2017.1400442
69. Thompson TJU, Islam M, Bonniere M. A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. *Journal of Archaeological Science.* 2013;40(1):416-422. doi:10.1016/j.jas.2012.07.008
70. Snoeck C, Lee-Thorp JA, Schulting RJ. From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology.* 2014;416:55-68. doi:10.1016/j.palaeo.2014.08.002
71. Dal Sasso G, Asscher Y, Angelini I, Nodari L, Artioli G. A universal curve of apatite crystallinity for the assessment of bone integrity and preservation. *Sci Rep.* 2018;8(1):12025. doi:10.1038/s41598-018-30642-z
72. Figueiredo M, Cunha S, Martins G, Freitas J, Judas F, Figueiredo H. Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chemical Engineering Research and Design.* 2011;89(1):116-124. doi:10.1016/j.cherd.2010.04.013
73. Caputo I, Lepretti M, Scarabino C, Esposito C, Proto A. An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. *Analytical Biochemistry.* 2012;421(1):92-96. doi:10.1016/j.ab.2011.10.024
74. Mieczkowska A, Mabilieu G. Validation of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy for the Evaluation of Enzymatic Cross-Linking of Bone Collagen. *Calcif Tissue Int.* 2023;113(3):344-353. doi:10.1007/s00223-023-01105-z

75. Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic Characterization of Collagen Cross-Links in Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(10):1821-1828. doi:10.1359/jbmr.2001.16.10.1821
76. Pavlou E, Kourkoumelis N. Deep adversarial data augmentation for biomedical spectroscopy: Application to modelling Raman spectra of bone. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2022;228:104634. doi:10.1016/j.chemolab.2022.104634
77. Momcilovic M, Kuzmanovic M, Rankovic D, et al. Optical Emission Studies of Copper Plasma Induced Using Infrared Transversely Excited Atmospheric (IR TEA) Carbon Dioxide Laser Pulses. *Appl Spectrosc*. 2015;69(4):419-429. doi:10.1366/14-07584
78. Trtica M, Kuzmanovic M, Savovic J, Rankovic D. TEA CO₂ Laser – Polymethyl Methacrylate Interaction: LIBS Hydrogen Analysis. *Applied Surface Science*. 2022;572:151424. doi:10.1016/j.apsusc.2021.151424
79. Aguilera JA, Aragón C. Characterization of laser-induced plasmas by emission spectroscopy with curve-of-growth measurements. Part II: Effect of the focusing distance and the pulse energy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2008;63(7):793-799. doi:10.1016/j.sab.2008.04.013
80. Keszler AM, Nemes L. Time averaged emission spectra of Nd:YAG laser induced carbon plasmas. *Journal of Molecular Structure*. 2004;695-696:211-218. doi:10.1016/j.molstruc.2003.11.048
81. Olivero JJ, Longbothum RL. Empirical fits to the Voigt line width: A brief review. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 1977;17(2):233-236. doi:10.1016/0022-4073(77)90161-3
82. Griem HR. *Spectral Line Broadening by Plasmas*. Pure and Applied Physics, New York: Academic Press; 1974.
83. Konjević N, Ivković M, Sakan N. Hydrogen Balmer lines for low electron number density plasma diagnostics. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2012;76:16-26. doi:10.1016/j.sab.2012.06.026
84. Gigosos MA, González MÁ, Cardeñoso V. Computer simulated Balmer-alpha, -beta and -gamma Stark line profiles for non-equilibrium plasmas diagnostics. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2003;58(8):1489-1504. doi:10.1016/S0584-8547(03)00097-1
85. Hussain Shah SK, Iqbal J, Ahmad P, Khandaker MU, Haq S, Naeem M. Laser induced breakdown spectroscopy methods and applications: A comprehensive review. *Radiation Physics and Chemistry*. 2020;170:108666. doi:10.1016/j.radphyschem.2019.108666
86. Wang Z, Afgan MS, Gu W, et al. Recent advances in laser-induced breakdown spectroscopy quantification: From fundamental understanding to data processing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021;143:116385. doi:10.1016/j.trac.2021.116385
87. Maurya GS, Marín-Roldán A, Veis P, Pathak AK, Sen P. A review of the LIBS analysis for the plasma-facing components diagnostics. *Journal of Nuclear Materials*. 2020;541:152417. doi:10.1016/j.jnucmat.2020.152417
88. Mermet JM. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. *Analytica Chimica Acta*. 1991;250:85-94. doi:10.1016/0003-2670(91)85064-Y
89. Tognoni E, Hidalgo M, Canals A, et al. Combination of the ionic-to-atomic line intensity ratios from two test elements for the diagnostic of plasma temperature and electron number density in Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007;62(5):435-443. doi:10.1016/j.sab.2007.05.006
90. Ansbacher W, Li Y, Pinnington EH. Precision lifetime measurement for the 3p levels of Mg II using frequency-doubled laser radiation to excite a fast ion beam. *Physics Letters A*. 1989;139(3-4):165-169. doi:10.1016/0375-9601(89)90353-8
91. Kuzmanovic M, Rankovic D, Trtica M, Ciganovic J, Petrovic J, Savovic J. Optical emission of graphite plasma generated in ambient air using low-irradiance carbon dioxide laser pulses.

- Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2019;157:37-46. doi:10.1016/j.sab.2019.05.006
92. Rajabimashhadi Z, Gallo N, Salvatore L, Lionetto F. Collagen Derived from Fish Industry Waste: Progresses and Challenges. *Polymers*. 2023;15(3):544. doi:10.3390/polym15030544
 93. Sealy J, Johnson M, Richards M, Nehlich O. Comparison of two methods of extracting bone collagen for stable carbon and nitrogen isotope analysis: comparing whole bone demineralization with gelatinization and ultrafiltration. *Journal of Archaeological Science*. 2014;47:64-69. doi:10.1016/j.jas.2014.04.011
 94. Pang S, Su FY, Green A, Salim J, McKittrick J, Jasiuk I. Comparison of different protocols for demineralization of cortical bone. *Sci Rep*. 2021;11(1):7012. doi:10.1038/s41598-021-86257-4
 95. Maspero F, Sala S, Fedi ME, Martini M, Papagni A. A new procedure for extraction of collagen from modern and archaeological bones for ¹⁴C dating. *Anal Bioanal Chem*. 2011;401(6):2019-2023. doi:10.1007/s00216-011-5252-4
 96. Rey C, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ion in the early deposits of a solid phase of calcium phosphate in bone and enamel and their evolution with age: 2. Investigations in the ν_3 PO₄ domain. *Calcif Tissue Int*. 1991;49(6):383-388. doi:10.1007/BF02555847
 97. Wang Y, Von Euw S, Fernandes FM, et al. Water-mediated structuring of bone apatite. *Nature Mater*. 2013;12(12):1144-1153. doi:10.1038/nmat3787
 98. Berna F, Matthews A, Weiner S. Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window. *Journal of Archaeological Science*. 2004;31(7):867-882. doi:10.1016/j.jas.2003.12.003
 99. Belibagli P, Isik Z, Mazmanci MA, Dizge N. Phosphate recovery from waste fish bones ash by acidic leaching method and iron phosphate production using electrocoagulation method. *Journal of Cleaner Production*. 2022;373:133499. doi:10.1016/j.jclepro.2022.133499
 100. Kootstra AMJ, Brilman DWF (Wim), Kersten SRA. Dissolution of phosphate from pig manure ash using organic and mineral acids. *Waste Management*. 2019;88:141-146. doi:10.1016/j.wasman.2019.03.038
 101. Dorozhkin SV. Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. *WJM*. 2012;2(1):1. doi:10.5662/wjm.v2.i1.1
 102. Fleet ME. Infrared spectra of carbonate apatites: ν_2 -Region bands. *Biomaterials*. 2009;30(8):1473-1481. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.007
 103. Crane NJ, Popescu V, Morris MD, Steenhuis P, Ignelzi MA. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone*. 2006;39(3):434-442. doi:10.1016/j.bone.2006.02.059
 104. Farlay D, Panczer G, Rey C, Delmas PD, Boivin G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(4):433-445. doi:10.1007/s00774-009-0146-7
 105. Benetti C, Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Mid-Infrared Spectroscopy Analysis of the Effects of Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet (Er,Cr:YSGG) Laser Irradiation on Bone Mineral and Organic Components. *Appl Spectrosc*. 2015;69(12):1496-1504. doi:10.1366/14-07726
 106. Grunenwald A, Keyser C, Sautereau AM, Crubézy E, Ludes B, Drouet C. Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology. *Journal of Archaeological Science*. 2014;49:134-141. doi:10.1016/j.jas.2014.05.004
 107. Weiner S, Bar-Yosef O. States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey. *Journal of Archaeological Science*. 1990;17(2):187-196. doi:10.1016/0305-4403(90)90058-D
 108. Termine JD, Posner AS. Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions. *Science*. 1966;153(3743):1523-1525. doi:10.1126/science.153.3743.1523

109. Kazanci M, Roschger P, Paschalis EP, Klaushofer K, Fratzl P. Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: Orientation–composition. *Journal of Structural Biology*. 2006;156(3):489-496. doi:10.1016/j.jsb.2006.06.011
110. Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*. 2004;34(3):443-453. doi:10.1016/j.bone.2003.11.003
111. McCreadie BR, Morris MD, Chen T ching, et al. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. *Bone*. 2006;39(6):1190-1195. doi:10.1016/j.bone.2006.06.008
112. Fratzl P. *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer; 2008.
113. Nashchekina YA, Starostina AA, Trusova NA, Sirotkina MY, Lihachev AI, Nashchekin AV. Molecular and fibrillar structure collagen analysis by FTIR spectroscopy. *J Phys: Conf Ser*. 2020;1697(1):012053. doi:10.1088/1742-6596/1697/1/012053
114. Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2009;395(3):829-837. doi:10.1007/s00216-009-3019-y
115. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2007;1767(9):1073-1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004
116. Petibois C, Gouspillou G, Wehbe K, Delage JP, Déléris G. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Anal Bioanal Chem*. 2006;386(7-8):1961-1966. doi:10.1007/s00216-006-0828-0
117. De Campos Vidal B, Mello MLS. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*. 2011;42(3):283-289. doi:10.1016/j.micron.2010.09.010
118. Koochakzaei A. Determination of Sulfuric Acid Effects on Degradation and Structural Changes of Gelatin Using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Peak Deconvolution Analysis. *Spectroscopy*. Published online August 1, 2023:5-11. doi:10.56530/spectroscopy.tw7684z4
119. Vermeij E, Zoon P, Van Wijk M, Gerretsen R. Microscopic Residues of Bone from Dissolving Human Remains in Acids. *Journal of Forensic Sciences*. 2015;60(3):770-776. doi:10.1111/1556-4029.12700
120. Schmidt FN, Zimmermann EA, Campbell GM, et al. Assessment of collagen quality associated with non-enzymatic cross-links in human bone using Fourier-transform infrared imaging. *Bone*. 2017;97:243-251. doi:10.1016/j.bone.2017.01.015
121. Otsubo K, Katz EP, Mechanic GL, Yamauchi M. Cross-linking connectivity in bone collagen fibrils: the carboxy-terminal locus of free aldehyde. *Biochemistry*. 1992;31(2):396-402. doi:10.1021/bi00117a013
122. Martínez Cortizas A, López-Costas O. Linking structural and compositional changes in archaeological human bone collagen: an FTIR-ATR approach. *Sci Rep*. 2020;10(1):17888. doi:10.1038/s41598-020-74993-y
123. Gourion-Arsiquaud S, Faibish D, Myers E, et al. Use of FTIR Spectroscopic Imaging to Identify Parameters Associated With Fragility Fracture. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009;24(9):1565-1571. doi:10.1359/jbmr.090414
124. Yamauchi M, Katz EP, Otsubo K, Teraoka K, Mechanic GL. Cross-Linking and Stereospecific Structure of Collagen in Mineralized and Nonmineralized Skeletal Tissues. *Connective Tissue Research*. 1989;21(1-4):159-169. doi:10.3109/03008208909050006
125. Bailey AJ, Peach CM, Fowler LJ. Chemistry of the collagen cross-links. Isolation and characterization of two intermediate intermolecular cross-links in collagen. *Biochemical Journal*. 1970;117(5):819-831. doi:10.1042/bj1170819
126. Abdel-Salam ZA, Galmed AH, Tognoni E, Harith MA. Estimation of calcified tissues hardness via calcium and magnesium ionic to atomic line intensity ratio in laser induced breakdown

- spectra. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007;62(12):1343-1347. doi:10.1016/j.sab.2007.10.033
127. Panya Panya SN, Galmed AH, Maaza M, Mothudi BM, Harith MA. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) on geological materials: Relative hardness estimation. *Materials Today: Proceedings*. 2021;36:600-603. doi:10.1016/j.matpr.2020.05.766
128. Martinez M, Baudalet M. Calibration strategies for elemental analysis of biological samples by LA-ICP-MS and LIBS – A review. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(1):27-36. doi:10.1007/s00216-019-02195-1
129. Livingston KM, Zejdlik K, Baudalet M. Reassociation of Skeletal Remains Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Anal Chem*. 2024;96(23):9478-9485. doi:10.1021/acs.analchem.4c00876
130. Skalny AV, Korobeinikova TV, Aschner M, et al. Medical application of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for assessment of trace element and mineral in biosamples: Laboratory and clinical validity of the method. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2023;79:127241. doi:10.1016/j.jtemb.2023.127241
131. Kasem MA, Russo RE, Harith MA. Influence of biological degradation and environmental effects on the interpretation of archeological bone samples with laser-induced breakdown spectroscopy. *J Anal At Spectrom*. 2011;26(9):1733. doi:10.1039/c1ja10057b

9. БИОГРАФИЈА И БИБЛИОГРАФИЈА КАНДИДАТА

Милица Марковић је рођена 13. 11. 1996. године у Београду. Основну (Браћа Барух) и средњу (I Београдска гимназија) школу завршила је у Београду са средњом оценом 5,00 на оба нивоа школовања. За постигнут изузетан општи успех у учењу и владању током школовања у основној и средњој школи била је награђена са две Вукове дипломе.

Факултет за физичку хемију Универзитета у Београду уписала је школске 2015/16 године а дипломирала 25. 7. 2019. године са средњом оценом на студијама 10,00 и оценом 10 на завршном раду. Завршни рад под називом „Електродепозиција цинка из водених раствора у присуству органских адитива: метанола, етанола, изопропил алкохола и ацетонитрила“ урадила је под менторством професора др Игора Паштија. Мастер академске студије на Факултету за физичку хемију је уписала школске 2019/20 а завршила 8. 7. 2020. године са просечном оценом 10,00. Мастер рад под називом „Примена функционалног магнетно-резонантног имицинга у утврђивању разлика у можданој активности здравих субјеката различитог пола и старости“ урадила је под менторством ванредног професора др Марка Даковића. Школске 2020/21 године уписала је докторске академске студије на Факултету за физичку хемију. Докторску тезу из области примене оптичке емисионе спектроскопије ласерски индуковане плазме (Laser Induced Breakdown Spectroscopy, LIBS) и метода молекулске спектрохемије у анализи животињских костију ради под менторством професора др Мирослава Кузмановића и доцента др Душана Димића.

Током основних и мастер академских студија била је добитник више стипендија: стипендије Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, стипендије Фонда за младе таленте „Доситеја“ и стипендије фондација „Студеница“. До заснивања радног односа је била стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије за докторске студије. Године 2020. је била добитник награде „Фондација сестре Булајић“ за најбољи дипломски рад за 2019/20 годину. Милица Марковић је добитник и Повеље Универзитета у Београду за изузетан успех током студирања, награде за најбољег студента генерације на Универзитету у Београду - Факултету за физичку хемију који је дипломирао у школској 2018/2019 години, као и годишње награда Српског хемијског друштва за 2020. годину за изузетан успех у току студија на Факултету за физичку хемију

Током студирања Милица Марковић је учествовала на више манифестација које су имале за циљ популаризацију науке: „Фестивал науке“; „Наука око нас“; „Сајам образовања“. Такође, била је учесник на три стручна усавршавања у иностранству: „*International School on Nuclear Methods for Environmental and Life Science*“ у организацији Joint Institute for Nuclear Research (JINR), Dubna, Russia (Будва, 2018. године, Црна Гора), „*Electronic Structure and Spectroscopy of Transition Metal Complexes*“, Summer School 2019, Max-Planck Institut für Kohlenforschung, Wissenschaftspark Gelsenkirchen (Немачка, септембар 2019. године) и у институту ENEA Centro Ricerche Frascati, Италија (од 29. 1. 2023. до 21. 2. 2023. године).

Од 1. 6. 2022. године Милица Марковић је запослена на Факултету за физичку хемију у звању асистент за ужу научну област Физичка хемија-спектрохемија.

Милица Марковић је до сада била коаутор на 9 научних радова, 4 рада категорије M21 и 5 радова категорије M22 (први аутор на 3 рада, 2 M21 и 1 M22), као и коаутор на 8 научних радова саопштених на конференцијама од међународног и националног значаја (4M33, 2M34, 2M64).

Од страних језика Милица Марковић говори енглески (диплома British Council-а за стечени FCE степен знања енглеског језика, *Council of Europe Level B2*) и немачки.

ОБЈАВЉЕНИ НАУЧНИ РАДОВИ И САОПШТЕЊА КАНДИДАТА

До сада објављени резултати из докторске тезе

1. Истакнути међународни часописи (M22)

1.1 Milica Marković, Dragan Ranković, Marjetka Savić, Ivana Perović, Dubravka Milovanović, Miroslav Kuzmanović, Application of laser-induced breakdown spectroscopy for the analysis of pig bones, *Measurement Science and Technology*, 35, 025502, 2024. <https://doi.org/10.1088/1361-6501/ad060d>

2. Врхунски међународни часописи (M21)

2.1 Milica Marković, Miroslav Kuzmanović, Dragan Ranković, Danica Bajuk-Bogdanović, Aleksandra Šajić, Dušan Dimić, From Structure to Strength: Analyzing the Impact of Sulfuric Acid on Pig Bone Demineralization Through FTIR, LIBS, and AAS, *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12250, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms252212250>

2.2. Milica Marković, Miroslav Kuzmanović, Igor Pašti, Danica Bajuk-Bogdanović, Dragan Ranković, Dušan Dimić, Comprehensive spectroscopic and morphological analysis of the effects exerted by different acids on Pig bone: Forensic aspect, *Forensic Science International*, 366, 112310, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112310>

3. Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M33)

3.1 Milica Marković, Dragan Ranković, Marjetka Savić-Biserčić, Milan Trtica, Jelena Savović, Miroslav Kuzmanović, Optical spectroscopy investigation of plasma induced by irradiation of animal bone with tea CO₂ laser, *15th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, September 20-24, 2021, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts 82-85.

3.2 Milica Marković, Dragan Ranković, Miroslav Kuzmanović, Dubravka Milovanović, Jelena Savović, Profilometric analysis of pig bone damage in LIBS measurements based on tea CO₂ laser, *16th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, September 26-30, 2022, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts 113-116.

3.3 Milica B. Marković, Miroslav Kuzmanović, Igor Pašti, Danica Bajuk-Bogdanović, Dragan Ranković, Dušan Dimić, Effects of hydrochloric, hydrofluoric, and acetic acid on pig bone estimated by FTIR, Raman, LIBS, and SEM-EDX, *17th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, September 23-27, 2024, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts Vol. II, 539-542 .

4. Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34)

4.1 Milica Marković, Miroslav Kuzmanović, Dušan Dimić, Spectroscopic analysis of chemically treated pig shoulder bone, *21st Young researchers' conference, Materials Science and Engineering*, Belgrade, November 29 - December 1, 2023, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts 17.

4.2 Milica Marković, Dragan Ranković, Miroslav Kuzmanović, The effect of acids on pig bone estimated by LIBS, *32nd Summer School and International Symposium on the Physics of Ionized Gases*, August 26-30, 2024, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts 142.

5. Саопштења са националних скупова штампана у изводу (M64)

5.1 Milica B. Marković, Dragan Ranković, Miroslav Kuzmanović, Application of LIBS in elemental analysis of pig shoulder bone, *9th Conference of Young Chemists of Serbia*, November 4th 2023, Novi Sad, Serbia. Book of Abstracts 102.

5.2 Milica B. Marković, Miroslav Kuzmanović, Dragan Ranković, Danica Bajuk-Bogdanović, Igor Pašti, Dušan Dimić, Effects of sulfuric acid on pig bone quality: Implications for forensic analysis, *10th Conference of Young Chemists of Serbia*, October 26th 2024, Belgrade, Serbia. Book of Abstracts 113.

Остале публикације

1. Врхунски међународни часописи (M21)

1.1. Jelica Džodić, **Milica Marković**, Dejan Milenković, Dušan Dimić, Molecular aspects of the interactions between selected benzo-diazepines and common adulterants/diluents: forensic application of theoretical chemistry methods, *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 10087, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms251810087>

1.2. Aleksandra Šajić, Dragan Ranković, Miroslav Ristić, **Milica Marković**, Jovan Ciganović, Miroslav Kuzmanović, Quantitative analysis of soda-lime glass by the LIBS technique based on the TEA CO₂ laser, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 224, 107113, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2024.107113>

2. Истакнути међународни часописи (M22)

2.1 Jelica Džodić, Dejan Milenković, **Milica Marković**, Zoran Marković, Dušan Dimić, Application of Quantum–Chemical Methods in the Forensic Prediction of Psychedelic Drugs' Spectra (IR, NMR, UV–VIS, and MS): A Case Study of LSD and Its Analogs, *Applied Sciences*, 13, 2984, 2023. <https://doi.org/10.3390/app13052984>

2.2 Violeta Jevtović, Njood Alshammari, Salman Latif, Abdulmohsen Khalaf Dhahi Alsukaibi, Jamal Humaidi, Tahani Y. A. Alanazi, Fahad Abdulaziz, Samah I. Matalka, Nebojša Đ. Pantelić, **Milica Marković**, Aleksandra Rakić, Dušan Dimić, Synthesis, Crystal Structure, Theoretical Calculations, Antibacterial Activity, Electrochemical Behavior, and Molecular Docking of Ni(II) and Cu(II) Complexes with Pyridoxal-Semicarbazone, *Molecules*, 27, 6322, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27196322>

2.3 Fahad Abdulaziz, Khulood Fahad Alabbosh, Odeh Abdullah Odeh Alshammari, Wasan Mohammed Bin Tuwalah, Tahani Y. A. Alanazi, Aleksandra Rakić, Miljan Barić, **Milica Marković**, Violeta Jevtovic, Dušan Dimić, Crystallographic Structure and Quantum-Chemical Analysis of Biologically Active Co(III)-Pyridoxal–Isothiosemicarbazone Complex, *Inorganics*, 11(12), 466, 2023. <https://doi.org/10.3390/inorganics11120466>

2.4 Miroslav Ristić, Nikola Krstevski, Dragan Ranković, **Milica Marković**, Aleksandra Šajić, Miroslav Kuzmanović, The influence of continuum lowering on the equilibrium composition of plasma: case study of laser-induced plasma on a WC–Cu target, *Plasma Physics and Controlled Fusion* 66, 125014, 2024. <https://doi.org/10.1088/1361-6587/ad8b68>

3. Саопштења са међународних скупова штампана у целини (M33)

3.1. Aleksandra Šajić, Dragan Ranković, Miroslav Ristić, **Milica Marković**, Miroslav Kuzmanović, Chemical analysis of glass by laser-induced plasma spectroscopy, The *15th Belarusian-Serbian Symposium „Physics and Diagnostics of Laboratory and Astrophysical Plasmas“*, Septembar 9-14, 2024, Minsk, Belarus. Book of Abstracts 15-18.

10. ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Име и презиме аутора: **Милица Марковић**

Број индекса 2020/302

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

СПЕКТРОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЖИВОТИЊСКИХ КОСТИЈУ КАО МОДЕЛ СИСТЕМА У ФОРЕНЗИЦИ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

11. ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора: **Милица Марковић**

Број индекса 2020/302

Студијски програм: Докторске академске студије - физичка хемија

Наслов рада: **СПЕКТРОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЖИВОТИЊСКИХ КОСТИЈУ КАО МОДЕЛ СИСТЕМА У ФОРЕНЗИЦИ**

Ментори:

др Мирослав Кузмановић, редовни професор, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

др Душан Димић, доцент, Факултет за физичку хемију, Универзитет у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

12. ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: **СПЕКТРОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ЖИВОТИЊСКИХ КОСТИЈУ КАО МОДЕЛ СИСТЕМА У ФОРЕНЗИЦИ** која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање. Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
 2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
 5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
 6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)
- (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.