



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OBSAH RIZIKOVÝCH PRVKŮ V KRMIVECH PRO PSY A KOČKY

CONTENT OF RISK ELEMENTS IN FOOD FOR DOGS AND CATS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Karolína Hrabalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1806/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Karolína Hrabalová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Obsah rizikových prvků v krmivech pro psy a kočky

Zadání bakalářské práce:

- 1) vypracujte literární rešerši k řešené problematice
- 2) stanovte množství rizikových prvků v různých variantách krmiv pro psy a kočky
- 3) zpracujte naměřená data, diskutujte dosažené výsledky
- 4) formujte závěry z provedených experimentů

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Karolína Hrabalová
studentka

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením rizikových prvků, konkrétně rtuti, arsenu, kadmia a olova v krmivech určených pro psy a kočky. Koncentrace rtuti byla stanovena pomocí techniky AAS a koncentrace arsenu, kadmia a olova byla stanovena metodou ICP-MS po mikrovlnném rozkladu vzorků s využitím minerálních kyselin. Celkem bylo analyzováno 30 vzorků krmiv. Ve většině vzorků byly koncentrace sledovaných prvků nižší než maximální přípustné hodnoty dané Nařízením Komise EU, dva vzorky požadavky nařízení nesplnily. Koncentrace rizikových prvků v krmivech, kromě arsenu nezávisela na druhu masa použitého v krmivu. Krmiva obsahující rybí maso vykazovaly prokazatelně vyšší koncentrace arsenu než krmiva s jiným masem. Vzhledem k relativně nízkému podílu masa v krmivech a vzhledem k celkově nižším koncentracím rizikových prvků v mase lze předpokládat, že za zvýšené koncentrace rizikových prvků v krmivech je zodpovědná rostlinná nebo jiná složka krmiva, případně technologie výroby krmiva.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the determination of risk elements, namely mercury, arsenic, cadmium and lead in dog and cat food. The concentration of mercury was determined using the AAS technique, and the concentration of arsenic, cadmium and lead was determined by the ICP-MS method after microwave decomposition of the samples using mineral acids. A total of 30 feed samples were analyzed. In most samples, the concentrations of monitored elements were lower than the maximum permissible values given by the EU Commission Regulation, two samples did not meet the requirements of the regulation. The concentration of risk elements in the feed, except for arsenic, did not depend on the type of meat used in the feed. Feeds containing fish meat showed demonstrably higher concentrations of arsenic than feeds with other meats. Due to the relatively low proportion of meat in feed and due to the overall lower concentrations of risk elements in meat, it can be assumed that the vegetable or other component of the feed, or the technology of feed production, is responsible for the increased concentration of risk elements in feed.

KLÍČOVÁ SLOVA

Krmivo, maso, pes, kočka, rizikové prvky, ICP-MS, AAS

KEY WORDS

Animal feed, meat, dog, cat, risk elements, ICP-MS, AAS

HRABALOVÁ, Karolína. *Obsah rizikových prvků v krmivech pro psy a kočky* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-20]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148300>.
Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce, konzultace, cenné rady a trpělivost.

Obsah

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1	Výživa psů a koček.....	6
2.1.1	Proteiny	6
2.1.2	Lipidy	6
2.1.3	Sacharidy	7
2.1.4	Minerální látky a vitaminy	7
2.2	Kontaminanty v krmivech	8
2.2.1	Olovo.....	8
2.2.2	Kadmium.....	8
2.2.3	Rtuť	9
2.2.4	Arsen	11
2.3	Legislativa	12
2.4	Chemická analýza krmiv	17
2.4.1	Odběr a úprava vzorku	17
2.4.2	Stanovení vlhkosti a sušiny	17
2.4.3	Stanovení popela	17
2.4.4	Stanovení hrubých bílkovin	17
2.4.5	Stanovení tuku.....	18
2.4.6	Sacharidy a BNLV	18
2.4.7	Stanovení obsahu vlákniny.....	19
2.4.8	Elementární analýza	19
3	PRAKTICKÁ ČÁST	22
3.1	Přístroje a zařízení	22
3.2	Použité chemikálie a standardy	22
3.3	Analyzované vzorky	22
3.4	Pracovní postupy	24
3.4.1	Příprava vzorku k analýze.....	24
3.4.2	Stanovení obsahu rtuti pomocí AMA 254.....	24
3.4.3	Stanovení obsahu rizikových prvků pomocí ICP-MS.....	24
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1	Stanovení obsahu rtuti	25

4.2	Stanovení obsahu dalších rizikových prvků	28
5	ZÁVĚR.....	34
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	35

1 ÚVOD

Psi a kočky tvoří nejpočetnější skupiny zájmových zvířat chovaných v České republice. V Evropské Unii bylo v roce 2021 chováno celkem 113 milionů koček a téměř 93 milionů psů. V České republice jsou nejvíce zastoupeni psi (2,25 milionů) a bylo odhadnuto, že alespoň jednoho psa vlastní 42 % domácností. Alespoň jedna kočka (1,15 milionů) je součástí odhadem 22 % domácností. (FEIDAF, 2021)

Nedílnou součástí chovu a péče o zvíře je samozřejmě správná výživa, která obsahuje vyvážený poměr živin odpovídající věku a zdravotnímu stavu zvířete. Každému zvířeti musí být formou krmiv zajištěn dostatečný příjem energie, tuků, bílkovin, minerálních látek a vitaminů. Většina chovatelů upřednostňuje krmiva průmyslově vyrobená, která ale kromě látek prospěšných pro zvíře obsahují i určité množství kontaminantů. Limitní obsah kontaminantů je stanoven legislativně a každé krmivo musí tuto legislativu dodržovat. Tyto látky se do krmiv mohou dostat během procesu jejich výroby nebo byly již obsaženy v mase či surovině použité pro výrobu krmiva.

Cílem této bakalářské práce je stanovit obsah rizikových prvků, olova, kadmia a rtuti v krmivech pro psy a kočky. První část práce je zaměřena na problematiku výživy psů a koček, zejména však na rizikové prvky obsažené v krmivech a na jejich vliv na zdravotní stav zvířete, dále na legislativu krmiv a na chemickou analýzu krmiv. Druhá část bakalářské práce je zaměřena na stanovení jednotlivých rizikových prvků ve vzorcích krmiv.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Výživa psů a koček

Výživa zvířete je jedním z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje jeho zdravotní stav, kondici, reprodukci a výkonnost, hraje podstatnou roli také v odolnosti vůči různým chorobám. Naopak nekvalitní výživa může zapříčinit právě větší náchylnost k chorobám a řadu nutričních poruch. Správná výživa zaručuje přísun energie a všech základních živin, tedy látek potřebných pro vývoj zvířete. U nemocných zvířat je nutné dodržovat speciální dietetické potřeby dle zdravotního stavu jedince [1].

Živiny lze rozdělit z hlediska zastupitelnosti v organismu na esenciální a neesenciální. Mezi esenciální živiny řadíme organické živiny, které jsou zároveň nositeli energie – proteiny, lipidy a sacharidy, dále sem patří i minerální látky a vitaminy [1].

2.1.1 Proteiny

Bílkoviny se obecně řadí mezi dusíkaté látky, v krmivech se mohou vyskytovat v různých formách, a to v podobě složek organických (proteiny, peptidy, volné aminokyseliny, močovina) a anorganických (dusitany a dusičnany). Bílkoviny jsou složeny z aminokyselin a plní v organismu důležité funkce, jako je stavební, transportní, enzymatická a regulující funkce. Aminokyseliny dělíme na esenciální a neesenciální, mezi esenciální aminokyseliny pro psy a kočky patří valin, leucin, izoleucin, lysin, tryptofan, methionin, arginin, histidin, fenylalanin a taurin (esenciální pro kočky) [1,2].

Ve výživě zvířat je kromě zastoupení esenciálních aminokyselin velice důležitý i poměr esenciálních a neesenciálních aminokyselin. Znalost potřeby jednotlivých aminokyselin je z výživového hlediska významnější než obsah hrubého proteinu (dusíkatých látek) [1]. Za vysoce kvalitní proteiny je možné označovat ty, které obsahují optimální poměr všech esenciálních aminokyselin [2]. Na základě dosavadních poznatků je potřeba aminokyselin zahrnuta v tabulce 1 (Tabulka 1).

Tabulka 1 Navrhovaná potřeba aminokyselin na 1 kg živé hmoty psa [1]

Arginin	0,098 g	Methionin	-
Histidin	0,034 g	Fenylalanin + tyrosin	0,141 g
Izoleucin	0,070 g	Fenylalanin	-
Leucin	0,112 g	Threonin	0,093 g
Lysin	0,121 g	Tryptofan	0,031 g
Methionin + cystin	0,081 g	Valin	0,076 g

2.1.2 Lipidy

Lipidy jsou nejvýznamnějším zdrojem energie v krmivech pro psy a kočky. Mimo zdroj energie jsou také zdrojem esenciálních mastných kyselin a jsou nosičem vitamínů rozpustných v tucích – A, D, E, K. V tucích obsažené mastné kyseliny se dělí na esenciální a neesenciální mastné

kyseliny, dále se dělí také podle chemické struktury na nasycené a nenasycené. Podle polohy dvojené vazby je možné rozdělit nenasycené mastné kyseliny na omega-9, omega-6 a omega-3 mastné kyseliny. Nejvýznamnější zástupci mastných kyselin jsou kyselina olejová (omega-9), kyselina linolová a arachidonová (omega-6), ze skupiny omega-3 mastných kyselin to jsou kyselina α -linolenová a eikosapentaenová [1].

Za jednu z nejdůležitějších esenciálních mastných kyselin je považována kyselina linolová. Na rozdíl od koček jsou psi schopni z kyseliny linolové syntetizovat další polynenasycené kyseliny, jako je kyselina arachidonová a α -linolenová. Pro kočky jsou všechny jmenované kyseliny esenciální, pro psy pouze kyselina linolová a α -linolenová [1,2]. Nedostatek kyseliny linolové vyvolává poruchy spojené s látkovou výměnou, patologické změny na kůži, může dojít k prodloužení hojení ran, poruchám zraku a k poruchám chování a psychiky zvířat. U mladých zvířat může dojít také k poklesu růstové intenzity [1].

2.1.3 Sacharidy

Sacharidy mají ve výživě funkci zejména jako pohotovný zdroj energie, pro volně žijící masožravce nejsou příliš významnou živinou. Proto je obsah sacharidů, jako je např. glykogen, v přirozených krmivech pouze zanedbatelný. V průmyslově vyráběných krmivech je obsah sacharidů podstatně vyšší, jelikož jsou do krmiv přidávány ve formě cereálií nebo cereálních produktů, tento problém se týká zejména levnějších krmiv. Protože psi nemají dostatečně vyvinutý enzymový systém pro štěpení polysacharidů, je nutné tato krmiva vhodně upravit [1]. Přestože jsou sacharidy ve výživě většinou postradatelné, mohou nastat situace, kdy je potřeba zvýšit příjem energie a zajistit alespoň jejich 20% zastoupení v krmné dávce. Dochází k tomu během energeticky náročného růstu tkání, konkrétně během růstu zvířete, březosti nebo laktace [2].

Do krmiv se přidávají suroviny bohaté na vlákninu, která má příznivý vliv na peristaltiku střev, na činnost tlustého střeva a na sliznice trávicího traktu. Nadměrný příjem vlákniny (>5 %) působí již negativně, jelikož způsobuje snížení stravitelnosti krmiva. Zastoupení vlákniny v krmivech pro psy by mělo být 2-3 % [1]. Vyšší podíl vlákniny může mít však i léčebné využití, zejména u starších psů, kdy je nutné podpořit peristaltiku střev [3].

2.1.4 Minerální látky a vitamíny

Minerální látky plní v organismu zvířete mnoho funkcí, jsou důležité pro správný vývoj kostry, podílejí se na udržování acidobazické rovnováhy a stálosti vnitřního prostředí, účastní se také tvorby hormonů, enzymů a vitamínů. Minerální látky je možné rozdělit podle jejich obsahu v krmivu na makroprvky, mikroprvky a tzv. ultramikroprvky. Mezi makroprvky řadíme ty prvky, jejichž denní spotřeba v krmivu se pohybuje řádově v g (Ca, P, Mg, Na, K, Cl a S), mikroprvky jsou obsaženy v krmivu řádově v mg (Fe, Cu, Zn aj.) a ultramikroprvky jsou obsaženy řádově v μ g (Se, Co, Mo, I, Cr aj.) [1].

Vitamíny jsou esenciální nízkomolekulární organické sloučeniny, na jejichž příjmu jsou zvířata závislá. Vitamíny lze rozdělit do dvou skupiny na základě rozpustnosti, vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K) a vitamíny rozpustné ve vodě, např. thiamin (B1), riboflavin (B2), biotin a vitamin C. Vitamíny plní v organismu významné funkce, např. jsou kofaktory enzymatických reakcí, jsou prekurzory dalších látek nebo mají antioxidační účinky [4].

2.2 Kontaminanty v krmivech

Kromě látek a prvků prospěšných pro zvíře, jsou v krmivech obsaženy i kontaminanty a látky toxické pro psa či kočku. Mezi nejvíce toxické kovy patří olovo, kadmium a rtuť, dále pak například arsen.

2.2.1 Olovo

Olovo je šedý těžký kov, který se řadí mezi první objevené toxické prvky. Největším zdrojem olova je galenit neboli sulfid olovnatý. Olovo bylo dříve mnohem více využíváno, než je tomu nyní, proto je i otrava olovem jak u zvířat, tak u lidí tedy méně častá. Přesto je nejčastější příčinou otrav zvířat v porovnání s jinými kovy.

2.2.1.1 Toxicita olova

Olovo narušuje řadu biochemických procesů díky své schopnosti vázat se na nukleofilní funkční skupiny jako je sulfanylová skupina. Navázáním dochází k inhibici různých enzymů, např. enzymů potřebných při tvorbě hemoglobinu, čímž dochází k anémii. Olovo je krví rozváděno do měkkých tkání, zejména do jater a ledvin, kde se hromadí. Odtud se pak dále distribuuje do kostní tkáně. Poločas rozpadu olova v krvi je okolo 30 dní, kdežto v kostech se $T_{1/2}$ pohybuje okolo 20 let [5,6].

Olovo je také neurotoxické, významně poškozuje určité části mozku a narušuje tím jeho funkci. Neurotoxické účinky olova bývají často spojeny s jeho schopností napodobit nebo případně utlumit funkci vápníku a tím narušit homeostázi tohoto iontu. Na základě koncentrací vápenatých iontů jsou uvolněny enzymy proteinkinázy C, které dále spouští řadu důležitých biochemických procesů. Olovo je také schopno pozměnit uvolňování neurotransmiterů, jako je dopamin či acetylcholin [5].

Klinické příznaky otravy se liší od doby expozice a množství absorbovaného olova. Nejčastěji bývá zasažen gastrointestinální trakt, centrální nervový systém a biosyntéza hemu, která vede k anémii. Neurologické příznaky zahrnují slepotu, ochablost a nekoordinovanost pohybu, která se může dále vést k svalovému třesu či záškubům. Běžnými příznaky jsou také bolest břicha, zvracení a průjem.

U zvířat trpící chronickou otravou olovem se klinické příznaky neliší od příznaků typických pro akutní otravu, nicméně nejsou příliš zřetelné. Při dlouhodobé expozici zvířata trpí bolestmi břicha, nevolností v oblasti gastrointestinálního traktu, úbytkem na váze až anorexií [5,7].

2.2.2 Kadmium

Kadmium je toxický přechodný kov vyskytující se nejčastěji ve své dvojmocné formě Cd^{2+} , například v podobě oxidu nebo síranu kademnatého. V periodické tabulce prvků se nachází vedle zinku, kterému je podobný svou chemickou povahou. Tento kov se obvykle v zemské kůře vyskytuje jako nečistota v rudách zinku nebo olova, získává se tedy jako vedlejší produkt tavení těchto dvou kovů [5,8].

V minulosti se kadmium společně s niklem využívalo k výrobě baterií, nyní se používá v televizních obrazovkách, nátěrových barvách, kosmetice a laserech. Kadmium je pro živé

organismy toxické již v poměrně malých koncentracích, řadí se mezi teratogenní, karcinogenní a mutagenní prvky [5,8].

2.2.2.1 Toxicita kadmia

Kadmium se do těla zvířete dostává zejména vdechnutím nebo požitím kontaminovaných potravin či vody. Absorpce a přenos kadmia z trávicího traktu probíhá přes vápenaté kanálky. V krvi je transportováno pomocí erytrocytů a albuminu. Kadmium se hromadí v játrech a ledvinách, kde se váže na protein metalothionein (MT), v měkkých tkáních je poté uchováno jako kadmium-MT. V této formě může být kadmium transportováno z jater do ledvin, dochází zde k uvolnění kadmia a znovu navázání na protein MT nebo dochází k poškození ledvin. Metalothioneiny hrají důležitou roli při ochraně proti poškození mozku, také udržují homeostázi zinku a mědi a chrání organismus před toxicitou těžkých kovů. Navázáním metalothioneinu na kadmium dochází k snížení hepatotoxického charakteru kadmia. [5,6].

Kadmium je svojí strukturou podobné ostatním dvojmocným kationtům, jako je vápník nebo již zmíněný zinek. Proto je kadmium schopné nahrazovat zinek spolu s dalšími dvojmocnými kationty v důležitých proteinech. Například ve varlatech může zasahovat do proteinů s navázaným zinkem a tím způsobit nekrózu či apoptózu. Kadmium poškozuje tkáň způsobením oxidativního stresu. Při vstupu do buňky vytváří Cd^{2+} komplexy s aminokyselinami, proteiny nebo peptidy obsahující SH skupiny. Příkladem je již zmíněný protein metalothionein. Tyto molekuly snižují toxické vlastnosti kadmia a chrání tak buňku před oxidativním stresem [5,6].

Kadmium je schopné ovlivnit metabolismus vápníku a způsobit tím jeho úbytek a změnu kostní tkáň. Tento kov může působit také přímo v kostní tkáni, stimuluje aktivitu osteoklastů a tím zpřičiňuje degradaci kostní matrix [6].

V případě akutní otravy příjmem kontaminovaných potravin je velice podrážděn gastrointestinální trakt, dostávají se bolesti břicha a zvracení. Nastává také selhání ledvin a s tím spojené poruchy příjmu a vylučování tekutin. Při inhalaci záleží na vdechovaném množství, po vdechnutí menší dávky dochází k podráždění dýchacích cest a k dušnosti zvířat. Po vdechnutí vyšší dávky kadmia dochází k poškození dýchacích cest, k zánětu plic, jejich fibróze, k plicnímu edému, selhání dýchání a smrti udušením [7].

Chronická otrava kadmiiem je způsobena konzumací kontaminovaných krmiv a je spojená s poškozením ledvin a vznikem osteoporózy [7,9].

2.2.3 Rtuť

Rtuť je těžký kov, který je jako jediný za pokojové teploty v kapalném stavu. Vyskytuje se ve třech formách – elementární (páry kovové rtuti Hg^0), anorganická (rtuťné Hg_2^{2+} a rtuťnaté Hg^{2+} sloučeniny) a organická. Všechny její formy jsou toxické a zároveň se od sebe liší mechanismem a svým účinkem v organismu. Za nejtoxičtější sloučeniny jsou považovány alkyl-sloučeniny, zejména ethyl- a methyl-sloučeniny. Do ovzduší se rtuť dostává jak přirozeným způsobem, vulkanickou činností nebo větrajícími horninami, tak lidským působením, konkrétně spalováním fosilních paliv a manipulací s kovovou rtuť a jejími

sloučeninami. Z atmosféry se dále dostává do vody, kde je pomocí mikroorganismů převedena do své organické formy a tím zařazena do potravinového řetězce končící většími rybami, kde se může rtuť kumulovat [10,11].

Nejznámější případ otravy rtuti se stal v druhé polovině 50. let minulého století v Minamatě a Niigatě v Japonsku. Bylo zde popsáno celkem 269 otrav methylrtutí u osob žijících a konzumujících ryby a měkkýše žijící v kontaminovaných vodách, 55 jedinců tuto otravu nepřežilo [10].

2.2.3.1 Elementární rtuť

Elementární rtuť je nebezpečná zejména ve formě par kovové rtuti, neboť kovová rtuť je ve vodě nerozpustná a z trávicího traktu se prakticky nevstřebává. Významné je vstřebávání par plicemi, při krátkodobé expozici vysokým koncentracím může být poškozen dýchací systém. Po vdechnutí se rtuť, respektive páry kovové rtuti, dostává z plic do krevního oběhu a dochází zde k jejímu rozpouštění. Díky své dobré rozpustnosti v tukách prostupuje membránami těla a je poměrně jednoduše absorbována. Po absorbování rtuti ve formě Hg^0 dochází poměrně rychle k oxidaci na rtuťnatý iont Hg^{2+} , který se dále váže na sulfanylovou skupinu aminokyselin. Rtuť se kumuluje zejména v ledvinách a v játrech. Část podílu rtuti se ukládá ve vlasech, více než 80 % je ve formě methylrtuti. Zasahuje také mozek, neboť snadno přechází hematoencefalickou membránou a způsobuje poruchy nervového systému. Je nebezpečná také pro kojící matky a jejich děti, respektive lakující zvířata a jejich mláďata, jelikož přechází do mateřského mléka. Její vylučování je však velmi pomalé a nepravidelné, v těle se může držet několik měsíců až let po skončení expozice [5,7,10].

Při akutní otravě bývají nejvíce zasaženy plíce, dochází k podráždění dýchacího traktu, konkrétně kašlu a dušnosti. Postižení CNS se projevuje neurologickými příznaky jako jsou třes a zhoršená koordinace [7].

Chronická otrava parami kovové rtuti se projevuje zejména na centrálním nervovém systému, objevuje se třes, porucha chování, ztráta paměti či nespavost. Dále může nastat stomatitida (zduření dásní, slinění, vypadávání zubů), erethismus (toxická organická psychóza, výbušnost, vzrušenost) nebo může dojít k méně častému poškození ledvin [10].

2.2.3.2 Anorganická rtuť

Pro organismus jsou nejvíce toxické rozpustné sloučeniny, např. chlorid rtuťnatý $HgCl_2$ a dusičnan rtuťnatý $HgNO_3$. Stejně jako kovová rtuť se rtuťnaté ionty v krvi vážou na -SH skupiny erytrocytů. Ionty Hg^{2+} jsou schopny přestoupit hematoencefalickou nebo placentární bariéru, ovšem ne tak snadno jako elementární rtuť. Dobře se absorbují trávicím traktem, kůží a sliznicemi. Obdobně jako kovová rtuť se soli rtuti mohou vstřebat vdechnutím v podobě prachu, dále se mohou vstřebat při požití. Rozpustné soli se absorbují v gastrointestinálním traktu a leptají sliznice. Rtuťnaté ionty se nejvíce kumulují v ledvinách, játrech, mozku a slezině. Vylučovány jsou hlavně močí a stolicí, značné množství je však vylučováno i potními, slznými, slinnými a prsními žlázami [5,10,11].

Při akutní intoxikaci rtuťnatými sloučeninami jsou nejvíce zasaženy ledviny a gastrointestinální trakt. Požití leptavých sloučenin nastávají bolesti břicha, koliky, zvracení, průjem, žíznivost až

dehydratace a šok. Důsledkem kumulace anorganických solí rtuti v mozku a v ledvinách se objevují neurologické příznaky [7].

Rtuťné ionty se od rtuťnatých liší svou menší rozpustností ve vodě, tudíž jsou i mnohem méně vstřebatelné. Z rtuťných iontů mohou však vznikat v GIT ionty rtuťnaté, které mohou být absorbovány [10].

2.2.3.3 Organická rtuť

Velmi toxické sloučeniny jsou alkylsloučeniny (methylrtuť a ethylrtuť), dále pak méně toxické aryl- a alkoxyalkylsloučeniny (fenylrtuť, metoxyethylrtuť). Organické sloučeniny rtuti nejsou nebezpečné z hlediska poškození sliznice GIT, kritickým orgánem je zejména nervová tkáň. Mohou být zasaženy také ledviny. Tyto sloučeniny jsou nebezpečné pro kojící a pro březí zvířata, neboť přecházejí do mléka a přes placentární bariéru [7].

Alkylsloučeniny rtuti

Mezi nejznámější alkylsloučeniny rtuti patří již zmíněná methylrtuť, která se vstřebává plicemi, gastrointestinálním traktem a kůží. Po absorpci se váže na sulfanylové skupiny bílkovin, aminokyselin či peptidů. Krví je poté rozváděna do tkání organismu. Methylrtuť je schopná rychle proniknout hematoencefalickou membránou a tím narušuje funkci centrálního nervového systému. Domnívá se, že narušuje transkripci DNA a syntézu proteinu [11]. Před vyloučením methylrtuti z těla dochází k její demethylaci na anorganickou rtuť [10].

Aryl- a alkoxyalkylsloučeniny rtuti

Po vstřebání aryl- a alkoxyalkylsloučenin rtuti dochází v játrech k jejich konverzi na anorganickou formu rtuti a uvolnění rtuťnatých iontů, jsou tedy méně toxické než alkylsloučeniny. Většina organické rtuti je transformována na rtuťnaté ionty během prvních 4 dnů, nejdříve se přemění metoxyethylrtuť, později fenylrtuť. Obě tyto formy organické rtuti přestupují přes hematoencefalickou membránu obdobně jako ionty Hg^{2+} [10].

Otrava organickou rtutí se projevuje hlavně postižením CNS, konkrétně rtuť narušuje koordinaci svalů, dochází k třesům a křečím, později se může dostavit i ataxie. Dále vede k sluchovým a zrakovým vadám, nejdříve rozmazané vidění a poté dochází k slepotě. Při otravě fenyl- a methoxyethylrtuti se může objevit poškození ledvin, jater a střev [6,10].

2.2.4 Arsen

Arsen je toxický, karcinogenní polokov nejčastěji vyskytující se ve své trojmocné a pětímocné formě As^{3+} a As^{5+} . Obvykle se arsen v prostředí vyskytuje v pětímocné formě, arseničné sloučeniny jsou dále methylovány půdními organismy. Trojmocný arsen se do prostředí dostává jako produkt tavení různých rud. Toxicita arsenu je dána formou, ve které se arsen nachází, arsenité As^{3+} sloučeniny i arsenité soli jsou toxicitější než arsen ve své pětímocné formě, tyto dvě formy se také liší mechanismem působení. Sloučeniny arsenu se využívají k přípravě insekticidů, herbicidů či při konzervaci dřeva. K expozici arsenem dochází zejména v průmyslu zpracování rud, což následně vede k znečištění ovzduší, půdy a vody [5,6]. Častým případem, kdy dochází k otravě arsenem je i požití kontaminované pitné vody. Velmi značná kontaminace

podzemních vod je problémem v Bangladéši, velké riziko expozice arsenem konzumací vody je odhadováno až u 50 miliónů lidí. Lidé žijící v kontaminovaných oblastech do svého těla přijmou průměrně 1017,9 µg arsenu za den, nejvíce ze zeleniny, rýže a pitné vody [12].

2.2.4.1 Toxicita arsenu

Arsen se do těla zvířete dostává především gastrointestinálním traktem, kde je absorbován až z 80–90 %, malé množství arsenu se může vstřebat i přes pokožku. Pětimocné formy arsenu jsou lépe vstřebatelné než trojmocné formy, zejména přes GIT. Po vstřebání je arsen transportován krví do všech orgánů a zejména do jater, kde se kumuluje, odtud je rozváděn do dalších tkání, jako slezina, plíce a ledviny. V těle jedince dochází k biotransformaci As^{5+} sloučenin a k následné methylovaní. Arseničnanové sloučeniny jsou redukovány pomocí arseničnanové reductázy na As^{3+} , arsenitany jsou postupně methylovány na methylarseničnan a dimethylarseničnou kyselinu. Arsen je z těla vylučován hlavně močí, velkou část moči tvoří methylované formy arsenu, trojmocné formy jsou z těla vylučovány pomaleji [5,6].

Arsenité sloučeniny způsobují především onemocnění spojené s gastrointestinální traktem. As^{3+} ionty reagují v těle se sulfanylovými skupinami proteinů a jsou schopny inhibovat enzymy navázáním se na aktivní místa enzymů. Arsenité soli inhibují alfa-keto oxidázu, která je zapojena do oxidace pyruvátu. Dále arsenitany způsobují vazodilataci neboli rozšíření cév, což může vést k poškození vlasečnic [5].

Arseničnany jsou v těle pracují jako „uncoupling agent“, molekuly schopné narušit oxidativní fosforylaci, pětimocná anorganická forma arsenu může nahradit fosfátovou skupinu v této reakci. Organické sloučeniny arseničnanů vyvolávají neurologické příznaky, není však u nich známý mechanismus působení. Domnívá se, že mohou narušovat funkci vitamínu B1 a B6, což by způsobovalo demyelinizaci [5].

Přestože se arsen řadí mezi pro člověka karcinogenní látky, pro zvířata karcinogenní není. Experimentálně se nedalo prokázat spojitost mezi arsenem a rakovinou u zvířat [5].

Mezi klinické příznaky akutní otravy arsenem patří bolest břicha, kolika, zvracení, slabost, průjem, následně kolaps a smrt. Pokud by otrava arsenem probíhala přes pokožku, na kůži by se objevily puchýře, edém, kůže by mohla popraskat a dojít ke krvácení. Jedinci trpící chronickou otravou arsenem běžně mívají potíže s dušností a únavou. U otravy organickými sloučeninami arsenu je možné pozorovat neurologické příznaky, jako je například nekoordinovaný pohyb [5].

2.3 Legislativa

Krmiva pro zvířata v zájmovém chovu samozřejmě podléhají právní regulaci. Dle definice v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009, se jako zvíře v zájmovém chovu považuje „jakékoliv zvíře, které náleží k druhům, které jsou běžně živeny a drženy lidmi pro jiné než hospodářské účely, nikoli však konzumovány“.

Pro výrobce krmiv v České republice je nutné dodržovat zákon o krmivech, který zpracovává směrnice Komise EU, Rady EU, dále směrnice Evropského parlamentu a Rady a nařízení

Evropského Parlamentu a Rady. Provedení některých ustanovení zákona o krmivech je vypsáno ve vyhlášce č. 20/2020 Ministerstva zemědělství.

Výrobci krmiv pro zvířata v zájmovém chovu podléhají schválení příslušnou krajskou veterinární správou, dle článku 24 již zmíněného nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009. Po schválení veterinární správou musí výrobce nahlásit svoji činnost na Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Na ústavu je vyřizována žádost o schválení provozu a následně registrace provozu. Obsah žádosti schválení a registrace provozu se od sebe příliš neliší, jsou v nich uvedeny informace o provozovateli, a hlavně informace o krmivu a jeho výrobě. Veterinární správa se zaměřuje na zdravotní nezávadnost produktu, ÚKZÚZ se věnuje správnému označování, kvalitě a složení krmiv [13][13].

Výrobce s úspěšně ověřeným provozem může poté provádět výrobu krmiv, nicméně stále se na něj vztahují předpisy upravující kvalitu produktu. Je tedy nutno, aby bylo dbáno na obsah stanovených látek a na dodržování limitů nežádoucích látek, aby byla zajištěna zdravotní nezávadnost a nedocházelo k poškození zvířat [14]. Pro tyto účely provádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský vzorkování a laboratorní zkoušení krmiv, a to buď v rámci úřední kontroly anebo na vyžádání [14].

Legislativa rozlišuje 4 druhy krmiv pro zájmová zvířata (psy nebo kočky) [13]:

- Syrová krmiva neboli BARF
- Zpracovaná krmiva – tepelně ošetřena zahřátím celé hmoty produktu (nejméně na teplotu 90 °C) nebo vyrobena z obdobně tepelně ošetřených surovin živočišného původu
- Konzervovaná krmiva – musí být podrobena tepelnému ošetření, při kterém je dosaženo hodnoty Fc rovné minimálně 3
- Žvýkáci pamlsky – podrobena ošetření dostačující ke zničení patogenních organismů včetně salmonel

Množství nežádoucích látek v krmivech, které jsou přípustné, jsou uvedeny a řešeny v předpisech Evropské Unie, konkrétně ve Směrnici Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech a následně například v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 183/2005 ze dne 12. ledna 2005, kterým se stanoví požadavky na hygienu krmiv.

Příloha Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES, ve které byly stanoveny hodnoty maximálního obsahu arsenu, kadmia, olova a rtuti atd., byla několikrát změněna nařízením Komise EU. Maximální obsah jednotlivých nežádoucích látek v mg/kg krmiva s 12 % obsahem vlhkosti je zaznamenán v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2 Maximální obsah nežádoucích látek v mg/kg krmiva s 12 % obsahem vlhkosti ^{1,2}

Nežádoucí látky	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12 % obsahem vlhkosti
Olovo	Krmné suroviny s výjimkou:	10
	– pícnin,	30
	– fosfátů, vápenatých mořských řas a zvápenatělých mořských lastur,	15
	– uhličitanu vápenatého; uhličitanu vápenato-hořečnatého,	20
	– kvasnic.	5
	Doplňkové látky z funkční skupiny sloučenin stopových prvků s výjimkou:	100
	– oxidu zinečnatého,	400
	– oxidu manganatého, uhličitanu železnatého, uhličitanu měďnatého.	200
	Doplňková krmiva s výjimkou:	10
	– minerálních krmiv,	15
– přípravků krmiv na dlouhodobé podávání určených ke zvláštním účelům výživy s koncentrací stopových prvků vyšší než stonásobek stanoveného maximálního obsahu v kompletních krmivech.	60	
Kompletní krmiva	5	
Rtuť	Krmné suroviny s výjimkou:	0,1
	– ryb, jiných vodních živočichů a z nich získaných výrobků,	0,5 ³
	– uhličitanu vápenatého; uhličitanu vápenato-hořečnatého.	0,3

¹ Nařízení Komise (EU) č. 1275/2013, ze dne 6. prosince 2013

² Nařízení Komise (EU) 2015/186, ze dne 6. února 2015

³ „Maximální obsah se vztahuje na čerstvou hmotnost u ryb, jiných vodních živočichů a z nich získaných výrobků určených k výrobě krmných směsí pro psy, kočky, okrasné ryby a kožešinová zvířata.“

Tabulka 3 Pokračování tabulky 2 (Tabulka 2)

Nežádoucí látky	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12 % obsahem vlhkosti
Rtuť	Krmné směsi s výjimkou:	0,1
	– minerálních krmiv,	0,2
	– krmných směsí pro ryby	0,2
	– krmných směsí pro psy, kočky a kožešinová zvířata.	0,3
Kadmium	Krmné suroviny rostlinného původu.	1
	Krmné suroviny živočišného původu.	2
	Krmné suroviny minerálního původu s výjimkou:	2
	– fosfátů.	10
	Doplňkové látky z funkční skupiny sloučenin stopových prvků s výjimkou:	10
	– oxidu měďnatého, oxidu manganatého, oxidu zinečnatého a síranu manganatého monohydrátu.	30
	Doplňková krmiva s výjimkou:	0,5
	– minerálních krmiv	5
	– s obsahem <7 % fosforu	0,75 nad 1 % fosforu, s maximem 7,5
	– s obsahem ≥7 % fosforu	0,75 nad 1 % fosforu, s maximem 7,5
– doplňkových krmiv pro zvířata v zájmovém chovu,	2	
– přípravků krmiv na dlouhodobé podávání určených ke zvláštním účelům výživy s koncentrací stopových prvků vyšší než stonásobek stanoveného maximálního obsahu v kompletních krmivech.	15	
Kompletní krmiva s výjimkou:	0,5	
– kompletních krmiv pro zvířata v zájmovém chovu.	2	

Tabulka 4 Pokračování tabulky 3 (Tabulka 3)

Nežádoucí látky	Produkty určené ke krmení zvířat	Maximální obsah v mg/kg (ppm) v krmivu s 12 % obsahem vlhkosti
Arsen	Doplňková krmiva s výjimkou:	4
	– minerálních krmiv	12
	– doplňkových krmiv pro zvířata v zájmovém chovu s obsahem ryb, jiných vodních živočichů a z nich získaných výrobků a/nebo moučky z mořských řas a krmných surovin získaných z mořských řas	10
	– přípravků krmiv na dlouhodobé podávání určených ke zvláštním účelům výživy s koncentrací stopových prvků vyšší než stonásobek stanoveného maximálního množství	30
	Kompletní krmiva s výjimkou:	2
	– kompletních krmiv pro ryby a kožešinová zvířata	10
	– kompletních krmiv pro zvířata v zájmovém chovu s obsahem ryb, jiných živočichů a z nich získaných výrobků a/nebo moučky z mořských řas a krmných surovin získaných z mořských řas	10

Mezi aktuálně platná nařízení a předpisy, kterými se výrobci krmiv musí řídit patří [14]:

- Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, jak vyplývá z pozdějších změn.
- Vyhláška č. 20/2020 Sb., o provedení některých ustanovení zákona o krmivech.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 767/2009 o uvádění na trh a používání krmiv.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě.
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES o nežádoucích látkách v krmivech.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech.
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat.

2.4 Chemická analýza krmiv

2.4.1 Odběr a úprava vzorku

Podstatným krokem k provedení správné analýzy je odběr a úprava vzorku. Úprava vzorku krmiva se provádí v závislosti na struktuře a konzistenci. Jednou z možností úprav vzorku je mineralizace, která je vhodná pro stanovení minerálních látek. Během mineralizace dojde k odstranění organických látek a zkoncentrování vzorku, provádí se nejčastěji za sucha nebo za mokra. Mineralizace na suché cestě je založena na vyžihání vzorku, zatímco při mineralizace na mokré cestě na vzorek působí zředěné nebo koncentrované kyseliny, např. HNO_3 , HCl , nebo H_2SO_4 [17].

2.4.2 Stanovení vlhkosti a sušiny

Stanovení sušiny a vlhkosti je jednou z nejpoužívanějších metod analýzy potravinářských produktů. Vlhkost roztoku je dána obsahem vody ve vzorku, ať už ve formě rozpouštědla, vodu absorbovanou v buněčných membránách nebo vázanou na složky potravin. Celková sušina vzorku je označována jako hmotnost všech složek vzorku po odstranění vlhkosti, rozpustná sušina obsahuje organické a anorganické látky rozpustné ve vodě, nerozpustná obsahuje látky nerozpustné – polysacharidy, lipidy a proteiny [17].

Sušina se stanovuje vysušením při 103 ± 2 °C, u krmiv s vlhkostí nad 17 % je nutné provést předsušení při 50–60 °C. Problémem sušení některých krmiv je ztráta těkavých látek obsažených v krmivu, tím dochází k zkreslení výsledků analýzy [3].

Pro stanovení obsahu vody se využívají různé fyzikálně-chemické a chemické metody. Vodu lze stanovit volumetricky podle Karl-Fischera, metoda je založena na reakci vzorku rozpuštěném v methanolu s třísložkovým činidlem obsahující jód, oxid siřičitý a pyridin [17]. Z fyzikálně-chemických metod se využívá destilace, měření vodivosti nebo dielektrické konstanty [17].

2.4.3 Stanovení popela

Jako popel označujeme všechny anorganické látky obsažené v krmivu, odečtením jeho podílu od celkového obsahu sušiny získáme obsah organické hmoty krmiva. Popel se stanovuje vázkovou metodou, jako celkový zbytek minerálních látek po vyžihání vzorku v platinovém kelímku. Nejprve dochází k zuhelnatění vzorku a poté se provede žihání při 500–600 °C, jehož výsledkem je bílý popel [3]. Minerální látky nerozpustné v kyselině chlorovodíkové se označují jako písek. Koncentrace jednotlivých prvků se poté stanovují příslušnou analytickou metodou [3].

2.4.4 Stanovení hrubých bílkovin

Obsah hrubých bílkovin odpovídá obsahu všech dusíkatých látek obsažených v krmivech. Mezi dusíkaté látky patří všechny látky mající ve své molekule dusík, tedy bílkovinné a nebílkovinné látky. Příkladem nebílkovinných látek jsou volné aminokyseliny, amidy, aminy, alkaloidy, dusitany, dusičnany, purinové a pyrimidinové báze, nukleové kyseliny, amoniak, amonné soli a močovina. Bílkovinný dusík neboli hrubá bílkovina se stanoví z celkového obsahu dusíku v krmivech vynásobený faktorem 6,25. Vypočítaná hodnota vychází z předpokladu, že průměrný obsah bílkovin v potravině je 16 % ($100/16 = 6,25$) [3]. Faktor závisí na složení

aminokyselin ve vzorku, pro různé potraviny se liší, např. u živočišných mouček se používá hodnota 6,0 [16]. Koncentrace dusíkatých látek se stanovuje metodou dle Kjeldahla, která je založena na alkalimetrické nebo acidimetrické titraci vzorku po předchozí mineralizaci kyselinou sírovou. Během mineralizace se za přítomnosti kyseliny sírové a katalyzátorů (Se, HgO, CuO, bezvodý CuSO₄, ...) převádí přítomný dusík na síran amonný. Přidáním hydroxidu sodného se v alkalickém prostředí ze síranu uvolní amoniak, který je poté předestilován do kyseliny sírové (alkalimetrie) nebo kyseliny borité (acidimetrie). V případě alkalimetrie se nadbytek kyseliny sírové stanoví titrací odměrným roztokem hydroxidu sodného, u acidimetrie se vzniklý boritan amonný stanoví titrací odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové. V obou případech se vzorek titruje na Tashirův indikátor, směs methylčerveně a methylenové modři [3,17].

2.4.5 Stanovení tuku

Tuky obsažené v krmivech se stanovují metodou dle Soxhleta, která využívá jejich rozpustnosti v nepolárních rozpouštědlech. Vzorek je společně s nadbytkem sušené sádry (písku) vložen do extrakční patrony a poté je extrahován rozpouštědlem, nejčastěji se extrakce provádí hexanem nebo diethyletherem. Po extrakci je rozpouštědlo odpařeno a vyextrahovaný tuk se zváží [17]. Metoda dle Soxhleta se využívá pro stanovení celkového tuku, vyextrahovaný zbytek tedy obsahuje triacylglyceroly, mastné kyseliny, fosfolipidy, lipoproteiny, steroly, vosky apod. Pro stanovení jednotlivých frakcí tuku se využívají různé analytické metody, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie nebo spektrofotometrické stanovení [17].

Tuky lze stanovit také z hlediska kvality, a to využitím metod hodnotící kvalitu tuku na základě různých parametrů. Jedním z ukazatelů kvality je číslo kyselosti, které udává obsah volných mastných kyselin v tuku. Po rozpuštění tuku v nepolárním rozpouštědle je vzorek titrován odměrným roztokem hydroxidu draselného na fenolftalein. Číslo kyselosti se vyjadřuje jako hmotnost hydroxidu draselného v mg potřebné na neutralizaci volných mastných kyselin v 1 g tuku [17]. Peroxidové číslo vyjadřuje stupeň žluklosti tuku, což odpovídá množství peroxidů na 1 g tuku. Přítomné peroxidy se stanovují jodometricky, nadbytek jodu se stanovuje zpětnou titrací na thiosíran [17]. Dalším číslem určující stupeň žluklosti je para-anisidinové číslo, které udává obsah aldehydů v tuku, stanovení probíhá spektrofotometricky. Kvalita tuku se stanovuje také podle jodového čísla, čísla zmýdelnění a thiobarbiturového čísla [17].

2.4.6 Sacharidy a BNLV

Sacharidy obsažené v krmivech jsou tvořeny vlákninou a tzv. bezdusíkatými látkami výtažkovými (BNLV), které jsou tvořeny zejména nestrukturálními sacharidy, tedy škrobem a cukry. V kosterní svalovině je nejvíce zastoupený hlavně glykogen, který slouží jako zásoba energie. Obsah složky BNLV se stanovuje nepřímou, vypočítá se z hodnot získaných po stanovení ostatních složek krmiva. Výpočet se provádí z výsledků po stanovení základních živin, tj. vlhkosti, dusíkatých látek, tuku, vlákniny a popela [3].

Pro stanovení obsahu škrobu v krmivech se využívá polarimetrická metoda dle Ewerse, během které se působením kyseliny chlorovodíkové převede škrob do roztoku. Roztok se zahřívá na vodní lázni a poté je provedeno číření dle Carreze, za použití hexykyanoželeznatanu draselného a síranu zinečnatého. Připravený vzorek se následně stanovuje polarimetricky [17].

Během stanovení sacharidů je možné využít i důkazové reakce, na příklad důkazové reakce redukujících cukrů – důkaz Fellinghových nebo Tollensovým činidlem [17].

2.4.7 Stanovení obsahu vlákniny

Vláknina zahrnuje směs celulózy, hemicelulóz a nestravitelných inkrustujících látek, jako je např. lignin a kutin. Jedná se o sacharidy, které se nacházejí v buněčné stěně rostlinných buněk. Základní analytickou metodou pro stanovení obsahu vlákniny v krmivech je tzv. Hennenberg-Stohmanova metoda, během které se vláknina stanovuje vážkově po kyselé a alkalické hydrolýze daného vzorku. Kyselá hydrolýza probíhá povařením vzorku v roztoku kyseliny sírové, pro alkalickou hydrolýzu se využívá roztok hydroxidu draselného. Z pevného zbytku se stanoví obsah popela spálením v muflové peci při 550 °C, následně se hmotnost popela odečte od pevného zbytku [3]. Hemicelulózy a lignin se částečně rozpustí při kyselé a alkalické hydrolýze, proto hrubá vláknina obsahuje především celulózu [18,19].

Tato základní metoda stanovení obsahu vlákniny je pro účely výživy psů a koček dostačující, nicméně pomocí další analýzy je možné stanovit přesnější obsah vlákniny, konkrétně obsah acidodetergentní (celulóza a lignin) a neutrálně detergentní vlákniny (celkový obsah celulózy, hemicelulóz a ligninu). K podrobnému stanovení všech typů vlákniny se využívá např. přístroj Ankom [18,19].

2.4.8 Elementární analýza

Pro stanovení obsahu významných prvků v krmivech se využívají spektrální metody, zejména hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a optická/atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a atomová absorpční spektrometrie (AAS).

2.4.8.1 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Hmotnostní spektrometrie se řadí mezi nejdůležitější analytické metody používané pro stanovení prvkového složení látek, je často využívána pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. Vhodná je zejména pro stanovení stopových či ultrastopových prvků, a to díky své vysoké citlivosti, nízkým detekčním limitům a malé spotřebě používaného vzorku. Jedná se o separační techniku, která převádí vzorek ionizací na plynnou fázi, vzniklé ionty jsou separovány na základě hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z) [20,21].

Běžný hmotnostní spektrometr se skládá ze vstupu vzorku, iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. K ionizaci vzorku se využívá zmíněný iontový zdroj, k nejrozšířenějším, běžně používaným ionizačním zdrojům patří indukčně vázaný plazmový výboj (Inductively Coupled Plasma – ICP). Plazma vzniká v plazmovém hořáku působením radiofrekvenčního generátoru a indukční cívky v proudu argonu, plazma dosahuje teploty až 10 000 K [20]. V mlžné komoře je pomocí zmlžovače a již zmíněného argonu tvořen z kapalného vzorku aerosol, frakce vzorku se dostává do hořáku. Většina prvků má ionizační energii menší než argon, je možné je pomocí plazmatu ionizovat a vytvořit tak kladně nabitě ionty. Kationty jsou přes děličku tlaku vedeny do iontové optiky, kde dochází k jejich oddělení od nenabitých částic. Z iontové optiky se nabitě částice přemístí do hmotnostního analyzátoru,

kde dochází k samotnému rozdělení podle podílu m/z . Využívá se celá řada hmotnostních analyzátorů, např. kvadrupól nebo analyzátor doby průletu (TOF) [21,22].

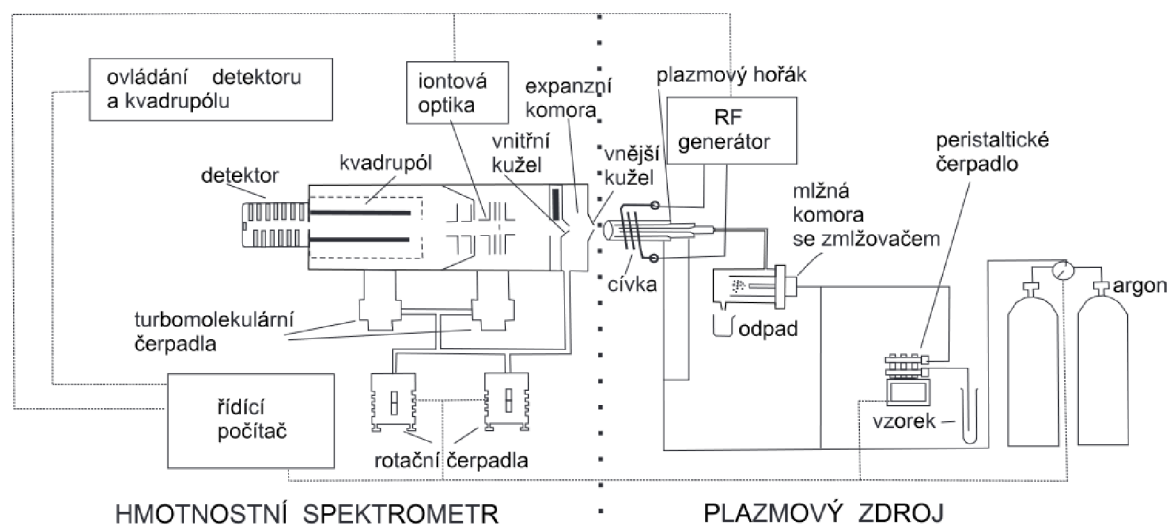
Kvadrupól využívá čtyři tyčové elektrody, na které jsou přiváděny složky stejnosměrného napětí a radiofrekvenčního pole. Hodnoty těchto veličin určují trajektorie, po kterých se budou pohybovat pouze ionty s určitým poměrem hmotnost/náboj. Nastavení veličin se postupně mění a detektor je tak schopen zachytit ionty o různých hodnotách m/z [21].

TOF (Time Of Flight) patří mezi nejjednodušší a nejrychlejší analyzátoři. Celý vzorek je akcelerován současně a všem iontům je dodaná stejná energie, ionty s nižší hmotností budou mít vyšší rychlost a těžší ionty se budou pohybovat pomaleji. Ionty tedy dopadají na detektor postupně od nejlehčích po nejtěžší [21].

Po separaci iontů dle poměru hmotnost/náboj jsou ionty zachyceny detektorem, ve kterém dochází k převedení proudu iontů na proud elektronů. Nejběžněji využívanými detektory v hmotnostní spektrometrii jsou Faradayův pohár/miska, elektronový násobič a dynoda [21]. Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem znázorňuje Obrázek 1.

Výstupem měření na hmotnostním spektrometru je hmotnostní spektrum, což je označováno jako závislosti relativní intenzity iontového proudu na podílu hmotnost/náboj.

ICP-MS je metoda určená k analýze prvků, které nelze stanovit jinými spektrálními metodami (např. Zn, Nb, W), dále pro již zmíněné stopové a ultrastopové koncentrace toxických či esenciálních prvků, např. Pb, Cd, As, Tl nebo I a Se [22].



Obrázek 1 Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem [18]

2.4.8.2 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem patří mezi nejpoužívanější metody elementární analýzy. Principem optické (atomové) emisní spektrometrie je sledování emise elektromagnetického záření volnými atomy. Atomová emisní spektra jsou čárová spektra excitovaných volných atomů obsahující vyzářené vlnové délky o různé intenzitě. Emise záření atomů vzorku nastává po dodání potřebné energie pomocí budícího zdroje. Budící zdroj převede vzorek z tuhé či kapalně fáze do plynné fáze, ve které dochází k atomizaci a excitaci

elektronů. Budící zdroj může být v podobě jiskrového výboje (opakující se krátkodobý výboj) nebo obloukového výboje (trvalý výboj mezi dvěma elektrodami). V případě ICP-OES je budícím zdrojem indukčně vázaný plazmový výboj. Optický emisní spektrometr se skládá ze tří základních částí: z budícího zdroje, optického spektrometru a detektoru. Rozklad záření budícího zdroje na jednotlivé spektrální čáry a měření jejich intenzity probíhá v optickém spektrometru. Vstupní štěrbina spektrometru, určuje šířku vstupujícího záření. Úpravou její polohy se provádí přesné nastavení spektrometru (např. při změně teploty). Záření jednotlivých vlnových délek dopadá na výstupní štěrbinu, kde se pomocí fotonásobiče měří intenzita záření [21].

Pro stanovení prvků pomocí ICP-OES se využívají analytické čáry, což jsou nejintenzivnější čáry spektra daného prvku. Vlnové délky těchto čar jsou tabelovány. Pro kvalitativní analýzu se identifikují spektrální čáry vzorku, využívá se zejména porovnání spektra neznámého vzorku se spektrem standardního vzorku. Kvantitativně se vzorek stanovuje na základě intenzity čar, intenzita čáry je úměrná počtu atomů prvku v plazmě [21].

2.4.8.3 Atomová absorpční spektroskopie (AAS)

Stejně jako přechází metody ICP-MS a ICP-OES, se atomová absorpční spektrometrie řadí mezi nejpoužívanější analytické metody prvkové analýzy. Tato metoda je založena na absorpci vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Absorbovat se bude pouze ta část záření, která svými vlnovými délkami odpovídá rezonančním čarám [21]. Probíhá měření absorbance vzorku, která je podle Bouguer-Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci stanovovaného prvku. Pro stanovení se používá metoda kalibrační křivky, kdy je získaná hodnota absorbance vzorku porovnána se standardním roztokem [21].

Atomový absorpční spektrometr se skládá ze čtyř základních částí – zdroje záření, atomizátoru, mřížkový monochromátoru a detektoru (fotonásobič). Jako čárový zdroj se používá speciální výbojka s dutou katodou, katoda je tvořena stejným kovem, který se stanovuje. Pro každý prvek je tedy nutno použít vlastní výbojku. Výbojka je plněna vzácným plynem, nejčastěji argonem či neonem [21].

Atomizátor je absorpční prostředí, které slouží k převedení vzorku do stavu volných atomů. Běžně se používá plamenový nebo elektrotermický atomizátor. Plamenový atomizátor je založen na principu pneumatického zmlžování nebo ultrazvukového rozprašování vzorku. Aerosol vzorku je po smíchání s topným plynem a oxidovadlem vnášen do plamene, kde se atomizuje. Elektrotermický atomizátor je tvořen grafitovou trubicí vyhřívanou elektrickým proudem. Malé množství vzorku je nanášeno na vnitřní stěnu trubice a dochází k jeho atomizaci. Některé prvky (As, Sb, Pb, atd.) se převádí na těkavé hydridy v hydridovém generátoru, které jsou poté proudem argonu unášeny do atomizátoru [21].

Atomová absorpční spektrometrie je vhodná pro elementární kvantitativní analýzu prvků o nízkých koncentracích. Jedná se o velice citlivou metodu s citlivostí jednotek $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, kterou lze využít pro stanovení až 60 prvků periodické tabulky [21].

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

- Ruční tyčový homogenizátor T18 Ultra Turax, Verkon
- Analytické digitální váhy
- Mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 Mega, Milestone
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem 7500 Series, Agilent
- Atomový absorpční spektrometr AMA 254, Altec spol. s r.o.
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.2 Použité chemikálie a standardy

- Kyselina dusičná, 65% (ANALYTIKA spol. s r.o.)
- Peroxid vodíku, 30% (ANALYTIKA spol. s r.o.)
- Destilovaná voda
- Standardní roztok Kadmium v kyselině dusičné (2%), koncentrace $1,000 \pm 0,002$ g/l, ANALYTIKA spol. s r.o.
- Standardní roztok Arsen v kyselině dusičné (0,5mol/l), koncentrace 1,000 g/l, Merck KGaA
- Standardní roztok Olovo v kyselině dusičné (2–3%), koncentrace 1,000 g/l, Merck KGaA

3.3 Analyzované vzorky

Pro experimentální část bakalářské práce byly vybrány vzorky krmiv pro kočky a psy v podobě kapsiček, konzerv a vaniček, dostupných v běžných prodejních řetězcích. Vzorky byly následně rozděleny do kategorií na základě obsaženého druhu masa:

Vzorky obsahující hovězí maso:

- Paté/paštika s hovězím masem a játry – kompletní krmivo určené dospělým kočkám, vanička, firma K-Classic,
- Paté/paštika s hovězím masem a játry – kompletní krmivo určené pro dospělé psy, vanička, firma K-Classic
- Paštika s hovězím masem – kompletní krmivo určené pro dospělé kočky, vanička, firma Coshida
- Bezobilné dušené filetky – kompletní krmivo pro dospělé kočky, kapsička, firma Shelma
- Paštika s kousky hovězího masa – kompletní krmivo určené pro dospělé kočky, kapsička, firma dm-drogerie markt
- Kousky s hovězím v omáčce – kompletní krmivo pro dospělé psy, kapsička, firma Reno
- Dein Bestes vanička hovězí – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma dm-drogerie markt
- Kousky s hovězím v omáčce – kompletní krmivo pro dospělé psy, konzerva, firma Reno
- Kousky s hovězím a zeleninou v omáčce – kompletní krmivo pro dospělé psy, kapsička, firma Pet Specialist
- Kompletní mokré krmivo s hovězím – pro dospělé kočky, kapsička, firma Whiskas

Vzorky obsahující drůbeží maso:

- Paté/paštika s kachním a kuřecím masem – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma K-Classic
- Ragú s drůbežím ve smetanové omáčce – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma Coshida
- Paštika s drůbežím masem – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma Coshida
- Bezobilné dušené filetky bohaté na krůtí maso – kompletní krmivo pro dospělé kočky, kapsička, firma Shelma
- Kuřecí a kachní maso ve šťávě – kompletní krmivo určené pro dospělé kočky, kapsička, firma dm-drogerie markt
- Kousky s krůtím a kachním v omáčce – kompletní krmivo pro dospělé psy, kapsička, firma Reno
- Dein Bestes kuře v omáčce – kompletní krmivo určené pro dospělé kočky, vanička, firma dm-drogerie markt
- Kousky s kuřecím v omáčce – kompletní krmivo pro dospělé kočky, konzerva, firma Reno
- Paštika s kuřecím a játry – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma Pet Specialist
- Friskies Junior s kuřetem ve šťávě – kompletní krmivo pro koťata, vhodné také pro březí kočky, kapsička, firma Purina

Vzorky obsahující rybí maso:

- Paté/paštika s lososem (MSC⁴) a treskou (MSC) – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma K-Classic
- Paštika s rybou (MSC bělice) – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma Coshida
- Bezobilné dušené filetky s treskou – kompletní krmivo pro dospělé kočky, kapsička, firma Shelma
- Bezobilné dušené filetky s lososem – kompletní krmivo pro dospělé kočky, kapsička, firma Shelma
- Dein Bestes losos a pstruh – kompletní krmivo pro kočky, vanička, firma dm-drogerie markt
- Dein Bestes vanička s lososem (MSC) – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma dm-drogerie markt
- Paštika s lososem a rybím olejem (MSC) – kompletní krmivo pro dospělé kočky, vanička, firma K-Classic
- Kousky s rybou v omáčce – kompletní krmivo pro dospělé kočky, konzerva, firma Reno
- Kousky s treskou a krevetami v želé – kompletní krmivo pro dospělé kočky, kapsička, firma Pet Specialist
- Kompletní krmivo pro dospělé kočky s lososem – přizpůsobeno i pro sterilizované/kastrované kočky, kapsička, firma Purina

⁴ MSC – certifikace udržitelného rybolovu udělovaná organizací Marine Stewardship Council

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Příprava vzorku k analýze

Pro analýzu na atomovém absorpčním spektrometru AMA 254 byl obsah jednotlivých vzorků homogenizován tyčovým homogenizátorem. Takto homogenizované vzorky byl připraveny k měření.

Pro analýzu pomocí ICP-MS byly vzorky opět homogenizovány tyčovým homogenizátorem. Následně bylo z každého vzorku na analytických vahách odváženo 0,5 g do nádob pro mikrovlnný rozklad. Dále bylo ke každému vzorku přidáno automatickou pipetou 5 ml 65% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Nádoby byly uzavřeny a upevněny do rotoru a vloženy do mikrovlnného rozkladného systému. Takto rozložené vzorky byly kvantitativně převedeny do 50 ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou po rysku.

3.4.2 Stanovení obsahu rtuti pomocí AMA 254

Stanovení celkového obsahu rtuti bylo provedeno na přístroji Advanced Mercury Analyser AMA 254. Tento jed noučelový atomový spektrometr se využívá pro stanovení celkového obsahu rtuti v pevných i kapalných vzorcích, aniž by byla nutná předchozí úprava vzorku v podobě rozkladu či separace. Princip spektrometru spočívá ve vytváření par kovové rtuti tepelným rozkladem vzorku ve spalovací trubici. Následně dochází k zachycení a zkoncentrování par na zlatém amalgamátoru a k tepelnému vypuzení. Páry kovové rtuti jsou poté unášeny nosným plynem, konkrétně kyslíkem, na detektor, kde dochází k detekci emitujícího záření a následně absorbcí záření. Orientační limit detekce je 0,01 ng Hg [24].

Z každého homogenizovaného vzorku bylo odváženo zhruba 100 mg na analytických vahách přímo na kovovou lodičku. Navážka vzorku byla průměrně 118,3 mg. Kovová lodička byla vložena do spalovací trubice přístroje. Vzorek byl nejdříve sušen po dobu 60s při teplotě 120 °C, poté byl vzorek spalován v kyslíkové atmosféře při konstantní teplotě po dobu 150s. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních.

3.4.3 Stanovení obsahu rizikových prvků pomocí ICP-MS

Metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem byly měřeny 3 prvky – arsen, kadmium a olovo. Byl použit konkrétně Agilent 7500ce ORS-ICP-MS, kdy ORS je zkratka pro „octopole reaction system“. ORS se nachází mezi iontovou optikou a kvadrupólovým hmotnostním analyzáto rem. Díky ORS a vyšší účinnosti osmi tyčovým elektrodám dochází k snížení polyatomické interference [25].

Připravené roztoky vzorků byly z odměrných baněk přefiltrovány stříkačkovými filtry přímo do plastových zkumavek a byly následně analyzovány. Analýza vzorku probíhala ve dvou měřeních. V prvním měření byl přístroj kalibrován na standardy zkoumaných prvků o koncentracích 1 µg/l, 10 µg/l a 100 µg/l. V druhé měření byl kalibrační bod 1 nahrazen bodem 50, koncentrace standardních roztoků tedy byly 10 µg/l, 50 µg/l a 100 µg/l.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části byly sledovány vybrané rizikové prvky v krmivech určených pro kočky a psy. Byly stanoveny koncentrace jednotlivých prvků a výsledky byly porovnány s maximálními povolenými hodnotami uvedenými v příslušných nařízeních Komise EU. Bylo sledováno, zda naměřené koncentrace nepřekročily tyto předepsané hodnoty, v jakých vzorcích byly koncentrace prvků nejvyšší a nejmenší a jestli měl druh masa obsaženého v produktech vliv na naměřené koncentrace.

4.1 Stanovení obsahu rtuti

Naměřené koncentrace rtuti ve vzorcích krmiva jsou uvedeny v následujících tabulkách na základě obsaženého masa. Naměřené koncentrace byly přepočítány na koncentraci v krmivu o vlhkosti 12 %, jelikož Nařízení udává maximální přípustné koncentrace v mg/kg krmiva o 12% vlhkosti. Vlhkost vzorku byla zjištěna z vlhkosti uvedené na obalu krmiva.

Tabulka 5 Obsah rtuti v krmivech obsahující hovězí maso

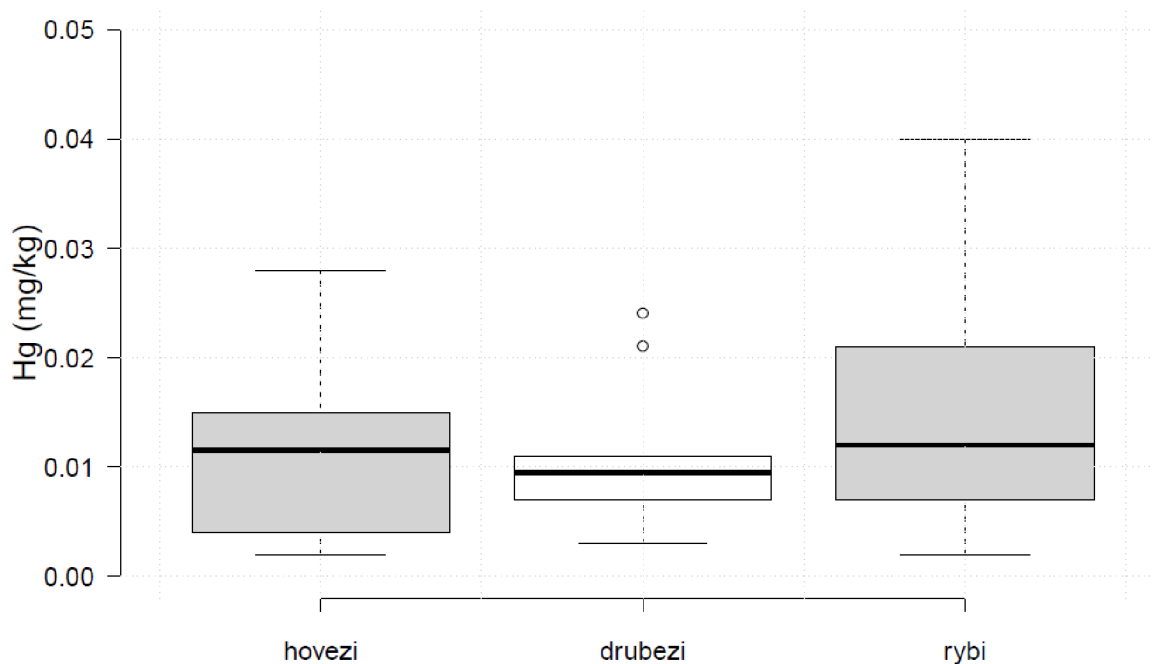
Vzorek	Vlhkost	Koncentrace rtuti [mg/kg]
Paté – kočky, K-Classic	80 %	0,104
Paté – psi, K-Classic	80 %	0,013
Paštika – kočky, Coshida	81 %	0,010
Bezobilné dušené filetky – kočky, Shelma	81 %	0,028
Paštika s kousky – kočky, dm-drogerie markt	81 %	0,013
Kousky v omáčce – psi, Reno, kapsička	82 %	0,015
Dein Bestes – kočky, dm-drogerie markt	82 %	0,005
Kousky v omáčce – kočky, Reno, konzerva	82 %	0,003
Kousky se zeleninou – psi, Pet specialist	82,5 %	0,004
Kompletní mokré krmivo – kočky, Whiskas	84,5 %	0,002

Tabulka 6 Obsah rtuti v krmivech obsahující drůbeží maso

Vzorek	Vlhkost	Koncentrace rtuti [mg/kg]
Paté s kachním a kuřecím – kočky, K-Classic	80 %	0,024
Ragú s drůbežím – kočky, Coshida	82 %	0,011
Paštika s drůbežím – kočky, Coshida	81 %	0,021
Bezobilné dušené filetky s krůtím, kočky, Shelma	81 %	0,009
Kuřecí a kachní maso – kočky, dm-drogerie markt	83 %	0,010
Kousky s krůtím a kachním – psi, Reno, kapsička	82 %	0,007
Dein Bestes kuře – kočky, dm-drogerie markt	83 %	0,010
Kousky s kuřecím – kočky, Reno, konzerva	82 %	0,003
Paštika s kuřecím – kočky, Pet Specialist	81 %	0,008
Friskies Junior kuře – koťata, Purina	82,5 %	0,003

Tabulka 7 Obsah rtuti v krmivech obsahující rybí maso

Vzorek	Vlhkost	Koncentrace rtuti [mg/kg]
Paté s lososem a treskou – kočky, K-Classic	80 %	0,040
Paštika s rybou – bělice – kočky, Coshida	81 %	0,009
Bezobilné dušené filetky s treskou – kočky, Shelma	81 %	0,023
Bezobilné dušené filetky s lososem – kočky, Shelma	81 %	0,017
Dein Bestes losos a pstruh – kočky, dm-drogerie markt	83 %	0,007
Dein Bestes losos – kočky, dm-drogerie markt	81,5 %	0,015
Paštika s lososem – kočky, K-Classic	80 %	0,009
Kousky s rybou – kočky, Reno	82 %	0,002
Kousky s treskou a krevetami – kočky, Pet Specialist	82 %	0,021
Kompletní krmivo s lososem – kočky, Purina	82 %	0,003



Obrázek 2 Porovnání koncentrace rtuti v krmivech obsahující různý druh masa

Nařízení Komise Evropské Unie udává maximální přípustné hodnoty rtuti v různých typech krmiv, doplňkových či kompletních. U krmných směsí pro psy, kočky a kožešinová zvířata je limitní hodnota 0,3 mg/kg [15]. Žádný ze vzorků tuto limitní hodnotu nepřekonal, všechny splňují dané nařízení. Nejvyšší naměřený obsah rtuti (0,104 mg/kg krmiva o vlhkosti 12 %) byl stanoven ve vzorku Paté pro kočky s hovězím masem od firmy K-Classic. Koncentrace rtuti ve vzorku byla až o řád vyšší než u všech ostatních vzorků, směrodatná odchylka naměřené koncentrace před přepočtem na 12% vlhkost činila 0,009 mg/kg. Tento vzorek obsahoval kromě 5 % hovězího masa z celkového podílu i 5 % jater, jelikož se anorganická rtuť kumuluje v ledvinách a játrech, může mít obsah jater ve vzorku vliv na konečný obsah rtuti. Druhou nejvyšší naměřenou hodnotou byla koncentrace rtuti ve vzorku Paté s lososem a treskou pro kočky od firmy K-Classic 0,040 mg/kg. Odchylka od stanovené koncentrace u zbylých dvaceti devíti vzorků dosahovala průměrně 0,00016 mg/kg. Podobný rozsah koncentrace rtuti v krmivech publikovali i Luippold a Gustin [26]. Průměrná koncentrace rtuti v této studii byla 0,043 mg/kg. Přestože nedošlo k překročení limitních hodnot, nejvyšší obsah rtuti v každé skupině masa byl naměřen u vzorků od firmy K-Classic (Paté pro kočky s příslušným druhem masa).

Nejnižší koncentrace byla naměřena shodně ve dvou vzorcích, Kousky s rybou pro kočky od firmy Reno a Kompletní mokré krmivo s hovězím masem pro kočky od firmy Whiskas, 0,002 mg/kg krmiva o 12% vlhkosti.

Bylo předpokládáno, že nejvyšší koncentrace rtuti budou obsaženy ve vzorcích z rybího masa, to z důvodu zmíněné možné kumulace rtuti v rybách v kapitole Rtuť (2.2.3). Průměrný obsah rtuti ve vzorcích obsahující rybí maso byl 0,0146 mg/kg, což je více než u drůbežního masa

(medián 0,0106 mg/kg), ale menší než koncentrace v krmivech obsahující hovězí maso (medián 0,0197 mg/kg). Hodnota mediánu u vzorků s hovězím masem je ovlivněna nejvyšší stanovenou hodnotou s velkou odchylkou (0,104±0,009 mg/kg). Srovnání koncentrace rtuti v krmivech obsahující různý druh masa uvádí Obrázek 2.

Koncentrace rtuti v mase bývá obecně nejvyšší v případě ryb. Pokud vyloučíme dravé ryby, koncentrace rtuti nepřesahuje ve svalovině ryb 0,1 mg/kg. Koncentrace rtuti v kuřecím mase, ale i v hovězím mase obvykle nepřesahuje 0,003 mg/kg [27,28,29].

Je důležité zmínit, že obsah masa ve většině vzorcích činil 4 % z celkového obsahu masa a výrobků živočišného původu, nešlo o výrobky, kde by převažoval obsah použitého masa nebo ryby, a to také hrálo určitou roli v naměření nízkých koncentrací rtuti, zejména u vzorku obsahující rybí maso.

4.2 Stanovení obsahu dalších rizikových prvků

Naměřené koncentrace arsenu, kadmia a olova u jednotlivých vzorků jsou uvedeny v následujících tabulkách. Tabulky jsou opět rozděleny podle typu masa použitého v krmivu. Naměřené koncentrace prvků byly přepočítány stejně jako v případě koncentrací rtuti na vzorek o 12% vlhkosti. Vlhkost vzorku byla určena z deklarované hodnoty vlhkosti na obalu krmiva.

Tabulka 8 Koncentrace arsenu, kadmia a olova v krmivech obsahující hovězí maso

Vzorek	Vlhkost	As [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Pb [mg/kg]
Paté – kočky, K-Classic	80 %	0,425	0,213	3,375
Paté – psi, K-Classic	80 %	0,413	0,194	3,800
Paštika – kočky, Coshida	81 %	0,649	0,210	2,372
Bezobilné dušené filetky – kočky, Shelma	81 %	0,381	0,111	8,069
Paštika s kousky – kočky, dm-drogerie markt	81 %	0,209	0,050	0,416
Kousky v omáčce – psi, Reno, kapsička	82 %	0,545	0,048	0,185
Dein Bestes – kočky, dm-drogerie markt	82 %	0,370	0,045	0,186

Tabulka 9 Pokračování tabulky 8 (Tabulka 8)

Vzorek	Vlhkost	As [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Pb [mg/kg]
Kousky v omáčce – psi, Reno, konzerva	82 %	0,098	0,185	0,262
Kousky se zeleninou – psi, Pet specialist	82,5 %	0,149	0,015	0,659
Kompletní mokré krmivo – kočky, Whiskas	84,5 %	0,080	0,454	0,425

Tabulka 10 Koncentrace arsenu, kadmia a olova v krmivech obsahující drůbeží maso

Vzorek	Vlhkost	As [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Pb [mg/kg]
Paté s kachním a kuřecím – kočky, K-Classic	80 %	0,464	0,543	2,138
Ragú s drůbežím – kočky, Coshida	82 %	0,308	0,101	1,215
Paštika s drůbežím – kočky, Coshida	81 %	0,677	0,190	1,203
Bezobilné dušené filetky s krůtím, kočky, Shelma	81 %	0,301	0,063	1,802
Kuřecí a kachní maso – kočky, dm-drogerie markt	83 %	0,187	0,032	0,652
Kousky s krůtím a kachním – psi, Reno, kapsička	82 %	0,146	<0,002	0,272
Dein Bestes kuře – kočky, dm-drogerie markt	83 %	0,071	<0,002	0,197
Kousky s kuřecím – kočky, Reno, konzerva	82 %	0,100	0,031	0,389
Paštika s kuřecím – kočky, Pet Specialist	81 %	0,228	0,133	0,424
Friskies Junior kuře – koťata, Purina	82,5 %	0,657	0,049	0,635

Tabulka 11 Koncentrace arsenu, kadmia a olova v krmivech obsahující rybí maso

Vzorek	Vlhkost	As [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Pb [mg/kg]
Paté s lososem a treskou – kočky, K-Classic	80 %	2,313	0,194	2,442
Paštika s rybou – bělice – kočky, Coshida	81 %	1,261	0,223	1,016
Bezobilné dušené filetky s treskou – kočky, Shelma	81 %	2,499	0,091	1,109
Bezobilné dušené filetky s lososem – kočky, Shelma	81 %	1,013	0,256	5,206
Dein Bestes losos a pstruh – kočky, dm-drogerie markt	83 %	0,115	0,002	0,149
Dein Bestes losos – kočky, dm-drogerie markt	81,5 %	0,378	0,037	0,302
Paštika s lososem – kočky, K-Classic	80 %	0,397	<0,005	<0,163
Kousky s rybou – kočky, Reno	82 %	0,194	0,038	<0,185
Kousky s treskou a krevetami – kočky, Pet Specialist	82 %	1,904	<0,005	0,606
Kompletní krmivo s lososem – kočky, Purina	82 %	0,236	0,043	0,762

Maximální přípustná hodnota arsenu v kompletních krmivech je 2 mg/kg krmiva o 12% vlhkosti, v kompletních krmivech pro zvířata v zájmovém chovu s obsahem ryb, jiných živočichů a z nich získaných výrobků je 10 mg/kg krmiva [15]. Všechny vzorky obsahující hovězí nebo drůbeží maso limitní hodnotu 2 mg/kg splňují, stejně tak vzorky s rybím masem nepřesahují hranici 10 mg/kg krmiva. Obsah arsenu byl průměrně nejvyšší v krmivech obsahující rybí maso (medián 1,031 mg/kg). Koncentrace arsenu v těchto krmivech byla třikrát vyšší než v krmivu s hovězím masem (0,332 mg/kg) i než v krmivu s drůbežím masem (0,314 mg/kg). Podobného výsledku dosáhli i Kim et al. [30], tedy značně vyšší koncentrace arsenu v krmivu s rybím masem než s masem drůbežím či hovězím. Důvodem je akumulace arsenu v rybách v kontaminovaných vodách, ale i ve vodách málo či vůbec neznečištěných [31]. Nejvyšší naměřená koncentrace arsenu byla 2,499 mg/kg krmiva ve vzorku Bezobilné dušené filetky s treskou pro kočky od firmy Shelma.

U vzorků obsahující hovězí a drůbeží maso obsah arsenu nepřesáhl 1 mg/kg, nejvyšší naměřená koncentrace arsenu v krmivu s drůbežím masem byla 0,677 mg/kg ve vzorku Paštika s kuřecím pro kočky od firmy Coshida, druhou nejvyšší koncentraci měl vzorek s hovězím masem od stejné firmy (0,649 mg/kg krmiva). K podobným výsledkům došli i Kelly et al., v jejichž práci byla zaznamenána nejvyšší koncentrace arsenu v krmivu 0,790 mg/kg [32]. Nejnižší obsah

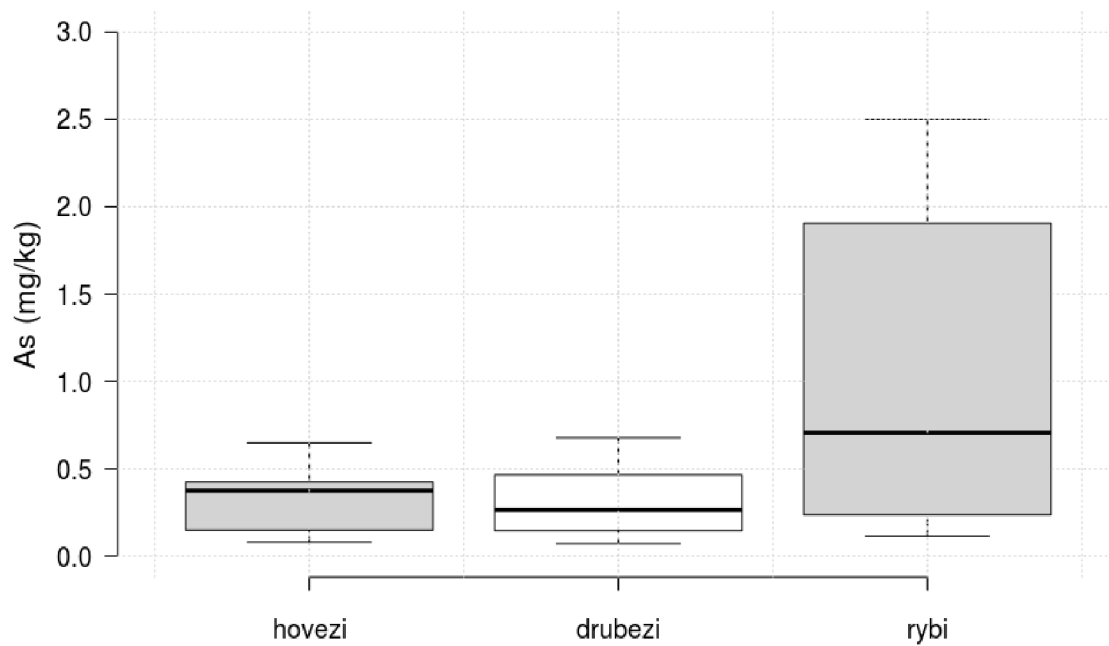
arsenu byl zaznamenán v krmivu s drůbežím masem, 0,071 mg/kg ve vzorku Dein Bestes kuře pro kočky od firmy dm-drogerie markt.

Nařízení Komise Evropské Unie udává maximální povolené koncentrace kadmia v kompletních krmivech pro zvířata v zájmovém chovu 2 mg/kg krmiva [16]. Všech třicet vzorků splnilo limitní hodnotu danou nařízením. U čtyř vzorků nebyla stanovena přesná koncentrace, neboť obsah kadmia byl pod limitem detekce použité metody. Obsah kadmia byl u vzorků obsahující hovězí maso celkově vyšší (medián 0,153 mg/kg) než u vzorků s rybím nebo drůbežím masem. V krmivu s drůbežím masem byly naměřeny nejnižší koncentrace kadmia (medián 0,089 mg/kg). Nejvyšší koncentrace kadmia byla stanovena ve vzorku Paté s kachním a kuřecím od firmy K-Classic, 0,543 mg/kg krmiva. Průměrná koncentrace kadmia ve všech krmivech (medián 0,127 mg/kg) odpovídala maximální naměřené koncentraci ve studii Kelly et al. (0,130 mg/kg) [32].

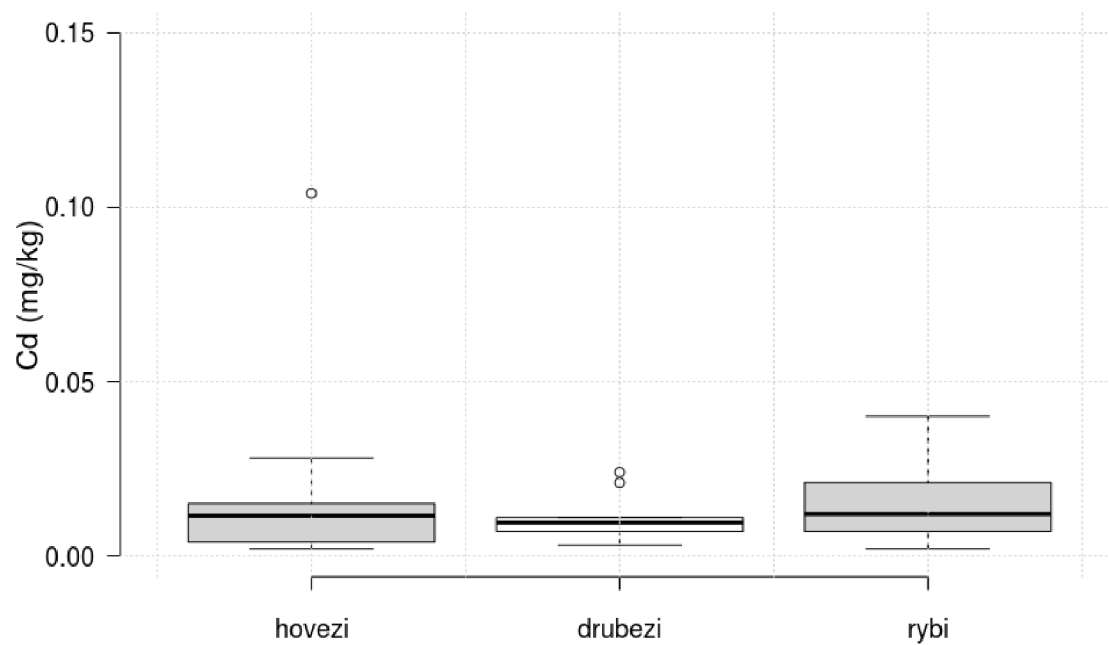
Maximální přípustný obsah olova v kompletních krmivech je 5 mg/kg krmiva o vlhkosti 12 % [15]. Dva vzorky z celkových třiceti překročili tuto hodnotu a nebylo u nich tedy dodrženo nařízení. Jedná se o produkty firmy Shlema s hovězím a rybím masem, u Bezobilných dušených filetek s hovězím pro kočky byla naměřena koncentrace 8,069 mg/kg a u Bezobilných filetek s lososem pro kočky byl obsah olova 5,206 mg/kg. Oba zmíněné produkty, i všechny produkty firmy Shlema, mají větší obsah masa než u zbylých vzorků. V kapsičce s hovězím masem je 40,6 % hovězího masa ve filetkách, ve vzorku s lososem je 14 % lososa ve filetkách. Tento vyšší obsah masa může mít vliv na změřené koncentrace olova ve vzorcích.

Nejvyšší koncentrace u vzorku, který splňuje limit daný nařízením byla naměřená u Paté s hovězím pro psy od firmy K-Classic. V tomto produktu je kromě 5% obsahu hovězího masa i 5 % jater, olovo se stejně jako rtuť hromadí v játrech a ledvinách, proto může mít tento obsah jater ve vzorku vliv na naměřenou koncentraci olova. U dvou vzorků obsahující rybí maso nebyla určena přesná koncentrace olova, neboť obsah olova v krmivu byl pod limitem detekce použité metody. Ve vzorcích obsahující hovězí maso byly naměřeny značně vyšší koncentrace olova (medián 1,975 mg/kg) než ve vzorcích s drůbežím masem (medián 0,893 mg/kg). Obsah olova ve vzorcích obsahující rybí maso byl průměrně 1,449 mg/kg krmiva. Ke stejnému závěru došli i Kim et al. [32], krmiva obsahující hovězí maso měla znatelně vyšší koncentrace olova než krmiva s drůbežím či rybím masem. V této bakalářské práci byla naměřena až desetkrát vyšší koncentrace olova (medián 1,439 mg/kg) než ve studii Kelly et al. [32]. Nejnižší koncentrace olova byla určena u produktu Dein Bestes losos a pstruh pro kočky od firmy dm-drogerie markt (0,149 mg/kg). Porovnání koncentrací arsenu, kadmia a olova v krmivech obsahující různý druh masa znázorňují Obrázek 3, Obrázek 4 a Obrázek 5.

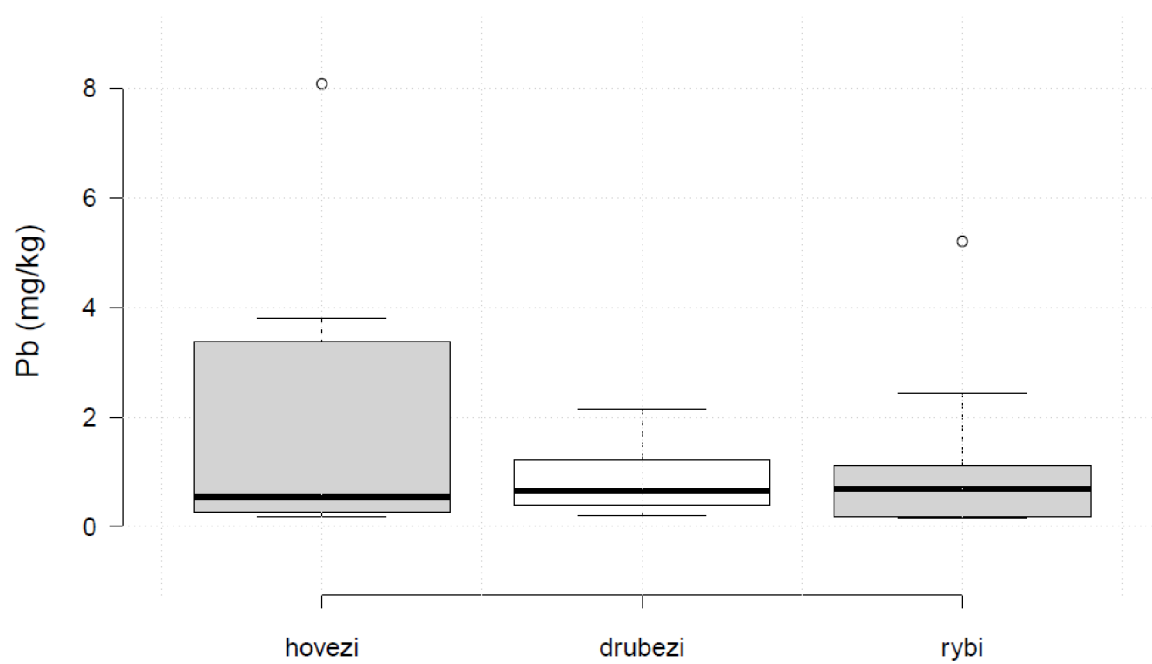
Koncentrace olova v kuřecím může dosahovat až 0,013 mg/kg. V hovězím mase bylo nalezeno až 0,09 mg/kg olova. V rybím mase je koncentrace olova běžně kolem 0,02 mg/kg. V případě kadmia koncentrace v hovězím mase dosahuje až 0,03 mg/kg, v kuřecím mase byly nalezeny koncentrace kadmia od 0,001 do 0,005 mg/kg. V rybím mase je až 0,01 mg/kg kadmia. Koncentrace arsenu v rybách je poměrně často sledována a pohybuje se v jednotkách, maximálně v desítkách mg/kg. Koncentrace arsenu v jiném druhu masa je těžké dohledat, ale zpravidla nepřesahuje 0,001 mg/kg [33,34,35,36].



Obrázek 3 Porovnání koncentrace arsenu v krmivech obsahující různý druh masa



Obrázek 4 Porovnání koncentrace kadmia v krmivech obsahující různý druh masa



Obrázek 5 Porovnání koncentrace olova v krmivech obsahující různý druh masa

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá laboratorním stanovením rizikových prvků v krmivech určených pro psy a kočky. Konkrétně byla analyzována rtuť, arsen, kadmium a olovo. Získané výsledky z analýzy krmiv byly porovnány s maximálními přípustnými hodnotami daným příslušným Nařízením Komise Evropské Unie. Krmiva byla vybírána na základě obsaženého masa. Cílem bylo získat krmiva obsahující hovězí, drůbeží, anebo rybí maso. Za účelem porovnání jednotlivých výrobců byly vybírány od jednoho výrobce všechny tři požadované druhy masa, ne vždy to však bylo možné. Krmiva se řadila mezi mokrá kompletní krmiva, tedy kapsičky, konzervy a vaničky. Všechny vzorky byly vybírány v běžných obchodních řetězcích.

Nařízením Komise EU 2015/186 udává maximální přípustný obsah rtuti v krmivech. Žádný ze zkoumaných vzorků nepřesahoval maximální přípustnou hodnotu stanovenou tímto nařízením. Vyšší naměřené koncentrace rtuti obsahovaly krmiva s hovězím masem, nejvyšší obsah rtuti byl zjištěn v Paté s hovězím masem pro kočky od firmy K-Classic, a to 0,104 mg/kg krmiva o vlhkosti 12 %. Vzorek obsahoval kromě hovězího masa i játra, obsah jater mohl mít vliv na vyšší koncentraci rtuti z důvodu její kumulace v játrech a ledvinách. U vzorků obsahující ryby byly zaznamenány koncentrace průměrně nižší než u krmiv s hovězím masem, ale vyšší než u krmiv s drůbežím. Nejvyšší koncentrace rtuti ve všech druzích masa byly naměřeny v produktech firmy K-Classic.

Nařízením Komise EU 1275/2013 udává rovněž maximální přípustný obsah arsenu, kadmia a olova v krmivech. Všechny vzorky splňovaly maximální povolené množství arsenu dané nařízením EU. Nejvyšší průměrná koncentrace arsenu byla naměřena ve vzorcích obsahující rybí maso, která byla až třikrát vyšší než obsah arsenu v hovězím a drůbežím masem. Nejvyšší obsah arsenu byl v Bezobilných dušených filetkách s treskou pro kočky od firmy Shlema, a to 2,499 mg/kg krmiva. Produkty firmy Coshida dosáhly nejvyšší naměřené koncentrace ve dvou ze třech druhů masa.

Žádný z třiceti vzorků nepřesáhl maximální přípustnou hodnotu kadmia v krmivech. Některá krmiva obsahovala kadmium v množství, které bylo pod limitem detekce použité metody. Ve vzorcích obsahující hovězí maso byly koncentrace kadmia průměrně vyšší než u krmiv s drůbežím nebo rybím masem. Nejvyšší koncentrace byla 0,543 mg/kg ve vzorku Paté s kachním a kuřecím pro kočky od firmy K-Classic.

Dva vzorky překročily maximální přípustnou hodnotu olova danou nařízením EU, jednalo se o produkty od firmy Shelma, konkrétně Bezobilné filetky s hovězím, obsah 8,069 mg/kg, a Bezobilné filetky s lososem, s obsahem 5,206 mg/kg krmiva. Nejvyšší obsah olova, který však splňuje nařízení EU, byl naměřen u Paté s hovězím a játry od firmy K-Classic. Játra obsažená v krmivu mohla mít opět vliv na koncentraci olova z důvodu jeho kumulace v játrech, podobně jako u rtuti. U produktů firmy K-Classic byly naměřeny nejvyšší, avšak stále povolené koncentrace olova ve všech třech druzích masa.

Obsah všech sledovaných prvků v maso (ať už rybím, hovězím nebo drůbežím) je obecně relativně nízký. Krmiva navíc obsahují maso v relativně malé hmotnostní koncentraci. Zvýšený obsah sledovaných prvků v krmivech tedy poukazuje na skutečnost, že kontaminace může pocházet z jiných zdrojů (z rostlinné složky krmiva), nebo z procesu výroby krmiva.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SUCHÝ, P., E. STRAKOVÁ a P. SUCHÝ ml. *Veterinářství: Výživa psů, potřeba živin a dietetické účinky krmiv* [online]. 57. 2007 [cit. 2023-01-26]. ISSN 05068231.
- [2] GROSS, Kathy L., Dennis E. JEWELL, Ryan M. YAMKA a William D. SCHOENHERR. Macronutrients. In: HAND, Michael S., Craig D. THATCHER, Rebecca L. REMILLARD, Phillip ROUDEBUSH a Bruce J. NOVOTNY. *Small Animal Clinical Nutrition* [online]. 5th ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2010, s. 66-104 [cit. 2023-01-26]. ISBN 978-0615297019. Dostupné z: https://s3.amazonaws.com/mmi_sacn5/2019/SACN5_5.pdf.
- [3] SKŘIVANOVÁ, Eva. *Praktická cvičení z výživy psů a koček*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2018. ISBN 978-80-21.
- [4] WEDEKIND, Karen J., Lauren KATS, Shiguang YU, Inke PAETAU-ROBINSON a Christopher COWELL. Micronutrients: Minerals and Vitamins. In: HAND, Michael S., Craig D. THATCHER, Rebecca L. REMILLARD, Philip ROUDEBUSH a Bruce J. NOVOTNY. *Small Animal Clinical Nutrition* [online]. 5th ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2010, s. 107-124 [cit. 2023-01-26]. ISBN 978-0615297019. Dostupné z: https://s3.amazonaws.com/mmi_sacn5/2019/SACN5_6.pdf.
- [5] GUPTA, Ramesh C. *Veterinary toxicology*. Amsterdam: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-12-370467-2.
- [6] KLAASSEN, Curtis D. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* [online]. 7. New York City: McGraw-Hill, 2007 [cit. 2022-11-24]. ISBN 0071470514. Dostupné z: https://jawaidzai.files.wordpress.com/2013/09/casarett_and_doull_s_toxicology-the_basic_science_of_poisons_7th_edition_2008.pdf.
- [7] ŠIROKÁ, Zuzana, Zdeňka SVOBODOVÁ, Petr MARŠÁLEK, Nikola HODKOVICOVÁ a Josef VÁCLAVÍK. *Poruchy zdraví související s otravami zvířat* [online]. Brno, 2018 [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/116825192-Poruchy-zdravi-souvisejici-s-otravami-zvirat.html>. Skripta. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
- [8] BERNHOFT, Robin A. Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, **2013**(394652), 1-7 [cit. 2022-11-24]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/394652.
- [9] NEATHERY, M.W. a W.J. MILLER. Metabolism and Toxicity of Cadmium, Mercury, and Lead in Animals: A Review. *Journal of Dairy Science* [online]. 1975, **58**(12), 1767-1781 [cit. 2022-11-24]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84785-0.
- [10] PRÉDA, Luboš. *Rtuť a její sloučeniny v životním prostředí*. České Budějovice, 2007. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta.
- [11] BERNHOFT, Robin A. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. *Journal of Environmental and Public Health* [online]. 2012, **2012**(460508), 1-10 [cit. 2022-11-24]. ISSN 1687-9805. Dostupné z: doi:10.1155/2012/460508.
- [12] AHMAD, Sk Akhtar, Manzurul Haque KHAN a Mushfiqul HAQUE. Arsenic contamination in groundwater in Bangladesh: implications and challenges for healthcare policy. *Risk Management and Healthcare Policy* [online]. 2018, **11**, 251-261 [cit. 2023-04-24]. ISSN 1179-1594. Dostupné z: doi:10.2147/RMHP.S153188

- [13] Státní Veterinární Správa: Krmiva pro zvířata v zájmovém chovu (petfood). *Státní Veterinární Správa* [online]. [cit. 2022-11-27]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/krmiva-vzp-asanace/krmiva-pro-zajmova-zvirata/>.
- [14] Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
- [15] Nařízení Komise (EU) 2015/186 ze dne 6. února 2015, kterým se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES, pokud jde o maximální obsahy arsenu, fluoru, olova, rtuti, endosulfanu a semen druhu Ambrosia.
- [16] Nařízení Komise (EU) č. 1275/2013 ze dne 6. prosince 2013, kterým se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES, pokud jde o maximální obsahy arsenu, kadmia, olova, dusitanů, hořčičného oleje těkavého a škodlivých botanických nečistot.
- [17] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-864-9402-0.
- [18] SKŘIVANOVÁ, Eva. *Praktická cvičení z výživy psů a koček*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2018. ISBN 978-80-213-2841-9.
- [19] ŠTERCOVÁ, Eva, Eva STRAKOVÁ, Lucie RUSNÍKOVÁ a Petra HUDEČKOVÁ. *Chemická analýza krmiv: Multimediální studijní materiál*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012.
- [20] BECKER, Johanna Sabine. *Inorganic Mass Spectrometry* [online]. Chichester: Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-01200-0.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [22] MIHALJEVIC, M., L. STRNAD a O. SEBEK. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* [online]. 2004, 15.04.2004, **98**(3), 123-130 [cit. 2022-11-28]. Dostupné z: http://www.chemickelisty.cz/docs/full/2004_03_02.pdf.
- [23] What does the blue MSC label mean?. *Marine Stewardship Council* [online]. Londýn, ©2023 [cit. 2023-04-24]. Dostupné z: <https://www.msc.org/>
- [24] Analyzátor rtuti AMA 254. *Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova: Laboratoře geologických ústavů* [online]. Praha [cit. 2023-04-28]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/geologie/laboratore/laboratore-a-metody/analyzator-rtuti-ama-254>
- [25] WOODS, Glenn. *Direct Elemental Analysis of Gasoline by Agilent 7500ce ORS ICP-MS* [online]. Stockport: Agilent Technologies, 2005 [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-4147EN.pdf>
- [26] LUIPPOLD, Adriel a Mae Sexauer GUSTIN. Mercury concentrations in wet and dry cat and dog food. *Animal Feed Science and Technology* [online]. 2016, **222**, 190-193 [cit. 2023-05-13]. ISSN 03778401. Dostupné z: doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.021
- [27] NAWROCKA, Agnieszka, Maciej DURKALEC, Józef SZKODA, Aleksandra FILIPEK, Mirosława KMIĘCIK, Jan ŻMUDZKI a Andrzej POSYNIĄK. Total mercury levels in the muscle and liver of livestock and game animals in Poland, 2009–2018. *Chemosphere* [online]. 2020, **258** [cit. 2023-05-20]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127311
- [28] SHAH, A.Q., T.G. KAZI, J.A. BAIG, H.I. AFRIDI, G.A. KANDHRO, M.B. ARAIN, N.F. KOLACHI a S.K. WADHWA. Total mercury determination in different tissues of broiler chicken by using cloud point extraction and cold vapor atomic absorption

- spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2010, **48**(1), 65-69 [cit. 2023-05-20]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2009.09.016
- [29] DIVIŠ, Pavel. Stanovení obsahu celkové rtuti v rybách z obchodní sítě České republiky. *Maso*. 2016, 27(5), 52-55.
- [30] KIM, Hyun-Tae, John P. LOFTUS, Sabine MANN a Joseph J. WAKSHLAG. Evaluation of Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury Contamination in Over-the-Counter Available Dry Dog Foods With Different Animal Ingredients (Red Meat, Poultry, and Fish). *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2018, **5** [cit. 2023-05-13]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2018.00264
- [31] CULIOLI, Julia-Laurence, Serge CALENDINI, Christophe MORI a Antoine ORSINI. Arsenic accumulation in a freshwater fish living in a contaminated river of Corsica, France. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2009, **72**(5), 1440-1445 [cit. 2023-05-13]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2009.03.003
- [32] KELLY, David G., Steven D. WHITE a Ron D. WEIR. Elemental composition of dog foods using nitric acid and simulated gastric digestions. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, **55**, 568-577 [cit. 2023-05-14]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2013.01.057
- [33] ULUOZLU, Ozgur Dogan, Mustafa TUZEN, Durali MENDIL a Mustafa SOYLAK. Assessment of trace element contents of chicken products from turkey. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2009, **163**(2-3), 982-987 [cit. 2023-05-20]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.050
- [34] GONZÁLEZ-WELLER, D., L. KARLSSON, A. CABALLERO, F. HERNÁNDEZ, A. GUTIÉRREZ, T. GONZÁLEZ-IGLESIAS, M. MARINO a A. HARDISSON. Lead and cadmium in meat and meat products consumed by the population in Tenerife Island, Spain. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2006, **23**(8), 757-763 [cit. 2023-05-20]. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/02652030600758142
- [35] RUDY, Mariusz. *Correlation of lead, cadmium and mercury levels in tissue and liver samples with age in cattle* [online]. 2009, **26**(6), 847-853 [cit. 2023-05-20]. ISSN 1944-0049. Dostupné z: doi:10.1080/02652030902835747
- [36] JUREŠA, D. a M. BLANUŠA. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2003, **20**(3), 241-246 [cit. 2023-05-20]. ISSN 0265-203X. Dostupné z: doi:10.1080/0265203021000055379