



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

KOŇSKÁ HŘÍVA JAKO MOŽNÝ BIOINDIKÁTOR PRO POSOUZENÍ KONTAMINACE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ RIZIKOVÝMI PRVKY

HORSE MANE AS A POSSIBLE BIOINDICATOR FOR THE ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL
CONTAMINATION BY RISK ELEMENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Šárka Smékalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Renata Komendová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1976/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Šárka Smékalová**
Studijní program: Aplikovaná analytická,
environmentální a forenzní chemie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Renata Komendová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Koňská hřívá jako možný bioindikátor pro posouzení kontaminace životního prostředí rizikovými prvky

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na téma indikace kontaminace složek životního prostředí rizikovými prvky.
2. Výběr vhodných environmentálních matric a jejich odběr.
3. Optimalizace postupů předúpravy vzorků a stanovení jednotlivých vybraných rizikových prvků.
4. Zhodnocení dosažených výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2024:

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

Šárka Smékalová
studentka

doc. Mgr. Renata Komendová,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Jozef Krajčovič, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn v koňské hřívě a použitých krmivech. Vzorky byly odebrány ze dvou lokalit a s využitím AAS byly stanovovány vybrané rizikové kovy. Naměřené koncentrace Hg v koňské hřívě se pohybovaly v rozmezí 0,0032–0,0077 mg/kg. Koncentrace kadmia byly ve všech vzorcích koňské hřívy pod limitem detekce. Koncentrace Cr se pohybovaly v rozmezí 0,312–3,527 mg/kg, koncentrace Cu 4,274–7,336 mg/kg, koncentrace Pb 0,143–1,403 mg/kg, koncentrace Ni 0,611–2,401 mg/kg, koncentrace Zn v rozmezí 37,0–253,2 mg/kg. Ve vzorcích krmiva byly naměřeny koncentrace Hg v rozmezí 0,001–0,015 mg/kg. Kadmium bylo stanoveno ve třech vzorcích v rozmezí 0,052–0,194 mg/kg. Ostatní rizikové prvky byly naměřeny u všech vzorků krmiva, Cr v rozmezí 3,511–13,195 mg/kg, Cu 1,670–25,241 mg/kg, Pb v rozmezí 0,171–2,709 mg/kg a Ni 1,106–5,917 mg/kg. Koncentrace Zn v krmivu se pohybovaly v rozmezí 8,6–242,2 mg/kg. Z naměřených dat není možné jednoznačně posoudit schopnost akumulace kovů v koňské hřívě. Nelze ani potvrdit závislost koncentrace kovu na věku, pohlaví, zbarvení či plemene koní, pouze u pohlaví byly markantnější opakující se rozdíly.

ABSTRACT

This bachelor's thesis focuses on the determination of trace metals Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn in horse manes and used horse feed. Samples were collected from two locations, and the selected metals were quantified using AAS. The measured Hg concentrations in the horse mane ranged 0.0032–0.0077 mg/kg. Cd concentrations were below the limit of detection in all horse mane samples. Concentrations of Cr ranged 0.312–3.527 mg/kg, Cu concentrations 4.274–7.336 mg/kg, Pb concentrations 0.143–1.403 mg/kg, Ni concentrations 0.611–2.401 mg/kg, and Zn concentrations 37.0–253.2 mg/kg. In the feed samples, Hg concentrations ranged 0.001–0.015 mg/kg. Cadmium was detected only in three feed samples in the range 0.052–0.194 mg/kg. Other risk elements were measured in all feed samples: Cr 3.511–13.195 mg/kg, Cu 1.670–25.241 mg/kg, Pb 0.171–2.709 mg/kg, and Ni 1.106–5.917 mg/kg. Concentrations of Zn in the horse feed ranged 8.6–242.2 mg/kg. Based on the measured data, it is not possible to definitively assess the ability of metals to accumulate in horse manes. It is also not possible to confirm a dependence of the concentration on age, gender, color, or breed of horses, except for more significant recurring differences in gender.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rizikové prvky, koňská hříva, koňské krmivo, AAS, AMA

KEYWORDS

Risk elements, horse mane, horse feed, AAS, AMA

SMÉKALOVÁ, Šárka. *Koňská hřiva jako možný bioindikátor pro posouzení kontaminace životního prostředí rizikovými prvky*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156616>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce doc. Mgr. Renata Komendová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem 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 bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Renatě Komendové, PhD. za odborné vedení, veškerou motivaci, ochotu a trpělivost. Poděkování patří také majitelům stájí, kteří byli ochotni zapojit své koně do studie. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Simoně Jonášové za pomoc technickou i při výsledném zpracování. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině a přátelům za podporu během studia a psaní závěrečné práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kontaminace životního prostředí rizikovými prvky	8
2.2	Vybrané rizikové prvky a jejich toxicita	12
2.2.1	Kadmium (Cd).....	12
2.2.2	Chrom (Cr).....	13
2.2.3	Měď (Cu).....	13
2.2.4	Rtuť (Hg).....	13
2.2.5	Nikl (Ni).....	14
2.2.6	Olovo (Pb).....	14
2.2.7	Zinek (Zn)	14
2.3	Osud rizikových prvků v životním prostředí.....	15
2.4	Stanovení rizikových prvků v koňské hřívě – aktuální stav.....	18
2.5	Koňská hříva: struktura, kompozice, růst vlasů a analýza pro monitorování environmentální expozice toxinů a těžkých kovů	21
2.6	Metody analytického stanovení.....	23
3	CÍL PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Požité chemikálie	26
4.2	Použité pomůcky	26
4.3	Požité přístroje.....	26
4.4	Analyzované vzorky a jejich odběr	26
4.5	Úprava vzorků před analýzou	28
4.6	Stanovení obsahů vybraných rizikových prvků	29
4.6.1	Stanovení Hg.....	29
4.6.2	Stanovení Cd, Cr, Cu, Pb, Ni	29
4.6.3	Stanovení Zn	32
4.7	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	33
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	34
5.1	Obsah rtuti ve vzorcích koňské hřívě a krmiva.....	34
5.2	Obsah rizikových kovů stanovených ET-AAS ve vzorcích koňské hřívě a krmiva.....	36
5.3	Obsah zinku stanovený F-AAS ve vzorcích koňské hřívě a krmiva.....	39

5.4	Zhodnocení naměřených výsledků.....	41
5.4.1	Rtuť	41
5.4.2	Kadmium.....	42
5.4.3	Chrom.....	42
5.4.4	Měď.....	42
5.4.5	Olovo.....	43
5.4.6	Nikl.....	43
5.4.7	Zinek.....	44
6	ZÁVĚR	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	52
9	PŘÍLOHY	53

1 ÚVOD

Předmětem této bakalářské práce jsou anorganické prvky označované jako rizikové kovy, mezi které patří mimo jiné kadmium (Cd), chrom (Cr), měď (Cu), rtuť (Hg), nikl (Ni) olovo (Pb) a zinek (Zn). Těžké prvky se vyskytují v životním prostředí v jistých koncentracích přirozeně, převážně v zemské kůře. Vyšší koncentrace rizikových prvků v životním prostředí jsou způsobeny antropogenní činností a považují se za toxické. Rizikové kovy jsou nebezpečné svojí vlastností akumulovat se, v různých složkách životního prostředí či tkáních organismů, a zatěžovat tak celé potravní řetězce ekosystémů. Těžké kovy mohou mít karcinogenní účinky, které mohou být doprovázeny účinky mutagenními a embryotoxickými [1, 2].

V České republice jsou rizikové kovy omezovány legislativou, která uvádí přísné limity pro nakládání s nimi. Stav kontaminace jednotlivých složek životního prostředí rizikovými prvky je proto v České republice pravidelně monitorován [3, 4].

Bioindikátory jsou organismy nebo soubory organismů, které se používají k posouzení stavu životního prostředí, ve kterém se nacházejí. Kumulativní bioindikátory v sobě polutanty kumulují a následně jsou vhodnými ukazateli míry znečištění. Nejčastěji se sledují rostlinné bioindikátory (např. lišejník), ale také živočišné bioindikátory (např. jepice, chrostík či rak).

Vlasy lidí se prokázaly jako vhodné kumulativní ukazatele polutantů, kterým byli lidé vystaveni, protože vlas po vytvoření nepodléhá dalším biogenním procesům. Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat, zda koňská hříva, spojovaná s krásou koní, může hrát roli jako bioindikátor environmentálních podmínek a kontaminace životního prostředí. Pro přesnější nalezení souvislostí bylo také analyzováno i krmivo koní. Studium využití koňské hřívy jako bioindikátoru by mohl případně přispět k monitorování kontaminace životního prostředí a ochraně ekosystémů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kontaminace životního prostředí rizikovými prvky

Za životní prostředí lze považovat vše, co vytváří přirozené podmínky pro život organismů včetně člověka. Mezi složky životního prostředí řadíme horniny, půdy, ovzduší, vodu, ekosystémy a organismy. V důsledku lidských činností jsou do životního prostředí vnášeny fyzikální a chemické činitele, které jsou cizorodé, a dochází tak ke znečištění, což často vede ke zhoršení a poškození stavu životního prostředí [5].

Na znečištění životního prostředí se podílí cizorodé prvky a látky jak anorganické, např. rtuť, kadmium, oxid uhličitý apod., tak i organické, např. polychlorované bifenylly (PCB), pesticidy, dioxiny apod. Předmětem studie této bakalářské práce jsou anorganické prvky označované jako rizikové prvky, které řadíme mezi nejčastější kontaminanty životního prostředí, pocházející z antropogenních činností. Po rozšíření těchto prvků se mohou dostávat do všech oblastí životního prostředí a také až do potravních řetězců a negativně působit na zdraví organismů. Za rizikové prvky považujeme většinu těžkých kovů se specifickou měrnou hmotností větší než $4,5 \text{ g/cm}^3$, a to hlavně arsen (As), kadmium (Cd), chrom (Cr), měď (Cu), rtuť (Hg), nikl (Ni) olovo (Pb), zinek (Zn) [2].

Těžké prvky se vyskytují v životním prostředí v jistých koncentracích přirozeně, převážně v zemské kůře, buď v ryzí formě nebo ve formě sloučenin, a dostávají se do ostatních složek životního prostředí například zvětráváním hornin nebo vulkanickou činností. Vyšší koncentrace rizikových prvků v životním prostředí se považují za toxické a převážně jsou způsobeny antropogenní činností [1].

V České republice jsou těžké kovy (ve výrobě, zemědělství, průmyslu) omezovány evropskou legislativou REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), CLP (Classification, Labelling and Packaging) a dalšími souvisejícími zákony, které uvádí přísné limity pro jejich obsah, povolování a omezování ve složkách životního prostředí a k tomu i označování a balení v potravinách [1, 3].

Stav kontaminace životního prostředí rizikovými prvky v České republice klesá, pravděpodobně i díky zpřísněné legislativě a pravidelnému měření, tzv. monitoringu. Stále ale není optimální z pohledu kvality vody, ovzduší a využívání přírodních zdrojů způsobem, který je považován za neudržitelný [3, 4].

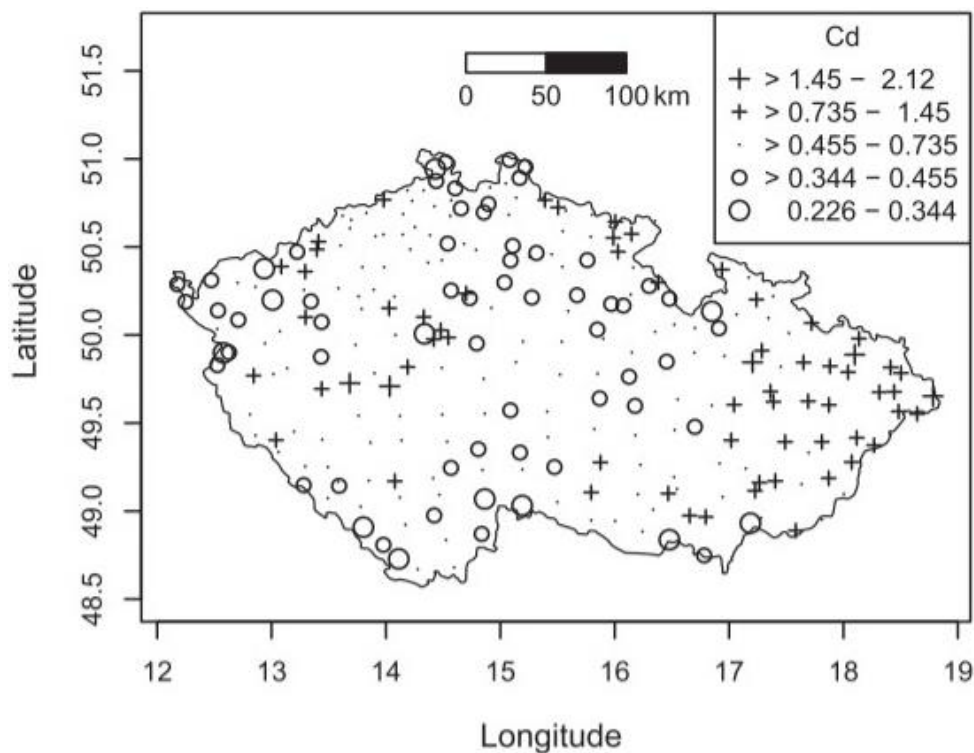
Data v Tab. 1 zobrazují rizikové prvky v půdě na území České republiky. Vlivem regionálních kontaminačních zdrojů, geologie a jiných přírodních podmínek, se v daných oblastech mohou hodnoty koncentrací prvků významně lišit. Ze sledovaných prvků se v půdě ČR vyskytuje nejčastěji olovo a zinek, jejichž koncentrace bývají vyšší než 60 mg/kg , a nejméně se vyskytuje rtuť a kadmium, jejichž koncentrace nepřekračují 1 mg/kg . Hodnoty koncentrací prvků v Tab. 1 jsou mediánem (prostřední číslo ve skupině čísel) hodnot získaných koncentrací z různých oblastí ČR [4].

Tab. 1: Koncentrace (medián hodnot) sledovaných rizikových prvků v půdě na území ČR [4]

Prvek	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Koncentrace [mg/kg]	10,00	0,56	22,00	23,00	0,43	12,00	78,00	63,00
Metoda stanovení	ICP-AES /ICP-MS	ICP-AES /ICP-MS	ICP-AES /ICP-MS	ICP-AES /ICP-MS	AMA	ICP-AES /ICP-MS	ICP-AES /ICP-MS	ICP-AES /ICP-MS

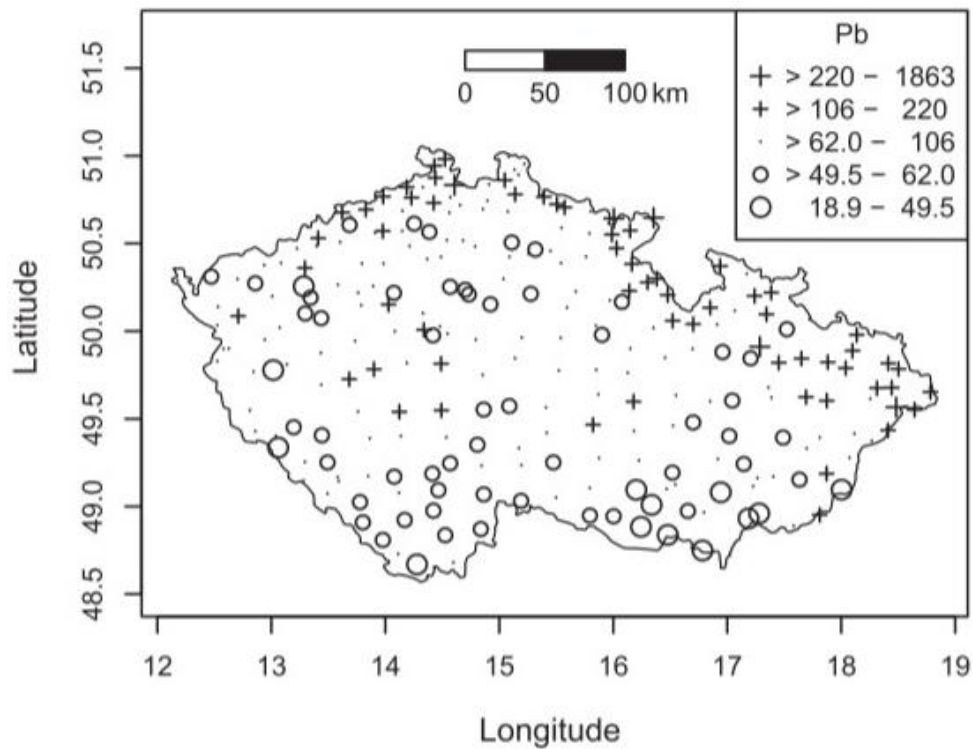
Na následujících obrázcích jsou zobrazené distribuce některých prvků na území České republiky, která je ovlivněna již zmíněným geologickým podložím nebo přírodními podmínkami. Obecně jsou těžké kovy obsaženy ve fosilních palivech (uhlí a ropě), a proto může být jejich koncentrace při těchto nalezištích vyšší [4].

Na Obr. 2 lze najít nejvyšší koncentrace kadmia převážně ve východní části ČR, v oblasti Moravskoslezského kraje, kde se přirozeně vyskytuje Cd jako příměs olovnatých a zinkových rud zde těžených, ale i na území Zlínského, Olomouckého a Jihomoravského kraje a také v oblasti Středočeského kraje [4, 6, 7].



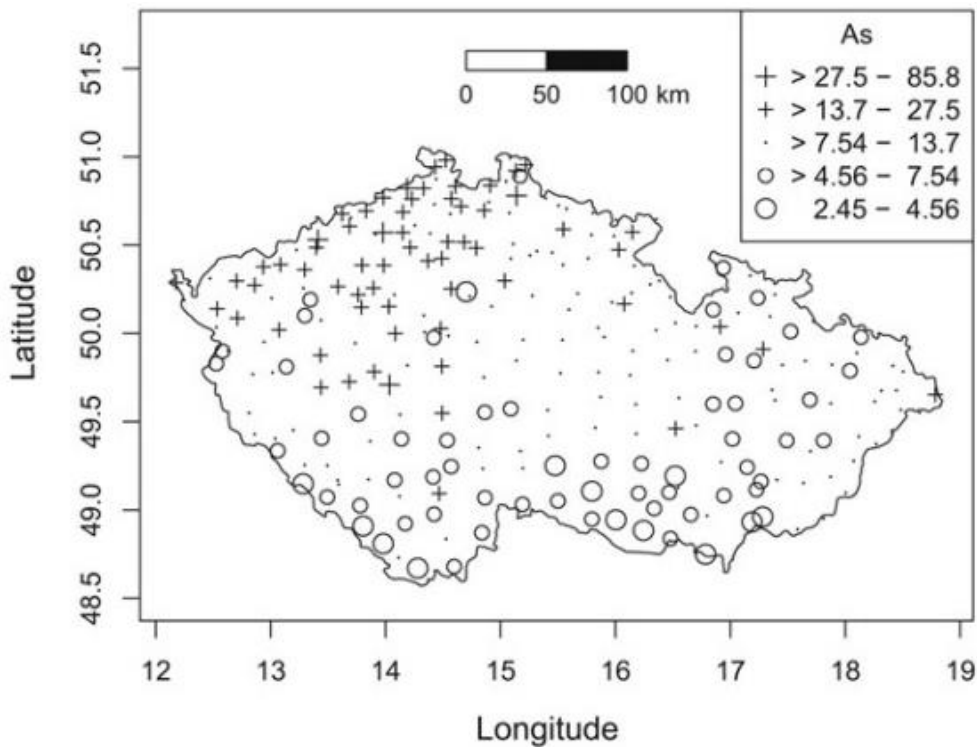
Obr. 1: Distribuce Cd na území ČR [4]

Distribuci olova zobrazuje Obr. 2 s nejvyšší koncentrací Pb na východě ČR, kde se těží olovené rudy jako například galenit, také zde dochází ke zpracování uhlí, a v oblasti Středočeského kraje, konkrétněji Příbramska, kde se nachází hutě pro výrobu a recyklaci olova [4, 6, 7].



Obr. 2: Distribuce Pb na území ČR [4]

Nejvyšší koncentrace arsenu, z Obr. 3, najdeme v severozápadní oblasti ČR, tedy na území Libereckého, Ústeckého, Karlovarského a Středočeského kraje, v oblastech, kde se kromě uhlí těží i železo s možnými příměsi kobaltu a niklu [6, 7].



Obr. 3: Distribuce As na území ČR [4]

Ve vodních tocích ČR jsou sledovány rizikové kovy rtuť, nikl, olovo a kadmium. Hodnoty koncentrace rozpuštěné rtuti a jejich sloučenin se pohybují v oblasti limitu normy environmentální kvality vyjádřené jako nejvyšší přípustná koncentrace (NEK-NPK), tedy v oblasti 0,07 µg/l. Celoroční průměrné hodnoty koncentrace (NEK-RP) rozpuštěného olova a jeho sloučenin nepřekročily ve sledovaných obdobích limit, tedy do 1,2 µg/l (výjimkou byl rok 2020). Naměřené hodnoty koncentrací rozpuštěného kadmia a jeho sloučenin, v 1 až 3 profilech, limitní hodnoty překračovaly, ale nejednalo se o povrchové toky. U kadmia záleží na tvrdosti vody, od níž se pak odvíjí limity NEK-RP. V Tab. 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty rizikových prvků, celkového rozpuštěného kadmia a olova, ve vybraných tocích ČR z roku 2021 sledované pomocí vodoměrných stanic, umístěných na vodních tocích [8–10].

Tab. 2: Aritmetické průměry hodnot ukazatelů jakosti ve vybraných povrchových tocích ČR, 2021 [8]

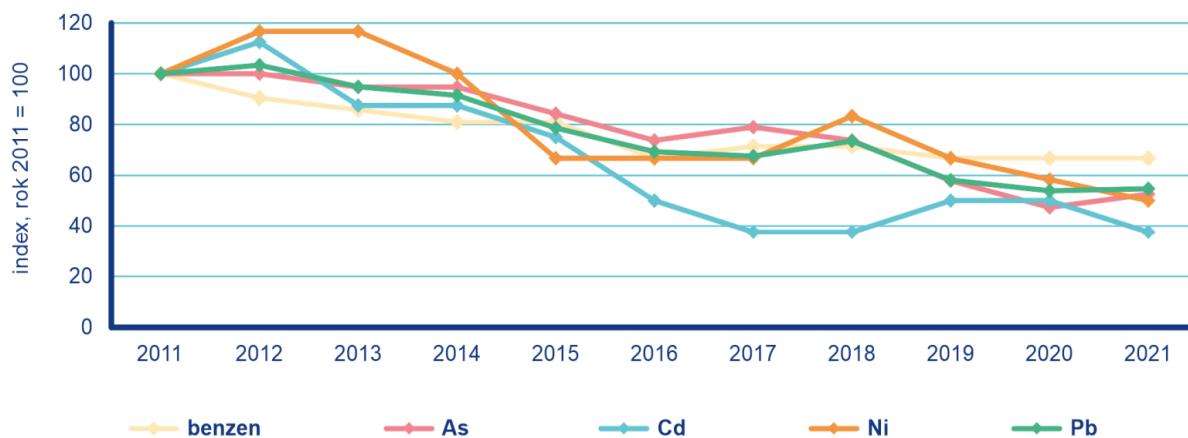
Vodní tok	Svitava	Svratka	Dyje	Morava	Odra	Vltava	Labe	NEK-RP	NEK-NPK
Cd – rozpuštěné [µg/l]	0,025	0,025	0,025	0,025	0,054	0,025	0,025	0,08	0,45
Pb – rozpuštěné [µg/l]	0,250	0,250	0,250	0,305	0,354	0,250	0,250	1,2	14

Z dlouhodobého hlediska emise rizikových kovů do ovzduší klesají i přes kolísavý vývoj mezi jednotlivými roky. Imisní limity (viz Tab. 3), jež se průměrují na 1 kalendářní rok, jsou sledovány u olova, jako látky zhoršující zdraví lidí, arsenu, kadmia a niklu, které jsou kategorizovány ve formě PM₁₀. Denní imisní limity částic PM₁₀ byly překročeny na 0,1 % území ČR. Imisní limit pro průměrnou roční koncentraci PM₁₀ nebyl v roce 2021 překročen, ani v letech 2020 a 2019. Imisní limit arsenu byl naposledy překročen v roce 2013, kadmia v roce 2015. Koncentrace kadmia a niklu byly za období 2011–2021 nejnižší v roce 2021. V Tab. 3 jsou shrnuty koncentrace sledovaných prvků z roku 2022 (z oblastí, ve kterých se vyskytují naše testované subjekty) [9, 11–13].

Tab. 3: Imisní limity sledovaných těžkých kovů v ovzduší a jejich naměřené koncentrace [11, 12]

Prvek	Imisní limit [ng/m ³]	Naměřená koncentrace [ng/m ³]	Místo naměřené koncentrace	Metoda analýzy
Pb	500	3,4	Brno-město	ICP-MS
		10,3	Olomouc	
		3,5	Pardubice	
As	6	0,6	Brno-město	ICP-MS
		1,5	Olomouc	
		1,4	Pardubice	
Cd	5	0,1	Brno-město	ICP-MS
		0,2	Olomouc	
		0,1	Pardubice	
Ni	20	0,4	Brno-město	ICP-MS
		1,8	Olomouc	
		0,5	Pardubice	

Na Obr. 4 je znázorněn vývoj imisních charakteristik především arsenu, kadmia, niklu a olova, všechny hodnoty jako roční průměrné koncentrace během let 2011–2021 [13].



Obr. 4: Vývoj imisí vybraných znečišťujících látek, 2011–2021 [13]

2.2 Vybrané rizikové prvky a jejich toxicita

Rizikové kovy jsou nejdéle známými toxickými látkami a jejich toxické účinky jsou rozsáhlé. Toxicita kovu se odvíjí od způsobu vstupu látky do organismu a jeho chemické formy, např. v jakém oxidačním stavu se iont ve sloučenině nachází. Nepříznivé vlivy na organismus mají ionty kovů, které ovlivňují specifické biochemické procesy, např. enzymatické reakce, a poškozují cílová místa, nejvíce buněčné membrány a orgány. Vstřebání kovů ve formě kationtů je po požití usnadněno kyselým prostředím trávicího ústrojí. Mezi akutní toxické účinky těžkých kovů patří zažívací potíže, respirační problémy nebo mnohé dermatitidy. Vystavením jemně rozptýleným částicím těžkých kovů může dojít k akutnímu onemocnění, tzv. „horečka z kovových výparů“, vyznačující se horečkou, zimnicí, nevolností či únavou. Jednotlivci mají tendenci vyvinout si toleranci. Jde o vážný, ale přechodný stav [1, 14, 15].

Z dlouhodobějšího hlediska jsou rizikové kovy nebezpečné svojí vlastností akumulovat se v různých tkáních, a zatěžovat tak organismus i životní prostředí. Mezi chronické účinky patří negativní změny v krevním obraze, poškození důležitých orgánů nebo rakovinné procesy. U lidí užívajících tabákové výrobky se nejčastěji jedná o poškození dýchacích cest a plic. Těžké kovy mají karcinogenní účinky, které jsou doprovázeny účinky mutagenními a embryotoxickými. Karcinogenní proces nevyvolávají přímo rizikové kovy, ale jejich formy kationtů představující promotory či kokarcinogeny (látky zvyšující účinek karcinogenů) a spolu s karcinogenními organickými látkami způsobují chronické karcinogenní onemocnění [1, 14].

2.2.1 Kadmium (Cd)

Kadmium je relativně vzácný prvek, vyskytuje se pouze jako doprovodný kov v zinkových a olověných rudách. Nejčastější forma výskytu kadmia je Cd^{II} . Kadmium je používáno v chemickém průmyslu převážně na galvanické pokovování a výrobu baterií Ni-Cd. Můžeme jej najít i ve fosforečnanových hnojivech používaných v zemědělství. [1, 16, 17]

Kadmium patří mezi nebezpečné jedy, má vysokou akumulaci schopnost. V organismech se ukládá v nadledvinkách a způsobuje jejich dysfunkci a mimo jiné může způsobovat dekalifikaci kostí. Kadmium v těle setrvává dlouho, detoxikace je pomalá, hrozí nebezpečí chronických otrav a také zesiluje toxické účinky jiných kovů, např. Cu a Zn. Přirozeně se akumuluje také v rostlinách tabáku. Pro lidi zpracovávající tabákové rostliny, ale i užívající tabákové výrobky, tento materiál představuje významný zdroj expozice kadmiumu [16].

2.2.2 Chrom (Cr)

Chrom je šedý, lesklý, tvrdý a zároveň křehký kov. V přírodě se běžně vyskytuje v oxidačních stavech Cr^0 , Cr^{II} , Cr^{III} a Cr^{VI} . Přirozeně se chrom nachází v zemské kůře, v minerálech chromitu FeCr_2O_4 , krokoitu PbCrO_4 a mnoha dalších, často v doprovodu hliníku. Chrom se využívá v chemickém průmyslu, na povrchové úpravy kovů a v barevné metalurgii [1, 16, 18].

Chrom patří mezi esenciální stopové prvky, v těle organismů se Cr^{III} podílí např. na regulaci hladiny glukosy v krvi a na syntéze nukleových kyselin v buňkách. Při deficitu chromu v těle je narušen účinek cirkulujícího inzulínu. Ve vyšších koncentracích ale může být toxický, což také závisí na oxidačním stupni. Pro organismy je toxický především kationt Cr^{VI} , který je považován za karcinogenní. Šestimocný chrom způsobuje výrazné podráždění dýchacích cest, případně podráždění v místě styku s kůží. Chronická expozice chromu ovlivňuje funkci plic, jater, ledvin, gastrointestinálního traktu a oběhového systému [16, 18].

2.2.3 Měď (Cu)

Měď je přechodný kov, který se nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu Cu^{II} , ale může existovat i ve formě Cu^{I} , Cu^{III} nebo v kovové formě. Měď má vysokou elektrickou a tepelnou vodivost a odolnost vůči korozi. Přírodním zdrojem mědi je zemská kůra, kde se vyskytuje v ryzí formě, ve formě oxidů (kuprit Cu_2O) či sulfidů (chalkocit Cu_2S , chalkopyrit (CuFeS_2)). Měď se využívá například v automobilovém průmyslu při výrobě brzd, v elektrochemickém a chemickém průmyslu, převážně pro výrobu slitin mosazi a bronzu [1, 9, 19].

V organismu bývá začleněna do velkého počtu proteinů pro katalytické reakce a strukturní účely. Nedostatek či nadbytek mědi může vyvolat nepříznivé zdravotní účinky. Nedostatek mědi v organismu se projevuje chudokrevností (anémií), poklesem počtu bílých krvinek (neutropenií) anebo kostními abnormalitami. Vrozený deficit mědi u mužů se označuje jako Menkesova choroba, neschopnost buněk střevní sliznice přenášet Cu do krevního oběhu. Při akutním nadbytku mědi může jedinec pociťovat kovovou chuť, bolest hlavy, nevolnost, závratě či potíže s dýcháním, v závažných případech může dojít k selhání jater ledvin až smrti. Po chronické expozici většího množství mědi se objevuje postupné selhání jater [19].

2.2.4 Rtuť (Hg)

Rtuť je kapalný kov stříbrné barvy. Nejedná se o esenciální prvek, naopak je nebezpečným jedem. Ryzí rtuť se vyskytuje v přírodě výjimečně, nejběžnější oxidační stavy jsou Hg^{I} a Hg^{II} . Známá ruda rtuti je rumělka HgS . Významné je použití rtuti v elektrochemii a v chemickém průmyslu při extrakci drahých kovů amalgamací. Některé sloučeniny rtuti se využívají pro své toxické účinky ve fungicidních a baktericidních preparátech [1, 3, 16, 20, 21].

Toxické účinky rtuti vychází z její velké afinity k sulfidické síře, a tedy vysoké reaktivitě s thioskupinou -SH, která se nachází v aminokyselinách cysteinu. Tímto lze vysvětlit schopnost rtuti porušovat struktury bílkovin v buňkách a inhibovat enzymatické reakce. Sloučeniny methylrtuti se kumulují hlavně v játrech, ledvinách a mozku. Nejčastějšími symptomy otravy methylrtutí jsou ztráta paměti, podrážděnost, poškození sluchu anebo dyskoordinace, která může dosáhnout úplného ochrnutí [3, 16, 20, 21].

2.2.5 Nikl (Ni)

Nikl je všudypřítomný stopový prvek vyskytující se převážně v iontové formě Ni^{II} . V přírodě se nikl vyskytuje v zemské kůře, ložiska niklové rudy jsou tvořena zejména sulfidy niklu, minerály pentlandit (Ni_9S_8) a millerit (NiS). Nikl se používá hlavně při výrobě nerezové oceli, strojů, elektrických zařízení nebo baterií, ale také při galvanickém pokovování [1, 22].

Nejaktušší toxicitu ze všech sloučenin niklu vykazuje tetrakarbonyl niklu ($\text{Ni}(\text{CO})_4$), který se rychle rozpouští a je plně absorbovatelný v organismu. Účinky akutní toxicity zahrnují čelní bolest hlavy, pocit narušené rovnováhy, nevolnost či zvracení. Postiženy jsou hlavně plíce, játra ledviny, ale i mozek. Mezi chronické účinky niklu patří rýma, astma, záněty nosních dutin. Kovový nikl a velký počet jeho sloučenin způsobují lokální nádory plic a nosu [22].

2.2.6 Olovo (Pb)

Olovo je stříbrný šedý měkký kov. Nejčastěji se vyskytuje v oxidačním stavu Pb^{II} a jeho nejrozšířenější rudou je galenit PbS , dále pak anglesit PbSO_4 a cerusit PbCO_3 . Dříve se používalo olovo (tetraethylolovo a tetramethylolovo) jako antidetonační příměs do benzínů pro zvýšení oktanového čísla paliva a zlepšení výkonu motoru. Dnes je využíváno v olověných akumulátorech a chemickém průmyslu [1, 23].

Olovo v životním prostředí nedegraduje a je vysoce bioakumulativní a schopné procházet potravními řetězci. Až 90 % olova, které organismus přijme, se akumuluje v kostech, kde negativně ovlivňuje krvetvorbu. Olovo působí v lidském organismu jako antagonist vápníku. Při nedostatku vápníku se může olovo z kostí mobilizovat, vstupovat do krevního oběhu a toxicky působit na další orgány, např. játra, ledviny, reprodukční a nervovou soustavu. Při chronické expozici se nejčastěji vyskytuje bolest hlavy, nespavost, otupělost, ale i mentální problémy, jako jsou například halucinace či mánie. Dvojmocná anorganická forma olova je obecně méně toxická než čtyřmocná organická forma [16, 23].

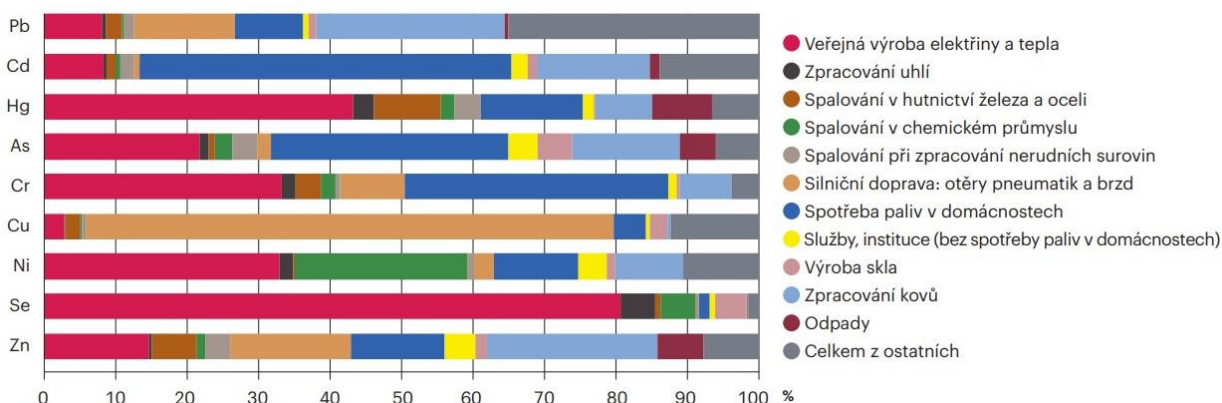
2.2.7 Zinek (Zn)

Zinek je přechodný měkký kov a patří mezi esenciální prvky. Má zásadní roli v reakci imunitního systému, v antioxidační ochraně, proliferaci a regeneraci buněk. Je důležitý také při regulaci centrálního nervového systému. Podvěsek mozkový (hypofýza) obsahuje vyšší koncentraci zinku než jiné orgány a zinek zvyšuje funkci hormonů hypofýzy. Přírodním zdrojem zinku je zemská kůra, hlavně rudní minerál sfalerit (ZnS). V životním prostředí se vyskytuje převážně ve dvoumocném stavu Zn^{II} , ve formě kovu se sám pasivuje vrstvou oxidu zinečnatého (nebo uhličitanu zinečnatého). Nanočástice oxidu zinečnatého se hojně využívají v opalovacích krémech. Obecně je zinek používán v chemickém průmyslu, při výrobě slitin (mosazi), galvanickém pokovování, i zemědělství [1, 15, 24–27].

Toxicita zinku je pro člověka relativně nízká, závisí na podmínkách prostředí a typech cílových míst. Při krátkodobém vystavení vysokým koncentracím zinku 1 000–2 500 mg/l může dojít k otravě, která se projevuje gastrointestinálními potížemi, nevolností či průjmem. Inhalační expozice chloridu zinečnatého po použití tzv. vojenských kouřových bomb má za následky plicní otoky, záněty a vředy nebo zjizvení plic. Dlouhodobější nadprůměrný příjem zinku může vyvolat nedostatek mědi. Příznaky toxicity zinku bývají reverzibilní pomocí vysazení případné léčby zinkem a suplementací mědi. Nedostatek zinku způsobuje zhoršené neurosenzorické funkce, poruchy sluchu, oligospermii, zpomalení růstu, hojení ran, ztrátu vlasů, poruchy imunitního systému nebo různé dermatitidy [15, 26].

2.3 Osud rizikových prvků v životním prostředí

Přestože rizikové prvky vykazují toxické vlastnosti, stále mají v dnešním světě nejrůznější využití, při kterých dochází k jejich uvolňování anebo únikům, a tedy vstupu do životního prostředí (viz Obr. 5). Tím může dojít k narušení přírodních koloběhů prvků a následné akumulaci v jednotlivých složkách životního prostředí. Prvky se v životním prostředí pohybují v biogeochemických cyklech, kde dochází k interakci prvků zemské kůry s hydrosférou, atmosférou i biosférou [1, 2, 9].



Obr. 5: Zdroje emisí vybraných těžkých kovů v ČR [%], 2020 [9]

Za největší zdroj kontaminace životního prostředí rizikovými prvky lze považovat zpracování fosilních paliv (uhlí, ropa) pro výrobu tepla a elektřiny. Fosilní paliva přirozeně obsahují příměsi těžkých kovů, jako je Cd, Cr, Hg, Pb anebo Ni, které jsou spalováním uvolňovány do ovzduší. K tomu přispívá také domácí spalování odpadů či spotřeba paliv pro výrobu tepla. Do ovzduší jsou uvolňovány rizikové prvky i ze silniční dopravy, převážně při otěru brzd a pneumatik (Cu) nebo spalováním olovnatého benzínu (v ČR zákaz používání 2001). Zdrojem rizikových prvků v ovzduší je také cigaretový kouř a aerosoly z elektronických cigaret (Cd, Pb, Ni, Cr) [1, 9, 28].

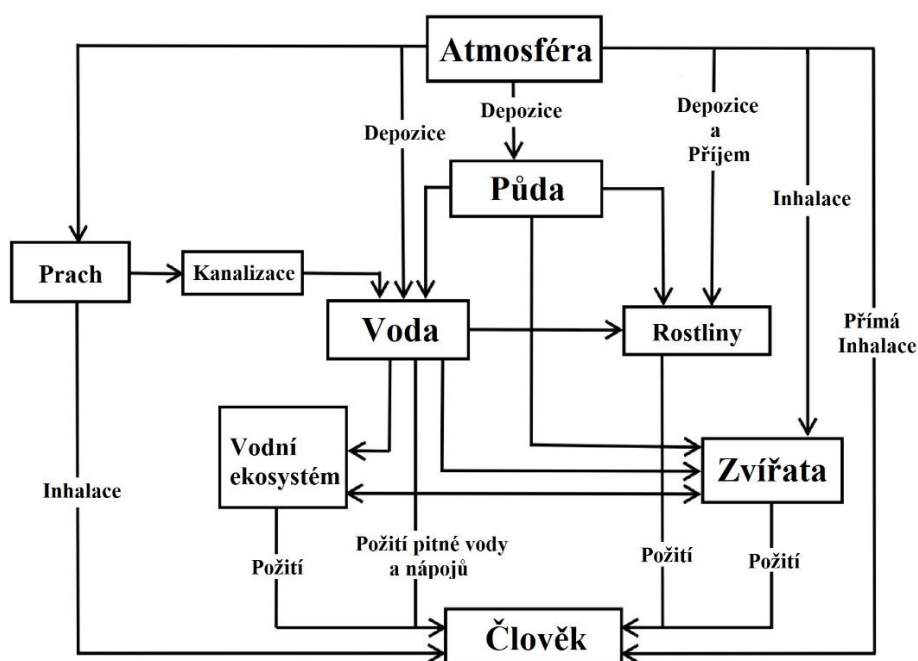
Do ovzduší a recipientů odpadních vod se dostávají rizikové prvky nejen z průmyslových výrob, ale i běžným používáním, např. opalovacích krémů (Zn) či aerosolových sprejů (Pb, Ni). Odpady a emise vznikají ze zpracování železa, nerezové oceli a zpracování kovových rud, z nichž jsou získány chtěné kovy, které jsou následně použity na výrobu slitin (mosaz, bronz), anebo z galvanického pokovování (Ni, Cr). Kontaminované odpadní vody vznikají také v elektrochemickém průmyslu, např. při výrobě baterií (Ni, Cd) a chemické výrobě nejen

barevných pigmentů (Cd, Cr, Pb) či ochranných prostředků např. na dřevo. Nehledě na to, že po jejich aplikaci se mohou z povrchů postupně vymývat srážkami a dostávat do povrchových vod [1, 15, 21–23].

Rizikové prvky můžeme najít i v hnojivech a pesticidech používaných v zemědělství, které vstupují do životního prostředí skrze půdu a podzemní vodu. Jedná se zejména o kadmium, měď a rtuť, které mají fungicidní a baktericidní vlastnosti [1, 16].

Transport i distribuce rizikových prvků v životním prostředí závisí na formě přítomného prvku, na velikosti částic, což je dáno zdrojem emise prvku, a vlastnostech okolního prostředí. Z přírodních zdrojů mohou být těžké kovy transportovány a distribuovány vulkanickou činností, lesními požáry anebo pomocí exogenních procesů, při kterých působením vnějších fyzikálních, chemických a mechanických faktorů, dochází k erozi půdy, zvětvávání, rozpouštění anebo abrazi [1, 15, 19, 22].

Částice z průmyslových procesů (antropogenní) jsou často dostatečně malé, aby se dostaly různými způsoby až do organismu (viz Obr. 6), pokud jsou biologicky dostupné. Biologická dostupnost závisí na formě výskytu prvku, fyzikálních a chemických vlastnostech prostředí, biologických procesech a celkově na biotických a abiotických faktorech – např. věk a velikost organismu, tvrdost vody, pH, teplota atd. [15–19, 21–23].



Obr. 6: Transport rizikových prvků do organismu, upraveno [23]

Rizikové prvky uvolněné do ovzduší se v atmosféře vážou na aerosolové částice, které organismy nevědomě vdechují nebo dermálně vstřebávají (ZnO). Některé sloučeniny obsahující rizikové kovy jsou ve vzduchu nestabilní, např. tetrakarbonyl niklu ($\text{Ni}(\text{CO})_4$), který se rozkládá za vzniku oxidu nikelnatého. Aerosolové částice jsou díky nízké hmotnosti a malému průměru schopné i dálkového transportu, a proto je můžeme najít i na vzdálených místech, ze kterých nepocházejí, např. Antarktida [22, 23].

Z atmosféry jsou částice ukládány na zemský povrch depozicí. Rozlišujeme mokrou depozici, kdy jsou částice z atmosféry vymývány periodickými srážkami, a suchou depozici neboli nepřetržitý spad částic. [15–19, 21–23].

Ve vodním prostředí jsou kovy přítomny v rozpuštěné i v nerozpuštěné formě. V rozpuštěné formě převládají zpravidla komplexy (nikoli jednoduché ionty). Kovy mohou vytvářet komplexy s anorganickými ligandy, jako jsou anionty CO_3^{2-} , SO_4^{2-} a PO_4^{3-} nebo s organickými komplexotvornými látkami, především s huminovými kyselinami, fulvokyselinami a aminokyselinami. Část kovů je ve vodách vázána adsorpcí na nerozpuštěné látky, většinou jíly či sedimenty. Nerozpuštěné formy částic nemusí být pouze usazené na dně vodních útvarů, ale mohou být transportovány vodním tokem [16, 22].

Obsah kovů a jejich pohyblivost v přírodních vodách ovlivňují také imobilizační a remobilizační procesy. Mezi imobilizační procesy patří srážení kovů ve formách hydratovaných oxidů, uhličitánů nebo sulfidů (Cu), oxidace (kovy s vyššími oxidačními stavy se snáze hydrolyzují a vylučují méně rozpustné sloučeniny), adsorpce na nerozpuštěných látkách a inkorporace do biomasy. Mezi remobilizační procesy řadíme rozpouštění málo rozpustných sloučenin kovů při poklesu hodnoty pH, redukci (redukované formy bývají rozpustnější než oxidované formy), komplexaci, desorpci ze sedimentů a uvolňování z odumřelé biomasy [15, 16].

Kovy mohou podléhat i biologickým transformacím, pokud jsou biologicky dostupné, a následně se stanou součástí potravního řetězce. Významným procesem je biologická methylace za vzniku alkylprvkových sloučenin (Hg, As). Například pomocí metanogenních bakterií se Hg^{II} přeměňuje na methylrtuť, která má schopnost procházet biologickými membránami. Jsou-li vhodné zásadité podmínky, vytvoří se dimethylrtuť, která je ve vodě nerozpustná a těkavá a předpokládá se, že difunduje z vodního prostředí do atmosféry [16, 21].

Mobilita rizikových prvků v půdě je úzce spjata s rozpustností sloučenin ve vodě. Kovy v půdě migrují různou rychlostí v závislosti na svém náboji a velikosti molekuly. Řídící reakce pro osud a transport kovových kontaminantů v půdním prostředí jsou srážecí a rozpouštěcí reakce. Některé minerály, jako jsou sulfidy, mají velmi nízkou rozpustnost, zatímco jiné fáze, jako jsou uhličitany, jsou rozpustnější. Důležitou reakcí je také komplexace a tvorba chelátů. Mnoho kationtů kovů se vyskytuje v půdních roztocích jako komplexy nebo iontové páry. Organické a anorganické ligandy konkurují molekulám ve spojení s centrálním iontem. Půdy kyselé s nízkým obsahem organických látek, mají sníženou kapacitu adsorpce některých kovů (např. Zn). Koncentrace rizikových kovů v půdě i vodě jsou determinovány místními geologickými a antropogenními vlivy (např. v těžebních oblastech jsou často koncentrace vyšší) [15, 16, 29].

Pokud nedochází k zachycení kovů v půdě či půdních sedimentech, rizikové prvky mohou prostoupit do hlubších vrstev až do podzemních vod. Požitím povrchové či podzemní vody, která je používána jako zdroj pitné vody, se mohou dostat rizikové prvky do organismu. V organismu mohou být rizikové prvky vstřebávány v trávicím traktu. Vstřebané kovy se ukládají, především ve svalech, kostech, játrech, slinivce či ledvinách nebo mohou být vylučovány. Také mohou být začleněny do proteinů, např. metalothionein, důležitý transportní a skladovací protein kovů (hlavně Cd), nebo albumin (Ni), a jimi transportovány [16, 17, 22].

2.4 Stanovení rizikových prvků v koňské hřívě – aktuální stav

Studiu stanovení rizikových prvků v koňské hřívě se věnovali V. Kalashnikov, A. Zajcev, a spol. ve Výzkumném ústavu chovu koní v Rusku. Výzkumy byly prováděny na 148 plnokrevných hřebcích v 3–7 letech zbarvení vraníka (černé srsti i žíní) z jihu Ruska. Vzorek hřívy byl koním odebrán v oblasti zátylku, tedy prvního krčního obratle. Pro analýzu bylo použito 15 mm žíně od kořínku. Ve vzorku bylo analyzováno 20 prvků pomocí atomové emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), koncentrace vybraných prvků jsou uvedeny v Tab. 4 [30].

Stejná výzkumná skupina také prováděla studium na 120 arabských čistokrevných hřebcích ve věku 5–8 let, kde analyzovala hřívu i krevní sérum koní. Studie posuzovala obsah 25 vybraných prvků. Analýza byla prováděna pomocí metod AES a ICP-MS, a bylo potvrzeno, že v hřívě lze detekovat výrazně vyšší koncentrace prvků (viz Tab. 4) vůči krevnímu séru [31].

Dále byl proveden V. Kalashnikov, A. Zajcev, a spol. výzkum na 190 hřebcích i 94 klisnách plemene anglického plnokrevníka ve věku 3–7 let. Pro studii byla použita hříva hřebců i klisen zbarvení vraníků a hnědáků z oblasti zátylku. Vzorky hřívy o délce 15 mm od kořínku byly opláchnuty v deionizované vodě a rozloženy v koncentrované kyselině dusičné v mikrovlnném systému. Rozložené prvky byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a dynamickou reakční celou (ICP-DRC-MS). Výsledky (viz Tab. 4) byly posuzovány v závislosti na pohlaví, u některých prvků byly koncentrace vyšší u klisen než u hřebců, např. Cr, As, Pb, Ni, ale u některých prvků, např. Cd, nebyl detekován výrazný rozdíl. Vyšší koncentrace analyzovaných prvků u klisen výzkumníci odůvodnili množstvím krmné dávky, která je rozdílná pro klisny a hřebce, a metabolismem některých proteinů, které jsou regulovány pohlavními hormony (např. metalothionein, který váže těžké kovy jako zinek, kadmium, měď nebo rtuť) [32].

V. Kalashnikov, A. Zajcev a spol. zkoumali množství toxických prvků vůči množství esenciálních prvků obsažených v hřívě 214 klisen 11 různých plemen v rozmezí 3–7 let. Vzorky hřívy byly odebírány v oblasti prvního krčního obratle, nejméně 0,4 g. Na rozložení v mikrovlnném systému, v 5 ml kyseliny dusičné při 200 °C po dobu 5 minut, bylo použito 0,05 g čistého vzorku. Pomocí metod AES a MS bylo analyzováno 25 prvků, koncentrace vybraných rizikových prvků jsou shrnuty v Tab. 4. V závěru bylo uvedeno, že výsledky potvrzují možný vliv toxických prvků (např. Al, Cd nebo Pb) na metabolismus esenciálních prvků [33].

Kalashnikov, V. Zajcev, A. a spol. se také zabývali studiem obsahu 25 esenciálních a toxických prvků ve hřívě 215 koní plemene ruského klusáka, ve věku 3–4 let, v závislosti na jejich sportovních výkonech. Hříva byla vzorkována po 4 cm asi 1 cm od kůže, pro analýzu přesnějšího období (červen–červenec). Prvková analýza byla provedena pomocí metod AES a MS po mikrovlnném rozkladu, výsledné koncentrace vybraných prvků viz Tab. 4. Po srovnání chemického složení byl odhalen výrazný rozdíl mezi koncentracemi prvků v závislosti na výkonu koní, v hřívě koní s vyššími sportovními úspěchy byly naměřeny nižší koncentrace některých prvků (Cd, Cr, Li, V, Pb) a vyšší koncentrace Si oproti koním s horšími sportovními výkony. V závěru potvrdili vliv prvkového složení hřívy na sportovní výsledky koní [34].

Brummer-Holder, M., Cassil, B. D. & Hayes, S. H. z USA, Kentucky prováděli výzkum na vzájemné vztahy mezi věkem a koncentracemi stopových prvků v koňské hřívě a krvi. Pro studii bylo vzorkováno 59 koní ze stejné farmy, jednalo se o plemena plnokrevných koní, American Quarter horse (amerického kovbojského koně), amerického klusáka a amerického Paint horse, ve všech věkových kategoriích, 2 měsíce až 26 let. Jednalo se o 8 hřebců, 8 valachů a 43 klisen. Vzorky hřívy byly odebírány v oblasti zátylku, po umytí rozloženy (asi 200 mg) v mikrovlnném systému v kyselině dusičné a následně bylo analyzováno 11 prvků pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Po zpracování dat výzkumníci potvrdili velmi nízkou korelaci mezi věkem a koncentracemi stopových prvků, u některých (např. Cu, Se) negativní a u jiných naopak pozitivní (např. As). Naměřené koncentrace vybraných rizikových kovů jsou shrnuty v Tab. 4 [35].

Podobným výzkumem se zabývali i Asano, R., Suzuki, K., Otsuka, T. a spol. na japonské univerzitě Nihon. Sledovali koncentrace toxických kovů v koňské hřívě dostihových koní v závislosti na jejich věku. Vzorky hřívy o množství 1 g byly odebrány z 9 samic a 15 samců koní anglického plnokrevného plemene. Vzorky hřívy byly omyty, rozloženy v kyselině dusičné a následného přídavku peroxidu vodíku a analyzovány na ICP-AES pro 19 prvků, koncentrace vybraných prvků, viz Tab. 4. U některých prvků (např. Hg) byla zaznamenána negativní závislost na věku koní, u jiných (např. Cd) naopak pozitivní [36].

Asano, K., Suzuki, K., Chiba, M., Sera, K. a spol. analyzovali 28 prvků v koňské hřívě 9 klisen, 4 hřebců a 34 valachů různých plemen a zbarvení. Vzorky hřívy byly odebírány v oblasti zátylku. Nerozložená hříva byla analyzovaná měřením charakteristického rentgenového záření buzeného svazkem urychlených protonů a detekovaného pomocí Si(Li) detektoru. Výsledky koncentrací prvků (vybrané viz Tab. 4) nevykazovaly rozdíly mezi pohlavím koní, jejich plemeny ani mezi věkem jedinců [37]. Stejně vzorkovací subjekty a analytické metody pro analýzu stejných 28 prvků v hřívě použili Asano, K., Suzuki, K., Chiba, M., Sera, K. a spol. pro další studii. Zkoumali, jaký vliv má barva srsti a zíní na stav stopových prvků v koňské hřívě. Vzorkovací subjekty měly zbarvení ryzáka, hnědáka a šedé zbarvení. Mezi naměřenými koncentracemi prvků (vybrané viz Tab. 4) v barevné hřívě (rezavé a hnědé) nebyl výrazný rozdíl, šedá (šedivá stářím) hříva obsahovala výrazně vyšší množství některých prvků (např. Cu, Zn nebo Ti), ale i nižší množství některých prvků např. Br, Ca, Se a Sr, než barevná. U ostatních měřených prvků nebyl nalezen žádný vztah vůči zbarvení srsti [38].

Výzkumná skupina van der Merwe, D. a spol. analyzovala vzorky hřívy a jater z 62 koní. Hříva byla odebírána na týlu 1 cm od kůže koně a na rozložení v 65% kyselině dusičné v mikrovlnném zařízení, při 200 °C po dobu 5 min, bylo použito 200 mg čistého vzorku. Následně bylo analyzováno 13 prvků pomocí ICP-MS a podle vědců výsledky (vybrané prvky viz Tab. 4) naznačují, že vnější faktory prostředí a/nebo fyziologické procesy nesouvisejí s koncentracemi prvků v měřených maticích [39].

Tab. 4: Přehled koncentrací vybraných prvků v odebraných vzorcích, jejich úprava a následná analýza

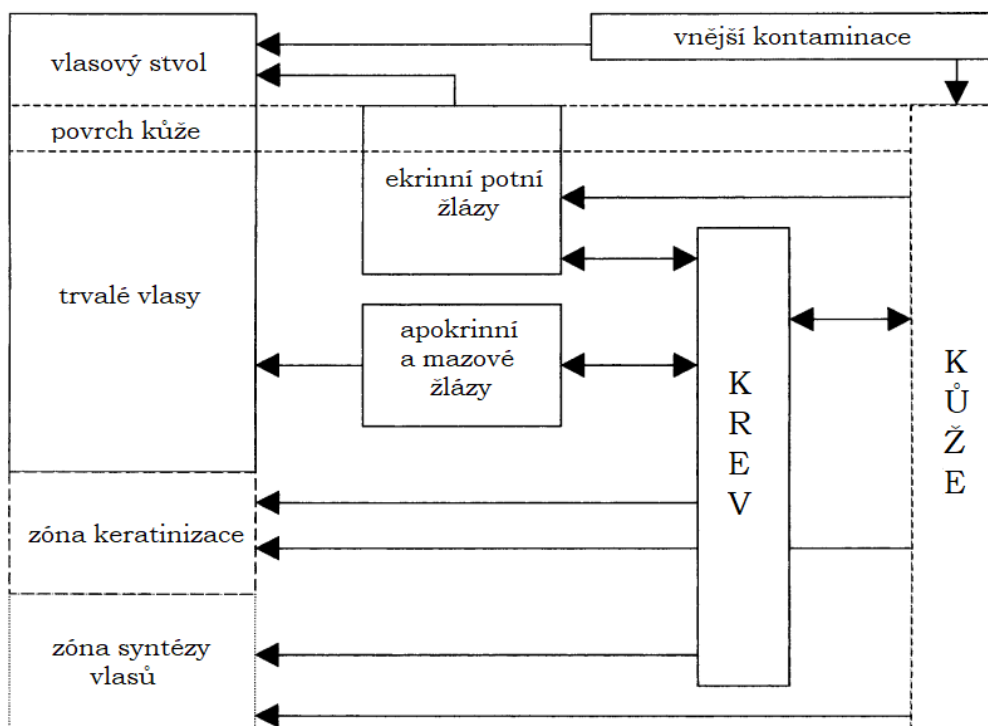
Místo	Vzorek	Prvky	Koncentrace [$\mu\text{g/g}$]	Úprava	Metoda	Citace
Rusko	hřívá z oblasti prvního obrátle, 15 mm	Cd	$0,011 \pm 0,016$	neuveďeno	ICP-AES, ICP-MS	[30]
		Cr	$0,119 \pm 0,090$			
		Cu	$5,70 \pm 0,611$			
		Hg	$0,004 \pm 0,005$			
		Ni	$0,162 \pm 0,088$			
		Pb	$0,078 \pm 0,100$			
		Zn	$129,3 \pm 14,68$			
Rusko	hřívá	Cd	$0,006 \pm 0,005$	neuveďeno	AES, ICP-MS	[31]
		Cr	$0,247 \pm 0,297$			
		Cu	$5,78 \pm 1,51$			
		Hg	$0,003 \pm 0,002$			
		Ni	$0,196 \pm 0,172$			
		Pb	$0,078 \pm 0,105$			
		Zn	$140,6 \pm 31,86$			
Rusko	hřívá z oblasti prvního obrátle, 15 mm, léto (50 mg na rozložení)	Cd	$0,0052 \pm 0,0025$	MW, v 5 ml konc. HNO_3	ICP-DR-MS	[32]
		Cr	$0,089 \pm 0,032$			
		Cu	$5,62 \pm 0,20$			
		Hg	$0,0018 \pm 0,0036$			
		Ni	$0,125 \pm 0,054$			
		Pb	$0,05 \pm 0,068$			
		Zn	$124,5 \pm 23,7$			
USA, Kentucky	hřívá z týlu, 24 mm (200 mg na rozložení)	Cr	$0,485 \pm 0,373$	MW, v 5 ml HNO_3	ICP-OES	[35]
		Cu	$14,537 \pm 9,161$			
		Ni	$0,992 \pm 0,670$			
		Pb	$0,621 \pm 0,649$			
		Zn	$173,736 \pm 53,603$			
Japonsko	hřívá z týlu, 30 mm (500 mg na rozložení)	Cd	$0,12 \pm 0,12$	v 2 ml HNO_3 při pokojové teplotě (24 hod) následně + 1 ml HNO_3 a zahřívány na 90°C po 3 hod, následně + 1 ml H_2O_2 a zahříváno na 100°C	ICP-AES	[36]
		Cr	$0,22 \pm 0,16$			
		Cu	$4,80 \pm 1,30$			
		Hg	$0,31 \pm 0,02$			
		Ni	$0,26 \pm 0,09$			
		Pb	$0,93 \pm 0,78$			
		Zn	$86,0 \pm 24,0$			
Japonsko	hřívá z týlu, 10 vláken po 6 cm, léto	Cr	$0,49 \pm 0,31$	neuveďeno	PIXE	[37]
		Cu	$6,72 \pm 1,96$			
		Hg	$0,91 \pm 0,58$			
		Ni	$0,19 \pm 0,26$			
		Pb	$1,43 \pm 1,30$			
Japonsko	hřívá z týlu nejbliže kůži, 10 vláken po 6 cm	Cr	$0,428 \pm 0,332$	neuveďeno	PIXE	[38]
		Cu	$6,546 \pm 2,162$			
		Hg	$0,425 \pm 0,603$			
		Ni	$0,387 \pm 0,528$			
		Pb	$1,036 \pm 1,275$			
Holansko	hřívá z týlu, 1 cm nad kůži, 10 cm (200 mg na rozložení)	Cr	$0,4 \pm 0,5$	MW, v 65% HNO_3 na 200°C po dobu 5 min	ICP-MS	[39]
		Cu	$7,2 \pm 1,2$			
		Ni	$0,3 \pm 0,2$			
		Pb	$0,4 \pm 0,2$			
Rusko	hřívá z oblasti prvního obrátle, 0,04 g (0,05 g na rozložení)	Cd	$0,010 \pm 0,001$	MW, v 65% HNO_3 na 200°C po dobu 5 min	AES, MS	[33]
		Cr	$0,326 \pm 0,035$			
		Cu	$5,74 \pm 0,10$			
		Ni	$0,395 \pm 0,074$			
		Pb	$0,220 \pm 0,016$			
Rusko	hřívá z týlu, 1 cm nad kůži, 4 cm	Cd	$0,009 \pm 0,003$	MW	AES, MS	[34]
		Cr	$0,309 \pm 0,02$			
		Cu	$6,19 \pm 0,2$			
		Hg	$0,010 \pm 0,001$			
		Ni	$0,44 \pm 0,03$			
		Pb	$0,27 \pm 0,07$			
		Zn	$129,9 \pm 5,7$			

2.5 Koňská hříva: struktura, kompozice, růst vlasů a analýza pro monitorování environmentální expozice toxinů a těžkých kovů

Koňská hříva má trvalý charakter oproti srsti, která se během roku častěji a ve větším množství obměňuje. Hříva napomáhá stékání dešťové vody, izoluje hlavu a hlavní krevní cévy do mozku a pomáhá v ochraně proti hmyzu. Vlas hřívy je, podobně jako u lidí vlasy, rohovým derivátem kůže a jeho tvorba a růst jsou regulovány ve vlasovém folikulu fyziologickými procesy, umožňujícími reakce např. na vlivy prostředí [40, 41].

Vlasový folikul je orgán obsahující několik enzymových systémů, které určují biochemické složení vlasu. Folikuly se liší strukturou s různým anatomickým umístěním a jsou tak schopny generovat vlasové stvoly různé velikosti, tvaru, barvy či kadeře. Některé druhy, včetně psů a koček, mají složené folikuly, které produkují primární a sekundární chlupy, zatímco kůň má jednoduché folikuly, které tvoří výhradně jednotlivé chlupy. Ke každému folikulu jsou připojeny potní a mazové žlázy, cévní systém a sval *arrector pili*, jehož kontrakcí dochází k napřimování vlasového stvolu a tím regulaci tepelné ztráty. Mazové žlázy produkují maz, voskovou látku, která pokrývá chlupy hřívy a pokožku, odpuzuje vodu, poskytuje fyzickou bariéru a zpomaluje pronikání toxických látek ke kůži [41].

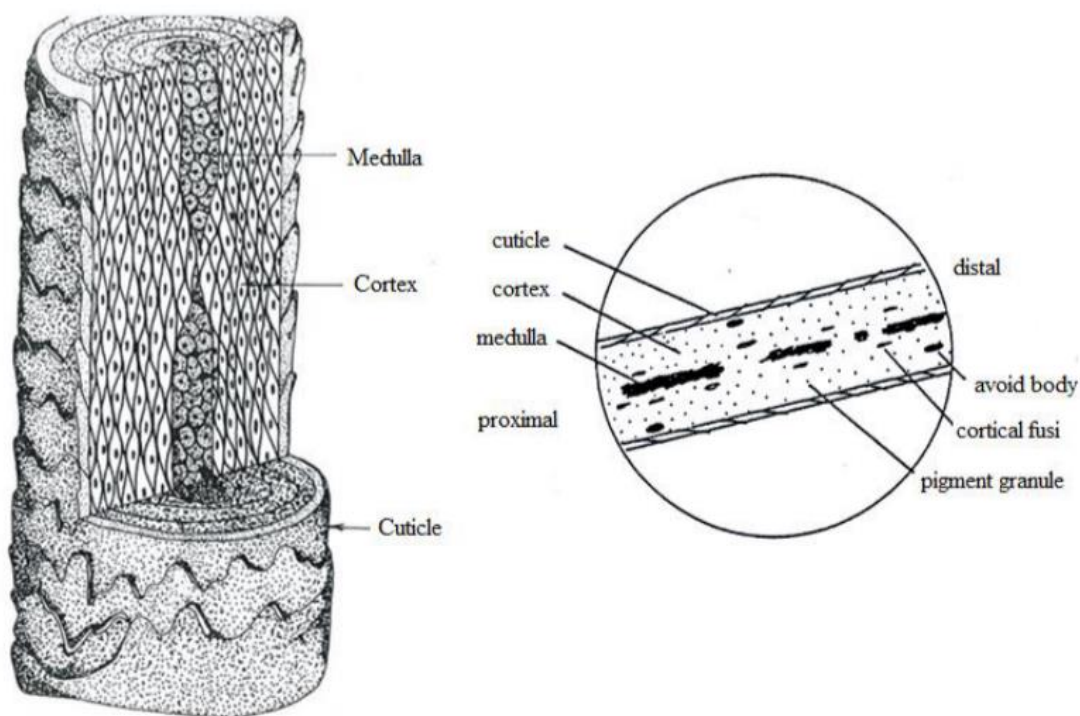
Keratinizace vedoucí ke ztvrdnutí vlasu nastává procesem zesíťování proteinů prostřednictvím vysoce stabilních disulfidových můstků mezi sousedními molekulami cysteinu. Vzniklý vlas lze považovat za konečný produkt metabolismu a z části i vylučovací orgán, jehož obsah stopových prvků odráží médium, ze kterého vznikl. Potenciální cesty pro zabudování stopových prvků či léků do vlasů jsou znázorněny na Obr. 7. Relativní odolnost vlasů vůči degradaci je způsobena převážně cysteinovými příčnými vazbami. Vlasový stvol pak vystupuje z kůže a rychlost růstu vlasů je určena rychlostí buněčné proliferace (rychlost dělení buněk) [41].



Obr. 7: Potenciální model zabudování látek do vlasů, upraveno [41]

Růstový cyklus vlasových folikulů zahrnuje dlouhé období aktivního růstu vlasů (anagenní fáze), krátké přechodné období pomalého růstu (katagenní fáze) a období klidu bez růstu (telogenní fáze), po kterém dochází k vypadávání vlasového stvolu (exogenní fáze). Růstový cyklus slouží zvířatům k přeměně jejich srsti, aby vyhovovala potřebám regenerace a sezónním výkyvům klimatu. Vlasy hřívý nepřetržitě rostou přibližně 2 cm/měsíc [40, 41].

Vlas je složen ze tří částí (viz Obr. 8): z vnější kutikuly, kůry (*cortex*) a centrální dřene (*medulla*). Ochranná vnější kutikula je tvořena rohovitými buňkami, které se navzájem překrývají, vytvářejí dlaždicovitou (šupinatou) strukturu a fixují vlasový stvol. Šupiny kutikuly hřívý jsou tenčí než u lidských vlasů. Největší objem vlasového stvolu je tvořen kůrou obsahující keratinocyty, buňky s vysokým obsahem keratinu, a melanocyty, obsahující pigment melanin. Keratin je vysoce odolný protein, který zajišťuje mechanickou pevnost vlasu, zabraňuje ztrátě vnitřních složek a vnějšímu usazování. V melanocytech dochází k syntéze dvou typů melaninových granulí, hnědočerné až černé eumelaniny a žlutočervené až světle hnědé feomelaniny. Dřeň obsahuje některé pigmenty, u koňské hřívý je slabě vyvinutá nebo roztržitěná [41–45].



Obr. 8: Struktura vlasu koňské hřívý [46]

Vlasy byly již dříve v historii použity ve forenzních vědách jako matrice pro odhalení otravy, např. vyšetřování otravy arsenem císaře Napoleona, ke sledování expozice těžkým kovům, jako je rtuť, u zubních techniků při práci a životním stylu nebo při studiu distribuce olova u dětí, pocházejícího z výfukových emisí z dopravy. Dnes jsou doporučovány nejruznějšími institucemi, včetně americké agentury pro ochranu životního prostředí (USEPA), Světové zdravotnické organizace (WHO) a Globálního systému monitorování životního prostředí programu OSN, pro posouzení environmentální expozice toxickým kovům nebo k ověření dostatečného příjmu minerálů a odhalení jejich případné nerovnováhy, což může být užitečné

při včasné diagnostice mnoha onemocnění. Nabízejí také velký potenciál pro detekci zakázaných látek u sportovních koní [40–42].

Analýza koňské hřívy pro získání přehledu o množství stopových minerálů a toxických těžkých kovů je velice atraktivní, protože se jedná o snadno dostupnou matici a získání vzorku je neinvazivní. Další výhodou je metabolická inertnost (inaktivnost) vlasu hřívy. Po vytvoření vlas nepodléhá dalším biogenním procesům, proto jeho složení odráží hladiny stopových prvků, které se hromadí v jeho struktuře, tím pádem možné koncentrace prvků jsou vyšší oproti vzorkům krve, moči nebo stolice. Také dochází k dlouhodobému ukládání prvků ve vlasu (několik týdnů, měsíců až let). To potvrzují i některé publikace, kde se hříva ukázala být lepším biologickým indikátorem minerálního stavu koně než krev či krevní sérum, ve kterém minerály podléhají homeostatickým procesům, které okamžitě vyrovnávají koncentrace prvků. Díky nepřetržitému růstu koňské hřívy je možné zařadit vzorek do konkrétního časového období v závislosti na analyzované délce hřívy [40–42].

Obsah minerálů v koňské hřívě může být ovlivněn několika faktory, jako je pigmentace, příjem živin, což bylo potvrzeno několika studiemi, a pravděpodobně i stavem životního prostředí a geografickou polohou, ve které koně žijí, obzvláště pokud jsou chováni na pastvinách, které jsou kontaminovány určitými prvky. Vlivy faktorů jako je věk, pohlaví či plemeno koně na prvkové stopové složení srsti koně nejsou dostatečně podloženy [40].

2.6 Metody analytického stanovení

V literatuře byla popsána široká škála metod pro stanovení obsahu prvků ve vlasech. Mezi nejpoužívanější metody patří hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a atomová/optická emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-AES). Další možnou metodou pro detekci minerálních prvků a rizikových kovů je atomová absorpční spektrometrie (AAS) nebo měření rentgenové emise indukované částicemi (PIXE). Bohužel studie na lidských vlasech ukázaly, že výsledky získané různými metodami nejsou srovnatelné [40].

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na interakci iontů a fyzikálních polí (elektrického a magnetického). Při analýze dochází k přeměně molekuly na ionty, jejich následnému rozlišení podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a nakonec k vytvoření záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Pro ionizaci, přeměnu molekul analytu na ionty, se hojně využívá indukčně vázané argonové plazma [47].

Principem atomové emisní spektrometrie je excitace analytu (v plynném prostředí) na excitační hladinu a následný rychlý deexcitační přechod na hladinu základní, spojený s emisí příslušného záření. Měřená emise záření volných atomů je pro každý prvek charakteristická. Pro atomizaci a excitaci se často používá indukčně vázané plazma [47].

Analytická metoda PIXE umožňuje měření rentgenové emise vybuzené urychlenými ionty, nejčastěji svazkem urychlených protonů. Jedná se o nedestruktivní metodu, u které jsou studované matrice v pevném stavu přímo ozářeny iontovými paprsky a není potřeba je převádět do tekutého stavu/kapalného skupenství [37].

Atomová absorpční spektrometrie je analytická metoda, jež využívá absorpce záření určité vlnové délky a energie volnými atomy v plynném stavu. Absorpcí elektromagnetického záření dochází k excitaci valenčních elektronů. Pozorujeme přitom atomové absorpční spektrum. Jednotlivé spektrální čáry atomového spektra odpovídají energetickému rozdílu mezi základním stavem a excitovaným. Atomy absorbují záření ve velmi úzkém spektrálním intervalu, proto se používá záření stejného prvku, který stanovujeme. Při analýze je měřena absorbance, tedy úbytek elektromagnetického záření způsobený absorpcí volnými atomy. Naměřené hodnoty absorbance se vztahují na koncentraci analytu ve vzorku a jedná se tedy o metodu relativní. Naměřené hodnoty absorbance pro vzorek jsou porovnávány s hodnotami absorbance pro standardy na základě kalibrační křivky [47, 48].

Přístroj atomové absorpční spektrometrie obsahuje zdroj záření; může se jednat o výbojku s dutou katodou, bezelektrodovou výbojku nebo vysokovýkonný kontinuální zdroj (nejčastěji xenonová oblouková výbojka, která pokryje viditelnou i ultrafialovou oblast záření). Ze zdroje záření prochází atomizátorem (absorpčním prostředím), kde dochází k přeměně dávkovaného vzorku na atomovou páru. Nejčastěji je využíván vzorek v kapalném skupenství, ale lze dávkovat i vzorky v plynném nebo pevném skupenství [47, 48].

Plamenový atomizátor využívá zmlžovače a hořáku. Ve zmlžovači je vzorek v kapalném skupenství unášen kontinuálně proudem plynu, oxidantu (např. vzduch), ve formě aerosolu do hořáku, ve kterém probíhá hoření. Jedná se o chemickou reakci mezi palivem a oxidovadlem za vývoje tepla a záření. Jako palivo je nejčastěji používán acetylen nebo laminární předmíchané plameny [47, 48].

Pro převedení vzorku na volné atomy v plynném stavu lze také použít elektrotermický atomizátor. Jedná se o kyvetu, která je vyhřívána elektrickým proudem na potřebnou teplotu a otevřená na obou koncích jejímž středem prochází dráha optického svazku. Kyveta by měla být z materiálu, který je tepelně a elektricky vodivý, chemický odolný, také by měl mít malou tepelnou roztažnost a vysokou teplotu tání. Mezi nejpoužívanější materiály pro výrobu elektrotermických atomizátorů lze řadit grafit nebo méně častěji těžkovitelný kov (např. wolfram či slitiny platiny a rhodia). Při použití elektrotermické atomizace je nižší spotřeba vzorku, protože vzorek je dávkován v objemu 1 až 20 μl , a oproti atomizaci v plameni poskytuje nižší detekční meze [47, 48].

Ze záření prošlého atomizátorem je v monochromátoru pomocí difrakční mřížky separována chtěná vlnová délka fokusovaná výstupní šterbinou na detektor. Jako detektor je nejčastěji používán fotonásobič nebo fotodioda a signál je následně zpracováván pomocí procesoru v počítači [47, 48].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je vypracování literární rešerše o aktuálním stavu kontaminace jednotlivých složek životního prostředí rizikovými prvky a využití matrice koňské hřívy pro jejich stanovení. V experimentální části je cílem výběr a odběr vhodných matric, optimalizace postupů předúpravy vzorků a stanovení jednotlivých vybraných rizikových prvků (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni, Zn). V neposlední řadě je cílem zhodnocení dosažených výsledků a koňské hřívy jako možného bioindikátoru pro posouzení kontaminace životního prostředí rizikovými prvky.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Požité chemikálie

Certifikovaný referenční materiál jednoprvkový ASTASOL[®] (ANALYTIKA[®], spol. s r.o.):

- Kadmium: $c = 1,000 \pm 0,002$ g/l v 2% HNO₃
- Chrom: $c = 1,000 \pm 0,002$ g/l v 2% HNO₃
- Měď: $c = 100 \pm 0,2$ mg/l v 2% HNO₃
- Olovo: $c = 1,000 \pm 0,002$ g/l, $100 \pm 0,2$ mg/l v 2% HNO₃
- Nikl: $c = 1,000 \pm 0,002$ g/l v 2% HNO₃
- Zinek: $c = 100 \pm 0,2$ mg/l v 2% HNO₃

Modifikátor matrice Pd, $c = 2$ g/l v 5% HNO₃ (ANALYTIKA[®], spol. s r.o.)

Modifikátor matrice Mg, $c = 2$ g/l v 0,2% HNO₃ (ANALYTIKA[®], spol. s r.o.)

Certifikovaný referenční materiál pro stopové kovy DORM-3 – rybí protein (NRC)

Kyselina dusičná 67% p. a. (ANALYTIKA[®], spol. s r.o.)

Peroxid vodíku 30% p. a. (ANALYTIKA[®], spol. s r.o.)

Mili-Q voda

4.2 Použité pomůcky

Základní laboratorní vybavení, automatické pipety (Thermo Scientific, 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl), keramické nůžky, elastické gumičky (Hippotonic), uzavíratelný sáček (PE-LD, IKEA), plastové nádobky pro uchování vzorků, parafilm (Bemis[®]).

4.3 Požité přístroje

Atomový absorpční spektrometr AAS ContraAA 800D (Analytik Jena)

Pokročilý analyzátor rtuti AMA 254 (Altec spol. s.r.o.)

Mikrovlnný vysokotlaký rozkladný systém ENTHOS EASY (Milestone)

Mili-Q Ultrapure Water Systems (Merck)

Analytické laboratorní váhy SPB32 (Scaltec Instruments GmbH)

Analytické laboratorní váhy Entris[®] II (SARTORIUS)

Oscilační mlýn MM 200 (Retsch GmbH)

4.4 Analyzované vzorky a jejich odběr

Pro odběr vzorků koňské hřívky byly zvoleny dvě lokality. První lokalitou je Jezdecký klub Osada lípa, který spadá pod obec Zadní Arnoštov v Pardubickém kraji (viz Příloha 1). V jezdeckém klubu se nachází v současnosti 16 koní. Společně s hřívou od všech 16 koní byly odebrány i vzorky krmiva – oves, granule a směs müsli, jehož složky byly rozděleny na ovesné vločky, granule a kukuřici. Druhou lokalitou je menší stáj U Chytrého poníka ve Střelicích u Brna (viz Příloha 2), kde se nachází aktuálně 9 koní a hřívka byla odebrána u 8 z nich. V Tab. 5 se nachází základní informace o koních, kterým byla hřívka odebrána, tedy věk, plemeno, zbarvení a pohlaví. Majitelé obou stájí se zapojením svých koní do výzkumu souhlasili. Odběr vzorků hřívky probíhal v přirozeném prostředí koní (koňský box, výběh) a během odběru žádnému koni nebylo ublíženo na zdraví. Aby mohlo být dosaženo spolehlivých výsledků při stopové analýze bylo potřeba dodržet určité zásady při odběru, skladování, úpravě a analýze vzorků a minimalizovat riziko kontaminace [22].

Tab. 5: Testované subjekty a základní informace

Stáj	Jméno	Označení vzorku	Věk [roky]	Plemeno	Zbarvení	Pohlaví
JK Osada Lípa	Angi	L1	29	Hafling	isabela	klisna
	Le Schuplik	L2	15	Český teplokrevník	hnědák	valach
	Sazka	L3	21	Český teplokrevník	bělouš	klisna
	Maverick	L4	17	Český teplokrevník	hnědák	valach
	Logika	L5	28	Český teplokrevník	hnědák	klisna
	Poseidon	L6	14	Slovenský teplokrevník	vraník	valach
	Safira	L7	21	Český teplokrevník	hnědák	klisna
	Lancelot	L8	20	teplokrevný	bělouš	valach
	Lotos	L9	15	Český teplokrevník	vraník	valach
	Rusty	L10	9	Český teplokrevník	hnědák	valach
	Coldplay	L11	18	Holštýnský teplokrevník	hnědák	valach
	Jupiter	L12	21	teplokrevný	ryzák	valach
	Lucifer	L13	18	Český teplokrevník	vraník	valach
	Medea Pluto	L14	16	Lipický kůň	bělouš	valach
	Bady	L15	20	Shetlandský pony	černobílý strakáč	valach
	Otys	L16	20	Fjordský kůň	plavák	valach
U Chytrého poníka	Branwen	S1	0,4	Welsh part-bred	ryzák	klisna
	Vašík	S2	18	Starokladrubský kůň	vraník	valach
	Merlin	S3	11	ponny	ryzák	valach
	Coran	S4	11	Welsh part-bred	ryzák	hřebeč
	Jakari	S5	3	Welsh part-bred	hnědák	hřebeč
	Lola	S6	21	teplokrevný	hnědý strakáč	klisna
	Poppy	S7	6	Quarter horse	isabela	klisna
	Bakar	S8	18	Welsh part-bred	ryzák	klisna

Odběr vzorků byl prováděn v září 2023, dokud měli koně „letní srst“. Malé trsy hřívy byly koním odstříhány co nejbližší ke kůži pomocí keramických nůžek na krku v oblasti prvního krčního obratle, hned za ušima (v místě usazení nátylníku ohlávky/uzdečky). Trs hřívy byl zajištěn elastickou gumičkou a vložen do PE-LD uzavíratelného sáčku. Keramické nůžky byly opláchnuty destilovanou vodou a použity na odebrání dalšího vzorku. Stejným způsobem bylo odebráno všech 24 vzorků hřívy koní. Po odebrání vzorku byly všechny převezeny a uloženy do mrazničky (-10 °C), kde byly uchovávány do doby rozkladu.

Vzorky krmiva (viz Tab. 6) byly odebírány také v jednorázových rukavicích, přímo z bedny, ve které je krmivo skladováno. Po odebrání byly uloženy do uzavíratelného sáčku a uchovávány při laboratorní teplotě (20 °C).

Tab. 6: Odebrané vzorky krmiva

Označení	Vzorek	Označení	Vzorek
K1	oves	K3	granule (müsli)
K2	granule	K4	ovesné vločky (müsli)
		K5	kukuřice (müsli)

4.5 Úprava vzorků před analýzou

Vzorky hřívny byly upraveny před analýzou Cd, Cr, Cu, Pb, Ni a Zn pomocí mikrovlnného rozkladu. Na analytických vahách bylo naváženo s přesností na čtyři desetinná místa přibližně 0,2 g vzorku a následně převedeno kvantitativně do teflonové patrony. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml kyseliny dusičné a 2,5 ml peroxidu vodíku. Patrony s nadávkovanými vzorky a chemikáliemi se nechaly pro dokonalý rozklad 1 hodinu reagovat. Poté byly uzavřeny a vloženy do mikrovlnného systému ETHOS EASY na program „Animal tissue“, jehož podmínky jsou uvedeny v Tab. 7. Po rozkladu byly vzorky z vychladnutých patron kvantitativně převedeny do 25ml odměrných baněk a doplněny vodou Mili-Q po rysku. Rozložené vzorky byly následně uchovávány v 50ml plastových zkumavkách omotaných parafilmem v chladu a temnu.

Vzorky krmiva byly nejprve rozdrobeny na oscilačním mlýně MM 200 při frekvenci vibrací 25 Hz (1500 otáček za minutu) po dobu 9 minut. Následně bylo naváženo na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa přibližně 0,5 g vzorku a kvantitativně převedeno do teflonové patrony. K nadrcenému vzorku bylo přidáno 9 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Patrony byly uzavřeny a vloženy do mikrovlnného systému na program „Wheat flour“ (viz Tab. 7). Rozložené vzorky byly opět převedeny do 25ml odměrných baněk a doplněny vodou Mili-Q po rysku a uchovávány v 50ml plastových zkumavkách omotaných parafilmem v chladu a temnu.

Tab. 7: Teplotní programy pro mikrovlnný rozklad

Program	Navážka [g]	HNO ₃ [ml]	H ₂ O ₂ [ml]	Proces	Teplota [°C]	Výkon [W]	Délka procesu [min]
Animal tissue	0,2	10	2,5	zahřívání	200	1800	15
				udržování teploty	200	1800	15
				chlazení	-	-	30
Wheat flour	0,5	9	1	zahřívání	200	1800	15
				udržování teploty	200	1800	15
				chlazení	-	-	30

4.6 Stanovení obsahů vybraných rizikových prvků

4.6.1 Stanovení Hg

Stanovení rtuti ve vzorcích bylo provedeno pomocí přístroje Advanced Mercury Analyser AMA 254. Jde o jednoúčelový atomový absorpční spektrofotometr se sériovým uspořádáním měřících kyvet pro stanovení rtuti v pevných i kapalných vzorcích bez potřeby předúpravy vzorku. Na analytických vahách bylo naváženo do lodičky přibližně 80 mg pevného vzorku hřívy či nadrceného krmiva. Lodička s navážkou byla zavedena do spalovací trubice, kde je řízeným ohřevem vzorek vysušen při 120 °C po dobu 60 s, a pak spalován kyslíkem při 650 °C po dobu 150 s. Rozkladné produkty procházejí přes katalyzátor, kde jsou zachyceny kyselé látky, a dále amalgamátor, kde je selektivně zachycena rtuť. Krátkodobým ohřevem je rtuť z amalgamátoru uvolněna a v měřící kyvetě je změřena její absorbance záření na vlnové délce 253,65 nm. Jako zdroj záření slouží nízkotlaká rtuťová výbojka. Každý vzorek byl proměřen dvakrát a jako referenční materiál byl použit Certifikovaný referenční materiál pro stopové kovy DORM-3 – rybí protein (NRC). Mez detekce je stanovena výrobcem na 0,01 ng Hg [49].

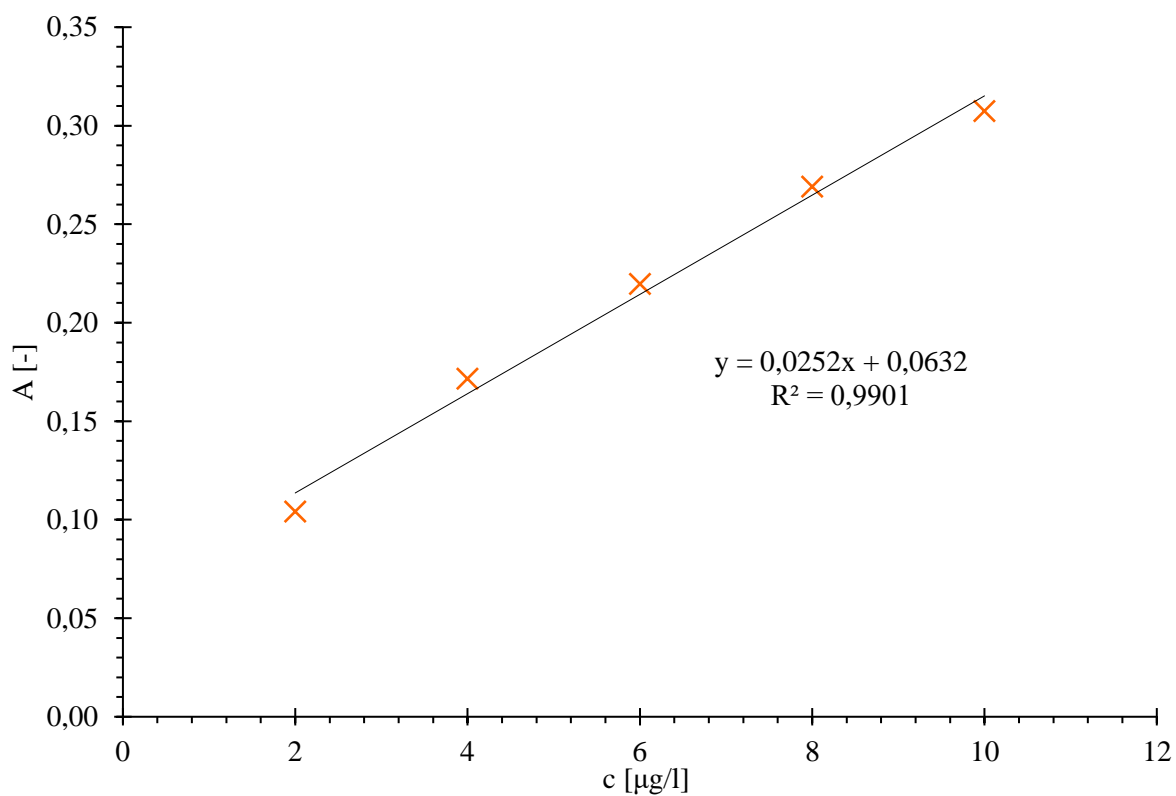
4.6.2 Stanovení Cd, Cr, Cu, Pb, Ni

Vybrané rizikové prvky byly stanoveny na atomovém absorpčním spektrometru AAS ContrAA 800D. Kadmium, chrom, měď, olovo a nikl byly analyzovány s využitím elektrotermické atomizace (ET-AAS). Pro měření každého z pěti prvků byl připraven pracovní kalibrační roztok o potřebné koncentraci za použití kalibračního standardu a před vlastním měřením vzorků byla proměřena pětibodová kalibrace. Kalibrační roztoky byly ředěny přístrojem na požadované koncentrace jednotlivých bodů kalibrační křivky (viz Obr. 9–Obr. 13). Při měření a kalibraci byl používán modifikátor matrice, který umožňuje ovlivnění teplotního programu (např. použití vyšších teplot pyrolýzy) a zvýšení signálu analytu. Pro prvky Pb, Cd a Cu byl používán modifikátor Pd/Mg(NO₃)₂, který byl připraven z 5 ml modifikátoru Pd o koncentraci 2 g/l a 0,5 ml modifikátoru Mg o stejné koncentraci do 10ml odměrné baňky. Pro prvky Cr a Ni byl používán modifikátor Mg(NO₃)₂, který byl připraven z 2,5 ml modifikátoru Mg o koncentraci 2 g/l do 10ml odměrné baňky.

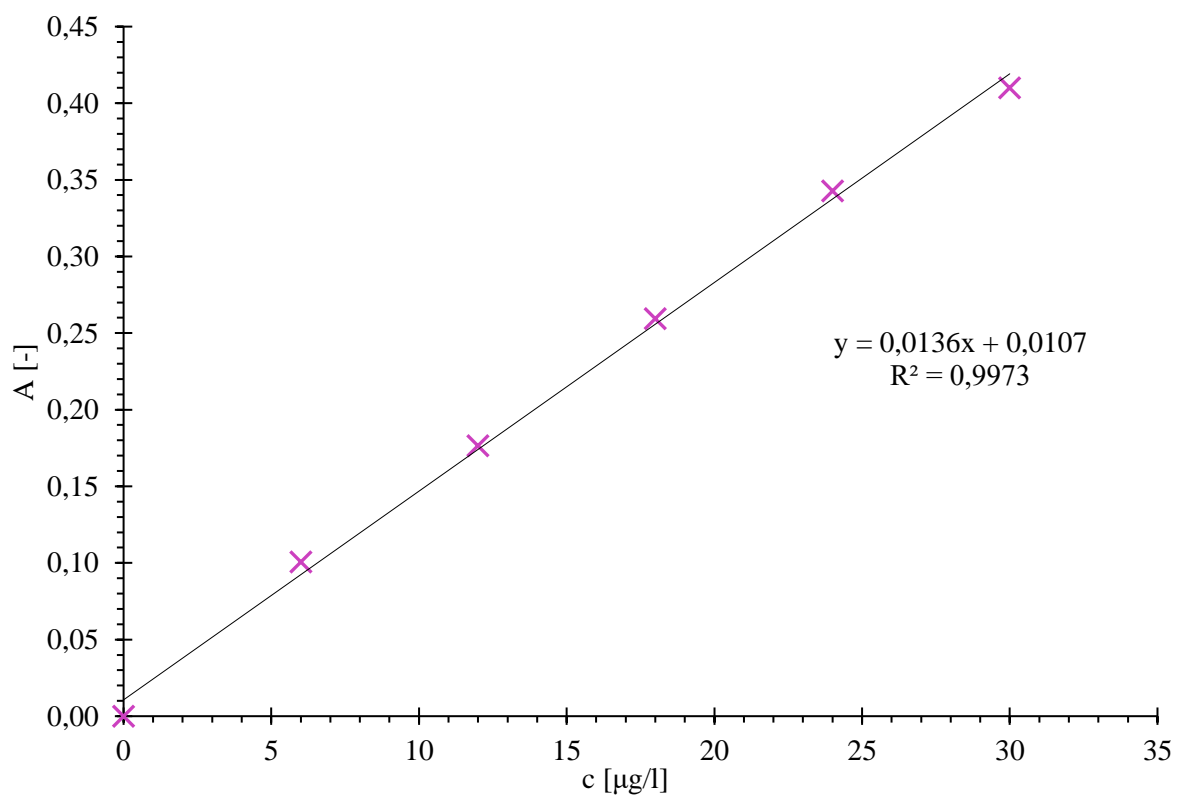
Vzorky byly dávkovány automatickou pipetou do plastových vialek po 1 ml. Připravené vialky se vzorky, Mili-Q vodou pro proplach, kalibračním roztokem a modifikátorem byly umístěny do automatického dávkovače přístroje. Při analýze vzorků bylo do grafitové kyvety nadávkováno 20 µl vzorku a 5 µl modifikátoru. U každého vzorku byla absorbance měřena třikrát. Podmínky metod stanovení jednotlivých prvků jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Optimalizované podmínky metod stanovení ET-AAS

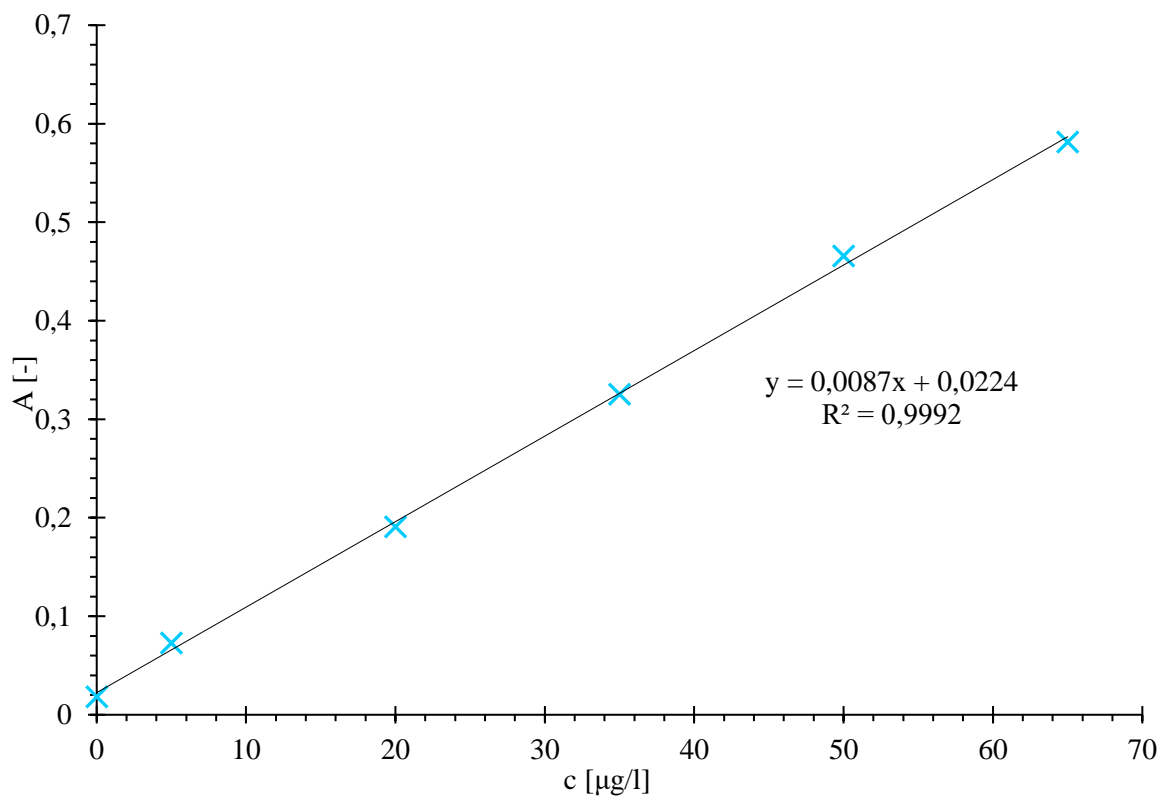
Prvek	λ [nm]	Sušení [°C]	Pyrolýza [°C]	Atomizace [°C]	Modifikátor
Cd	228,8018	110	700	1750	Pd/Mg(NO ₃) ₂
Cr	357,8687	110	1400	2400	Mg(NO ₃) ₂
Cu	324,754	110	1150	2350	Pd/Mg(NO ₃) ₂
Pb	383,306	110	750	1950	Pd/Mg(NO ₃) ₂
Ni	232,003	110	1050	2350	Mg(NO ₃) ₂



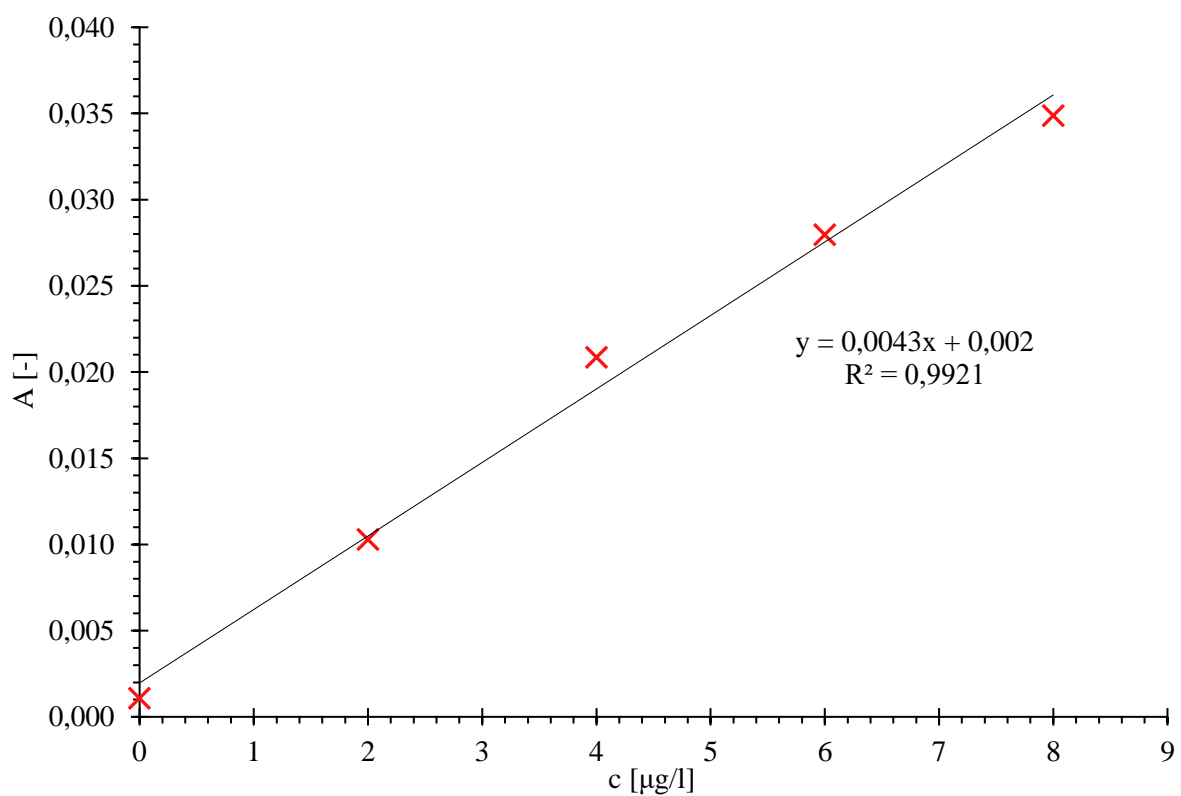
Obr. 9: Kalibrační křivka kadmia



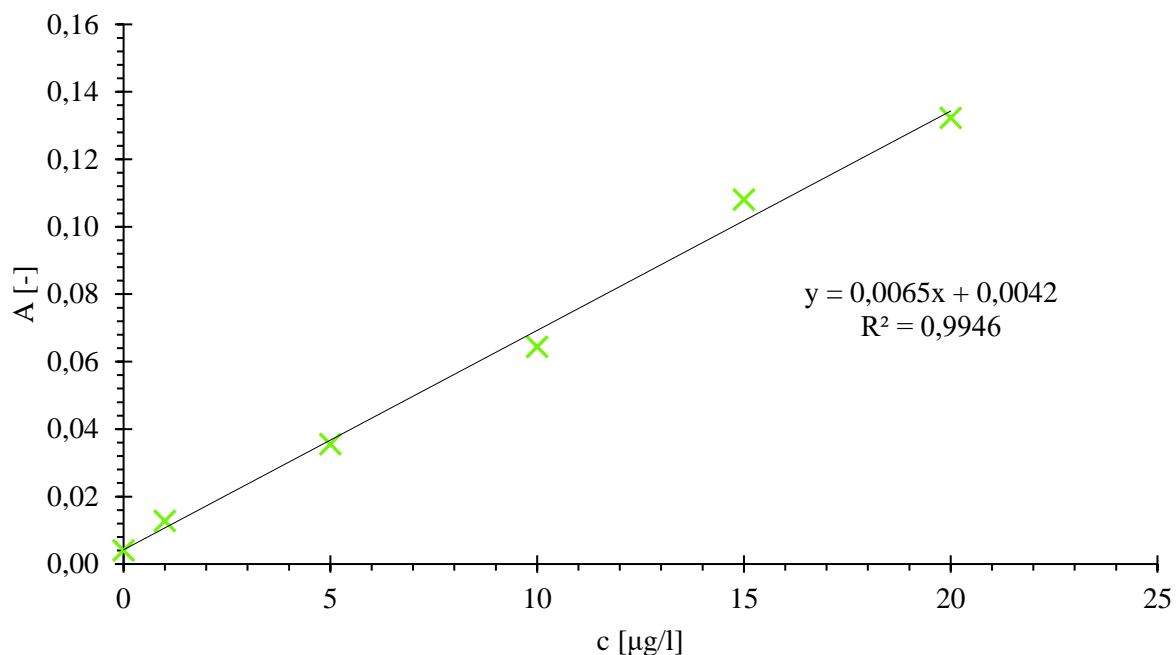
Obr. 10: Kalibrační křivka chromu



Obr. 11: Kalibrační křivka mědi



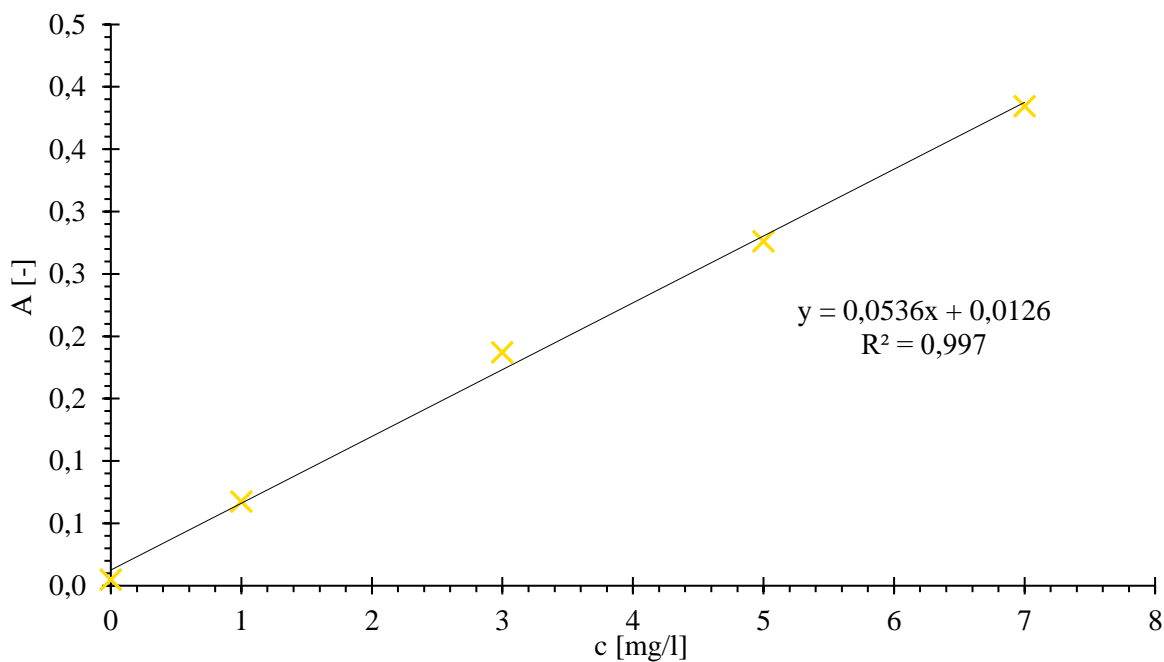
Obr. 12: Kalibrační křivka olova



Obr. 13: Kalibrační křivka niklu

4.6.3 Stanovení Zn

Pro stanovení zinku byl použit atomový absorpční spektrometr AAS ContrAA 800D s atomizací v plameni (F-AAS), kde jako oxidant byl využit vzduch a jako palivo acetylen. Pro měření zinku byla zvolena absorpční čára o vlnové délce 213,857 nm, rychlost průtoku plynu byla nastavena na 50 dm³/h. Z referenčního materiálu roztoku zinku byla vytvořena koncentrační řada čtyř kalibračních roztoků do 10ml odměrných baněk. Na začátku analýzy byla změřena kalibrační křivka (viz Obr. 14) a poté vzorky. Roztok vzorku byl nasáván po dobu 5 s a následně byla třikrát změřena absorbance. Mezi jednotlivými vzorky byla nasávána Mili-Q voda pro vyčištění přístroje a minimalizaci vzájemné kontaminace.



Obr. 14: Kalibrační křivka zinku

4.7 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Analytické metody jsou charakterizovány limity detekce a stanovitelnosti. Mez detekce (LOD) je definována jako nejnižší hodnota koncentrace analytu, kterou může analytický přístroj spolehlivě detekovat. Je dána vztahem (1):

$$LOD = \frac{3 \cdot s_B}{S} \quad (1)$$

kde s_B je směrodatná odchylka slepého stanovení a S je dána směrnici kalibrační křivky, jež vyjadřuje citlivost [50, 51].

Mez stanovitelnosti (LOQ) je definována jako nejnižší koncentrace analytu, kterou je přístroj schopen nejen detekovat, ale také stanovit s určitou spolehlivostí. Je dána vztahem (2):

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_B}{S} \quad (2)$$

kde s_B je směrodatná odchylka slepého stanovení a S je dána směrnici kalibrační křivky, jež vyjadřuje citlivost [50, 51].

Pro každou metodu byly stanoveny hodnoty LOD a LOQ pomocí přístrojů AAS ContraAA 800D. Pro získání hodnot LOD a LOQ byla proměřena absorbance slepého stanovení desetkrát. Stanovené experimentální hodnoty jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9: Meze detekce a meze stanovitelnosti optimalizovaných metod

Prvek	LOD [$\mu\text{g/l}$]	LOQ [$\mu\text{g/l}$]	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]	Metoda
Cd	0,0278	0,0833	-	-	ET-AAS
Cr	0,1809	0,5428	-	-	ET-AAS
Cu	2,0320	6,0950	-	-	ET-AAS
Pb	3,6660	11,0000	-	-	ET-AAS
Ni	0,7038	2,1110	-	-	ET-AAS
Zn	-	-	0,1406	0,4217	F-AAS

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Obsah rtuti ve vzorcích koňské hřívě a krmiva

Naměřené hodnoty rtuti v koňské hřívě se pohybovaly v rozmezí od 0,0032 mg/kg do 0,0077 mg/kg (viz Příloha 3). U většiny koní hříva obsahovala koncentrace pod 0,005 mg/kg rtuti, u pětice koní byly v hřívě naměřeny vyšší koncentrace rtuti a pouze u dvou z nich přesahovaly naměřené koncentrace hodnotu 0,007 mg/kg. Při rozdělení koní podle jejich pohlaví a následném zprůměrování hodnot byly zjištěny rozdíly v desetitisícinách mg/kg, hříva hřebců obsahovala 0,0043 mg/kg rtuti, hříva valachů 0,0045 mg/kg a klisen 0,0044 mg/kg rtuti. Mezi odběrovými lokalitami byl minimální rozdíl, v lokalitě JK Osada lípa obsahovala koňská hříva v průměru 0,0042 mg/kg rtuti a v lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace mírně vyšší a to 0,0049 mg/kg. Tento rozdíl by mohl být způsoben umístěním druhé lokality, tedy blízko aglomerace, kde jsou koně častěji vystaveni vyšším koncentracím rtuti. V druhé lokalitě byla zaznamenána kladná korelace koncentrací rtuti v hřívě v závislosti na věku koní.

Ve vzorcích krmiva z první lokality byly naměřeny koncentrace rtuti v rozmezí od 0,001 mg/kg do 0,015 mg/kg (viz Příloha 3). Nejvyšší koncentrace rtuti obsahovaly granule K2, tedy krmivo, které je průmyslově zpracované, na rozdíl od ostatních odebraných vzorků.

V několika studiích V. V. Kalashnikov a spol. stanovovali rtuť v koňské hřívě pomocí optické emisní spektrometrie a hmotnostní spektrometrie a jejich naměřené koncentrace se pohybovaly ve větším rozmezí od 0,002 do 0,01 mg/kg [30–34]. Mnohem větší koncentrace byly naměřeny při studiích od K. Asano, R. Asano, K. Suzuki a spol., kde používanou technikou bylo PIXE a AES a jejich naměřené koncentrace byly průměrně od 0,425 do 0,91 mg/kg [36–38].



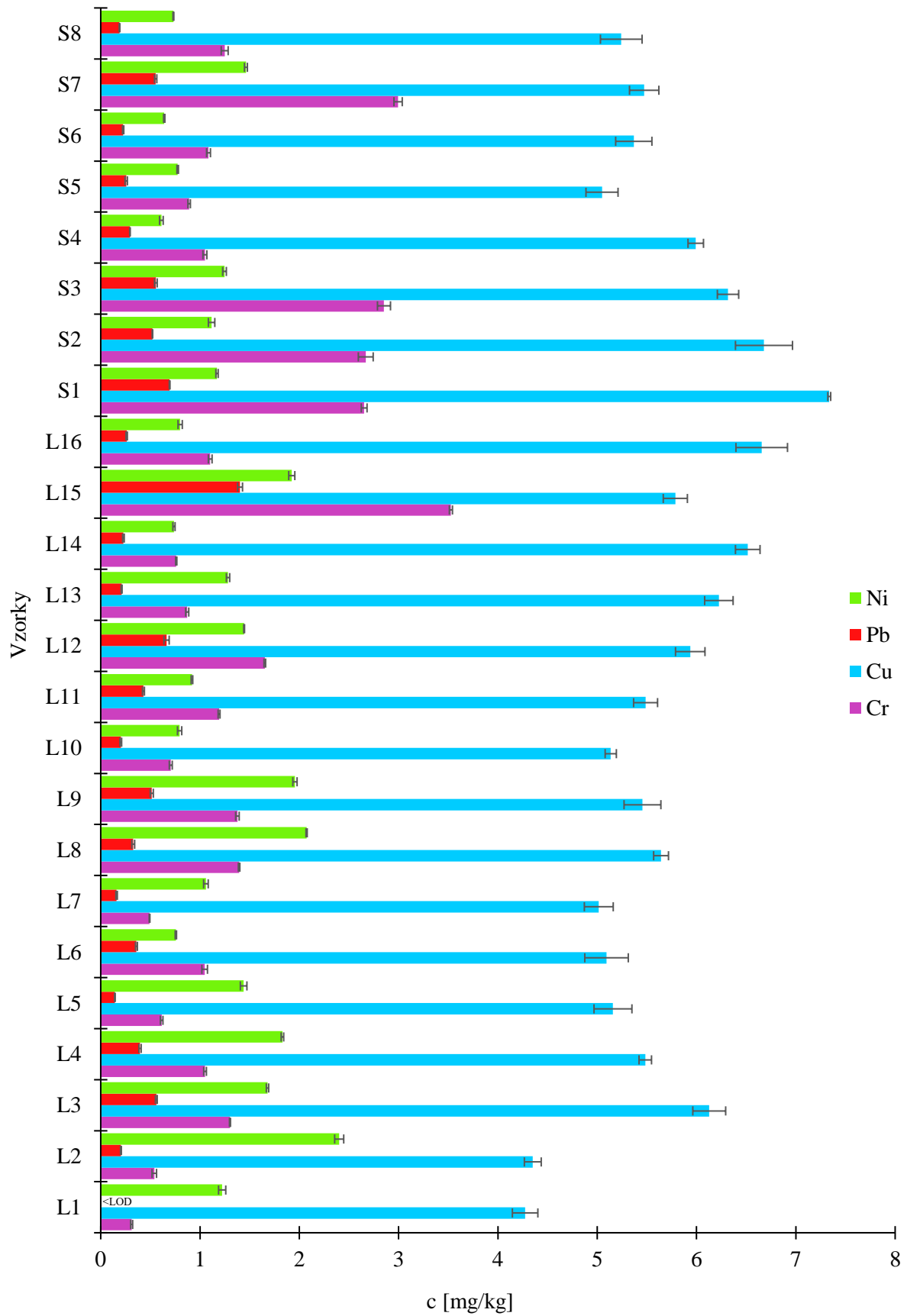
Obr. 15: Koncentrace rtuti v jednotlivých vzorcích

5.2 Obsah rizikových kovů stanovených ET-AAS ve vzorcích koňské hřívě a krmiva

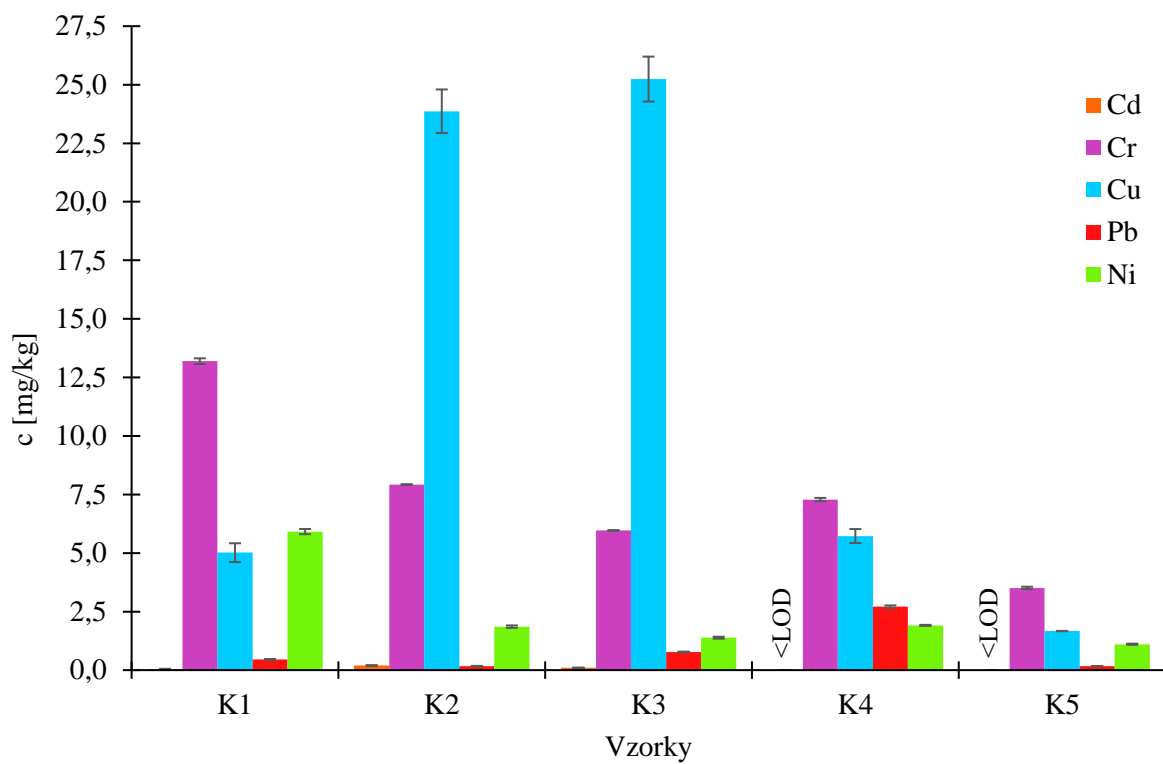
Pomocí elektrotermické atomizace na grafitové kyvetě byly měřeny koncentrace rizikových prvků Cd, Cr, Cu, Pb a Ni. Ve všech vzorcích koňské hřívě byly naměřené koncentrace kadmia pod limitem detekce. Koncentrace chromu se pohybovaly v rozmezí od 0,312 mg/kg do 3,527 mg/kg, pouze u pěti koní přesahovala naměřená koncentrace chromu v koňské hřívě hodnotu 2,5 mg/kg. Koncentrace mědi nabývaly hodnot od 4,274 mg/kg do 7,336 mg/kg, naměřená koncentrace Cu v koňské hřívě byla jen u dvou koní nižší než hodnota 5,0 mg/kg. Olovo bylo přítomno v rozmezí od 0,143 mg/kg do 1,403 mg/kg. Nejvyšší koncentraci olova obsahoval vzorek L15, ostatní vzorky obsahovaly koncentrace v rozmezí od 0,143 mg/kg do 0,694 mg/kg. Koncentrace niklu se pohybovaly v rozmezí od 0,611 mg/kg do 2,401 mg/kg. Naměřené koncentrace vzorků jsou uvedeny v kapitole Příloha 3. Průměrně vyšší koncentrace Cr, Cu a Pb se vyskytovaly ve vzorcích jedinců z lokality U Chytrého poníka, naproti tomu koncentrace Ni byly průměrně vyšší ve vzorcích jedinců z lokality JK Osada lípa, pravděpodobně kvůli poměrně vysokému obsahu niklu ve vzorku krmiva K1 (oves), který představuje majoritní podíl krmné dávky koní.

Ve vzorcích krmiva bylo kadmium naměřeno ve třech z nich (K1 – K3) v rozmezí od 0,052 mg/kg do 0,194 mg/kg. Ostatní rizikové prvky byly naměřeny u všech vzorků krmiva, chrom v rozmezí od 3,511 mg/kg do 13,195 mg/kg, měď od 1,670 mg/kg do 25,241 mg/kg, olovo v rozmezí od 0,171 mg/kg do 2,709 mg/kg a nikl od 1,106 mg/kg do 5,917 mg/kg.

V. V. Kalashnikov a spol. v několika studiích stanovovali rizikové prvky v koňské hřívě pomocí optické emisní spektrometrie a hmotnostní spektrometrie a jejich naměřené koncentrace se pohybovaly u kadmia v rozmezí 0,005–0,011 mg/kg, jednalo se pravděpodobně o citlivější metodu. U ostatních prvků byly nalezeny hodnoty většinou v nižších koncentracích: chrom v rozmezí 0,089–0,326 mg/kg, měď 5,62–6,19 mg/kg, olovo v rozmezí 0,05–0,27 mg/kg a nikl 0,125–0,440 mg/kg [30–34]. M. Brummer-Holder a spol. naměřili při studii průměrné koncentrace chromu 0,485 mg/kg, mědi 14,537 mg/kg, olova 0,621 mg/kg a niklu 0,992 mg/kg. Výrazně vyšší hodnoty stanovili u mědi [35]. Při výzkumech od K. Asano, R. Asano, K. Suzuki a spol., kde používanou technikou bylo PIXE a AES, byly naměřené koncentrace chromu v rozmezí 0,22–0,49 mg/kg, mědi 4,80–6,72 mg/kg, koncentrace olova v rozmezí 0,93–1,43 mg/kg a niklu 0,19–0,39 mg/kg. U chromu a niklu zjistili výrazně nižší hodnoty, oproti výsledkům této bakalářské práce [36–38]. D. van der Merwe a spol. měřili koncentrace rizikových prvků pomocí ICP-MS. Průměrné hodnoty byly u chromu 0,4 mg/kg, mědi 7,2 mg/kg, olova 0,4 mg/kg a u niklu 0,3 mg/kg [39].



Obr. 16: Koncentrace Cr, Cu, Pb a Ni ve vzorcích koňské hřívy

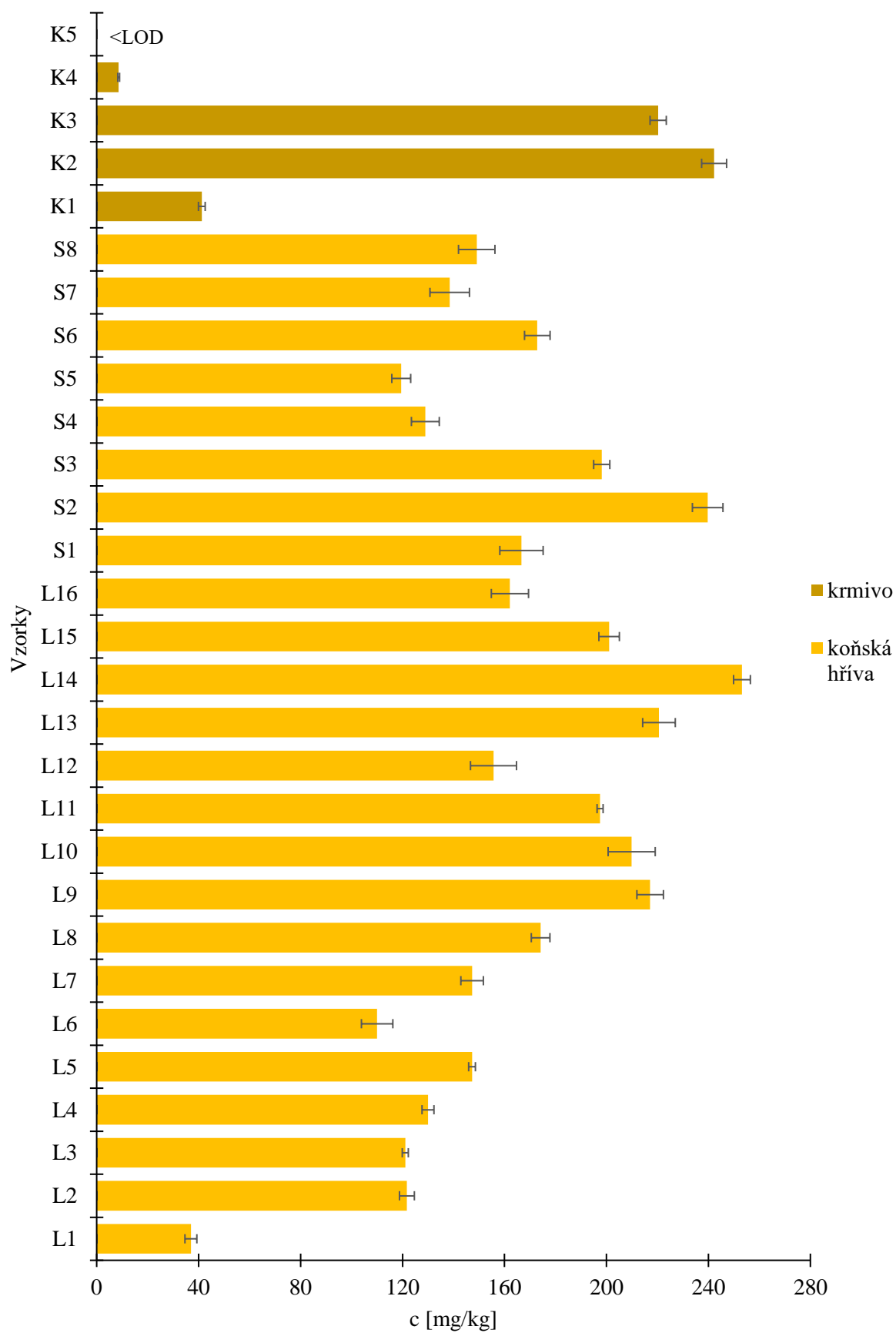


Obr. 17: Koncentrace Cd, Cr, Cu, Pb, Ni ve vzorcích krmiva

5.3 Obsah zinku stanovený F-AAS ve vzorcích koňské hřívy a krmiva

Koncentrace zinku ve vzorcích koňské hřívy se pohybovaly v rozmezí od 37,0 mg/kg do 253,2 mg/kg (viz Příloha 3). Okrajové hodnoty rozmezí byly naměřeny v lokalitě JK Osada Lípa. Nejnižší koncentrace byla naměřena u nejstaršího jedince v populaci (i v porovnání s druhou lokalitou), jednalo se o klisnu plemene Hafling ve zbarvení isabela, což může indikovat dlouhodobý nedostatek zinku, který může negativně působit na nervový systém a hormonální rovnováhu. Tento fakt může nepřímo poukazovat na probíhající léčbu klisny s Cushingovým syndromem. Jedná se o poruchu endokrinního systému, u koní postižených Cushingovým syndromem dochází k degeneraci nervových zakončení a nedostatek dopaminu způsobuje nadprodukcí hormonů hypofýzy, které jsou zodpovědné za vznik klinických příznaků (potíže s termoregulací, zhoršená kvalita srsti či ztráta hmotnosti) [52]. U subjektů z lokality U Chytrého poníka byl zaznamenán klesající trend koncentrace zinku v závislosti na věku jedinců. Koncentrace zinku v krmivu se pohybovaly v rozmezí od 8,6 mg/kg do 242,2 mg/kg (viz Příloha 3). Ve vzorku K5 (kukuřice ve směsi müsli) bylo množství zinku pod limitem detekce.

Ve více studiích V. V. Kalashnikov a spol. stanovovali zinek pomocí emisní spektrometrie a hmotnostní spektrometrie a jejich naměřené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 124,5–140,6 mg/kg [30–34]. M. Brummer-Holder a spol. naměřili pomocí ICP-OES průměrnou koncentraci zinku 173,7 mg/kg [35]. K. Asano, R. Asano, K. Suzuki a spol. ve výzkumech, kde používanou technikou bylo PIXE a AES, naměřili koncentrace zinku v rozmezí 86,0–200,9 mg/kg [36–38]. D. van der Merwe a spol. ve výzkumu měřili koncentraci zinku pomocí ICP-MS, průměrnou hodnotou bylo 145,0 mg/kg [39]. Naměřené hodnoty koncentrací zinku v uvedených studiích se pohybovaly v obdobném rozmezí jako v této bakalářské práci.



Obr. 18: Koncentrace zinku v jednotlivých vzorcích

5.4 Zhodnocení naměřených výsledků

Mezi naměřenými hodnotami koncentrací jednotlivých rizikových prvků bylo hledáno několik možných souvislostí. U každé hledané závislosti bylo nejprve nahlédnuto na všechny analyzované vzorky dohromady a následně byly vzorky rozděleny dle lokality odběru pro porovnání těchto dvou míst.

První ze studovaných závislostí byl vliv věku koně na hodnotě koncentrace prvku stanoveného v hřívě. Tedy, zda koncentrace prvku s věkem narůstá, a dochází tak k jeho akumulaci ve vlasu hřívy, nebo koncentrace prvku uloženého v hřívě klesá a kůň ztrácí některé potřebné stopové prvky (Zn).

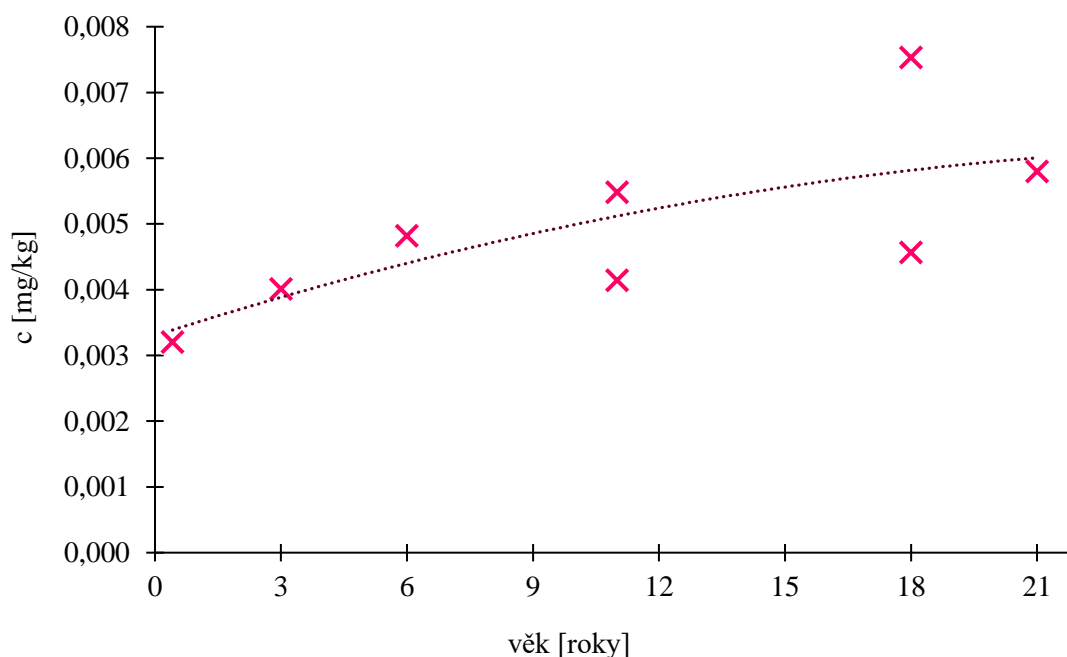
Druhá hledaná souvislost byla, zda má pohlaví koně vliv na ukládání a akumulaci rizikových prvků v hřívě. Konkrétněji, jestli se vyskytují průměrně vyšší nebo nižší množství rizikového prvku u klisen, valachů či hřebců. Zároveň byly vzorky v těchto třech kategoriích řazeny podle věku koní od nejmladšího po nejstarší, pro zjištění souvislostí i v tomto ohledu.

Dále byla hledaná možná souvislost mezi koncentrací prvku a zbarvením koně. Do této závěrečné práce byly zahrnuta nejčastěji se vyskytující zbarvení koní: bělouš, jehož hříva i žíně jsou v dospělosti bílé až lehce našedlé; isabela, jejíž hříva i žíně mají bílou až světle žlutou barvu; ryzák, kterého hříva i žíně jsou různého odstínu červenohnědé až hnědé; hnědák, vraník a plavák, jejichž hříva i žíně jsou černé; strakáč (černobílý/hnědý), u kterého záleží, na jakou barvu srsti hříva a žíně navazují. Pro přehlednější vyhodnocení byly srovnávány zbarvení bělouš, ryzák, hnědák a vraník. Přesněji bylo zjišťováno, zda se ve hřívě světlejší barvy, a tedy nižšího obsahu melaninu (např. u zbarvení bělouše či isabely), akumuluje průměrně větší množství rizikových prvků než v hřívě tmavší barvy, a tedy vyššího obsahu melaninu (např. zbarvení hnědáka či vraníka) nebo naopak. Případně zda některý typ pigmentu způsobuje vyšší obsah některého z měřených rizikových prvků než jiný typ (např. zbarvení ryzáka vs. vraníka). V jednotlivých kategoriích zbarvení byly vzorky seřazeny podle věku koní.

Poslední hledaná souvislost byla mezi množstvím rizikového prvku a plemenem koní. Rozmanitost plemen koní byla velická, více vzorků bylo analyzováno pouze u plemena Českého teplokrevníka v lokalitě JK Osada lípa a plemena Welsh part-bred v lokalitě U Chytrého poníka, proto byly pro srovnání použity pouze tyto dvě plemena. Vzorky v obou kategoriích plemen byly seřazeny i podle věku koní. Avšak u žádného z analyzovaných rizikových prvků nebyla nalezena žádná souvislost z tohoto úhlu pohledu.

5.4.1 Rtuť

U koncentrací rtuti byl mezi odběrovými lokalitami minimální rozdíl, v lokalitě JK Osada lípa obsahovala koňská hříva v průměru 0,0042 mg/kg rtuti a v lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace mírně vyšší a to 0,0049 mg/kg. Krmivo odebrané v místě JK Osada lípa obsahovalo průměrně 0,0051 mg/kg. V druhé lokalitě byla zjištěna kladná závislost koncentrace rtuti na věku (viz Obr. 19). V souvislosti s pohlavím byly zjištěny rozdíly v desetitisícinách mg/kg, hříva hřebců obsahovala 0,0043 mg/kg rtuti, hříva valachů 0,0045 mg/kg a klisen 0,0044 mg/kg rtuti (viz Obr. 22). Při porovnání (viz Obr. 23) průměrných koncentrací u jednotlivých zbarvení vzrůstaly koncentrace v pořadí ryzák (0,0042 mg/kg) < hnědák (0,0046 mg/kg) < bělouš (0,0047 mg/kg) < vraník (0,0048 mg/kg).



Obr. 19: Závislost koncentrace rtuti ve vzorcích hřívý na věku koní (JK Osada Lípa)

5.4.2 Kadmium

U naměřených hodnot koncentrací kadmia nebylo možné najít žádné závislosti, protože koncentrace všech vzorků koňské hřívý byly pod limitem detekce. U tří z pěti vzorků krmiva odebraného z lokality JK Osada lípa, které obsahovala měřitelná množství, byla průměrná koncentrace kadmia 0,115 mg/kg.

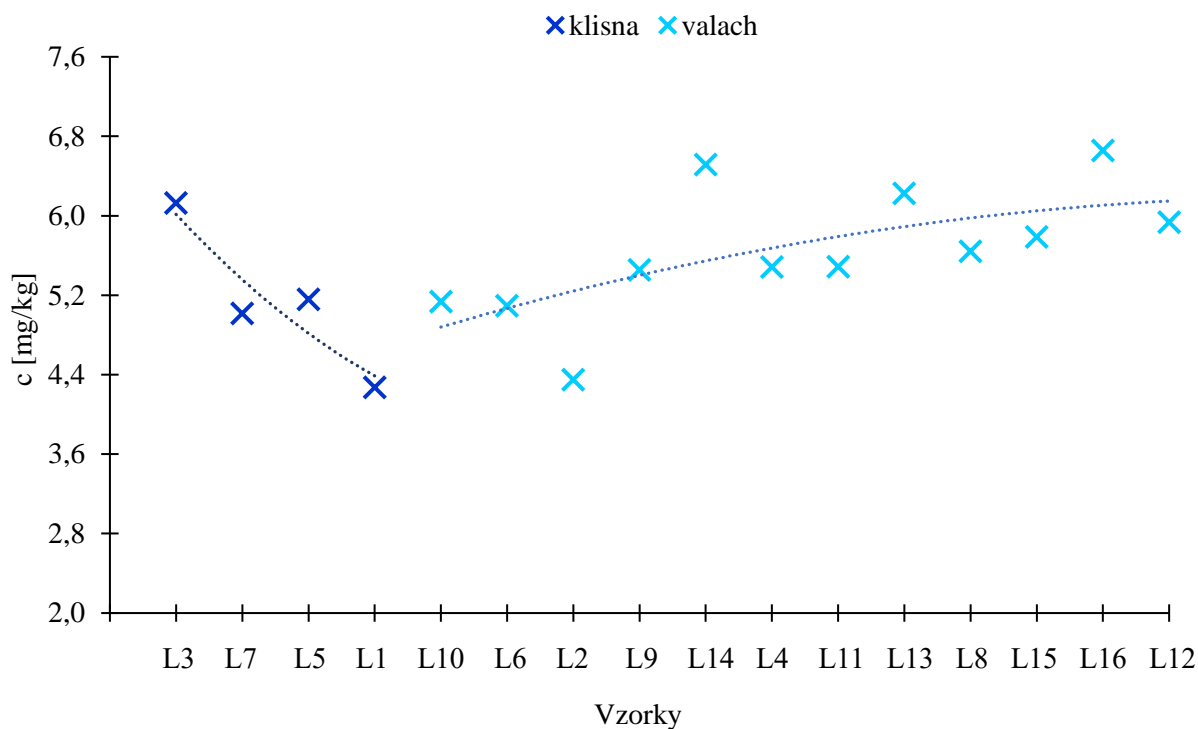
5.4.3 Chrom

Rozdíl v koncentracích chromu mezi odběrovými lokalitami byl v desetinách mg/kg. V lokalitě JK Osada lípa byla průměrná koncentrace chromu obsažená v koňské hřívě 1,121 mg/kg, přestože vzorek ovsa (K1) obsahoval přes 13 mg/kg chromu a všechna krmiva průměrně 7,574 mg/kg. V lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace chromu vyšší a to 1,930 mg/kg. Nejnižší průměrná koncentrace chromu, při rozdělení vzorků podle pohlaví koní, byla u hřebců 0,970 mg/kg, vyšší u klisen 1,338 mg/kg a nejvyšší u valachů 1,481 mg/kg (viz Obr. 22). Hodnoty průměrných koncentrací chromu při rozdělení vzorků podle zbarvení koní vzrůstaly (viz Obr. 23): hnědák (0,783 mg/kg) < bělouš (1,152 mg/kg) < vraník (1,491 mg/kg) < ryzák (1,891 mg/kg).

5.4.4 Měď

U koncentrací mědi byl mezi odběrovými lokalitami rozdíl v desetinách mg/kg. V lokalitě JK Osada lípa byla obsažena v koňské hřívě průměrná koncentrace 5,522 mg/kg mědi a v lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace vyšší a to 5,932 mg/kg zinku. Krmivo odebrané v místě JK Osada lípa obsahovalo průměrně 12,304 mg/kg, ve vzorku K2 bylo 23,867 mg/kg, a dokonce ve vzorku K3 bylo až 25,241 mg/kg mědi. Při rozdělení vzorků podle pohlaví koní byla zaznamenána nejvyšší průměrná koncentrace mědi u valachů 5,769 mg/kg, nižší průměrná koncentrace u hřebců 5,520 mg/kg a nejnižší u klisen 5,499 mg/kg mědi (viz Obr. 22). V rámci lokality JK Osada lípa byl u klisen zaznamenán klesající trend koncentrace v závislosti na věku

koní, a naopak u valachů rostoucí trend koncentrace v závislosti na věku koní (viz Obr. 20). Při porovnání průměrných koncentrací u jednotlivých zabarvení vzrůstaly hodnoty koncentrací mědi (viz Obr. 23) v řadě hnědák (5,097 mg/kg) < vraník (5,863 mg/kg) < bělouš (6,095 mg/kg) < ryzák (6,165 mg/kg). V rámci lokality U Chytrého poníka byl u vzorků koní zbarvení ryzáka zaznamenán klesající trend v závislosti koncentrace mědi na věku koní.



Obr. 20: Závislost koncentrace mědi na pohlaví a věku (JK Osada Lípa)

5.4.5 Olovo

Mezi odběrovými lokalitami byl rozdíl v koncentracích olova v setinách mg/kg. V lokalitě JK Osada lípa obsahovala koňská hříva v průměru 0,404 mg/kg olova a v lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace mírně vyšší a to 0,411 mg/kg. Krmivo odebrané v místě JK Osada lípa obsahovalo průměrně 0,857 mg/kg. V souvislosti s pohlavím byly zjištěny rozdíly v desetinách mg/kg, hříva hřebců obsahovala 0,276 mg/kg rtuti, hříva klisen 0,361 mg/kg a hříva valachů 0,448 mg/kg olova (viz Obr. 22). Při rozdělení vzorků podle zbarvení koní byl zaznamenán vzestupný trend průměrných koncentrací olova v pořadí (viz Obr. 23): hnědák (0,256 mg/kg) < bělouš (0,372 mg/kg) < vraník (0,401 mg/kg) < ryzák (0,479 mg/kg). V rámci lokality JK Osada lípa, byla zaznamenána u vzorků koní zbarvení bělouše rostoucí závislost koncentrace olova na věku koní. V rámci lokality U Chytrého poníka byla u vzorků koní zbarvení ryzáka zaznamenána klesající závislost koncentrace olova na věku koní.

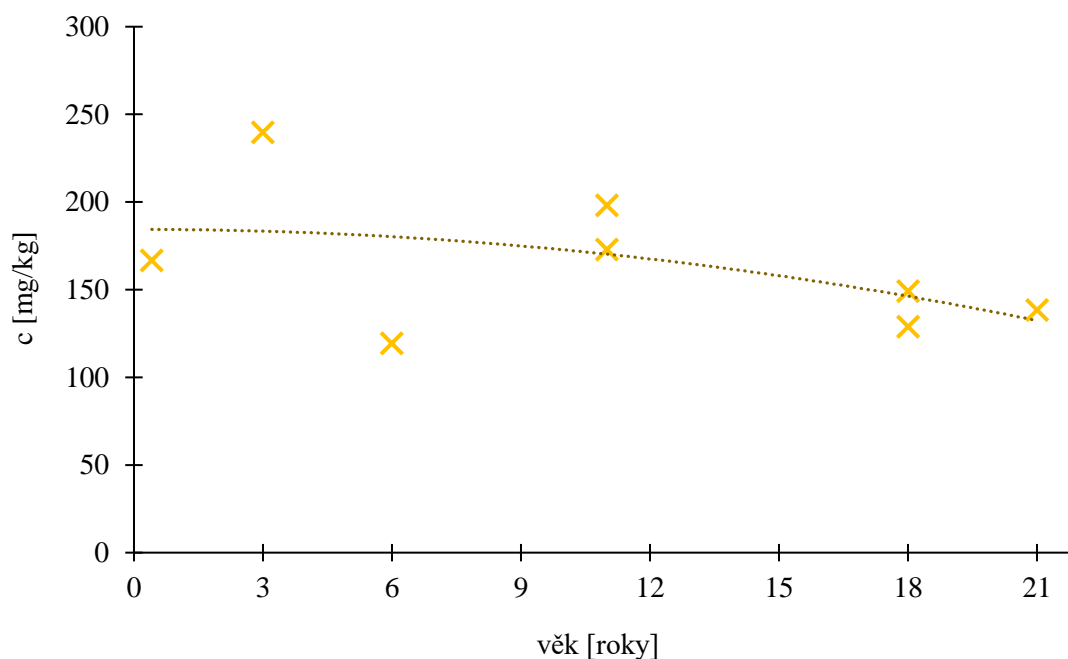
5.4.6 Nikl

Rozdíl v koncentracích niklu mezi odběrovými lokalitami byl markantní. V lokalitě JK Osada lípa byla průměrná koncentrace niklu obsažená v koňské hřívě 1,395 mg/kg a v lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace niklu nižší a to 0,969 mg/kg. Krmivo odebrané v místě JK Osada lípa obsahovalo průměrně 2,435 mg/kg, nejvíce niklu obsahoval vzorek ovsa K1 5,917 mg/kg. Jelikož se jedná o majoritní část krmné dávky koní, je možné, že metabolismus

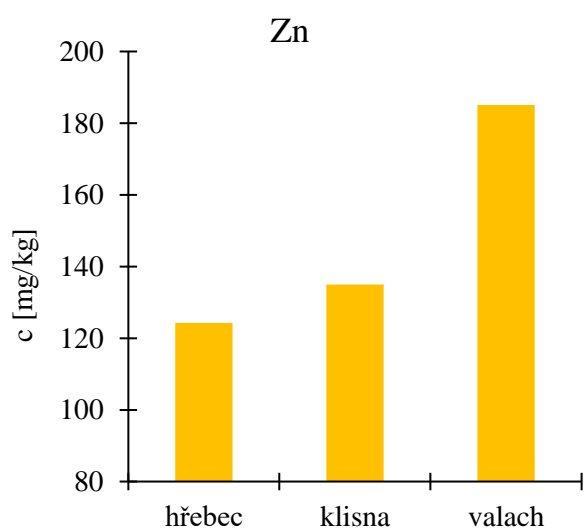
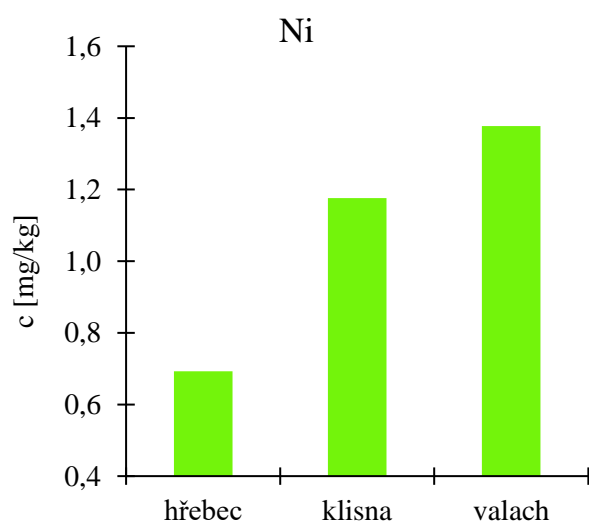
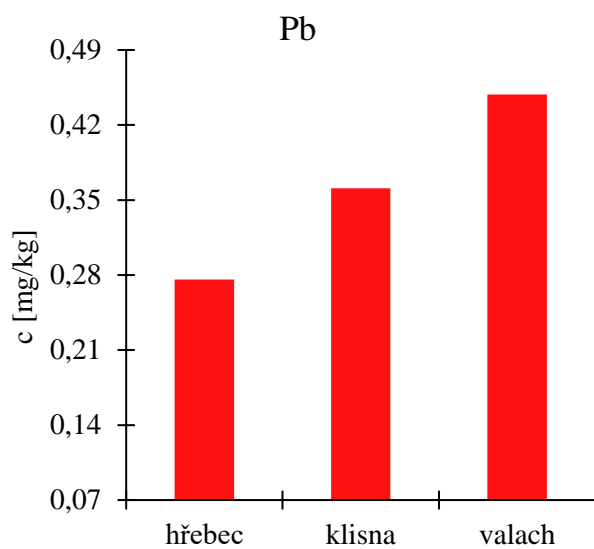
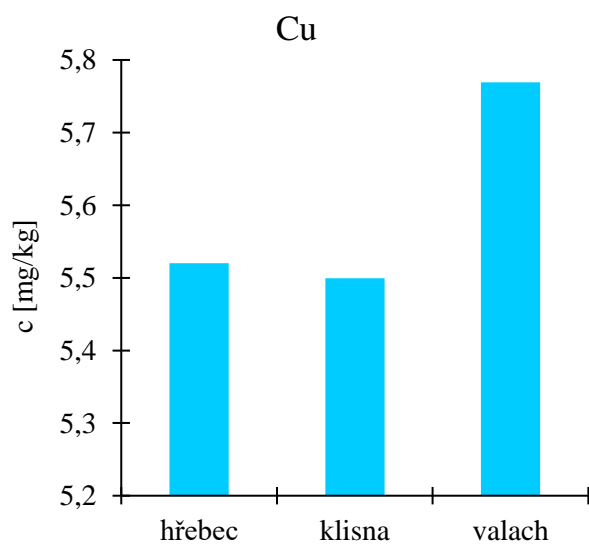
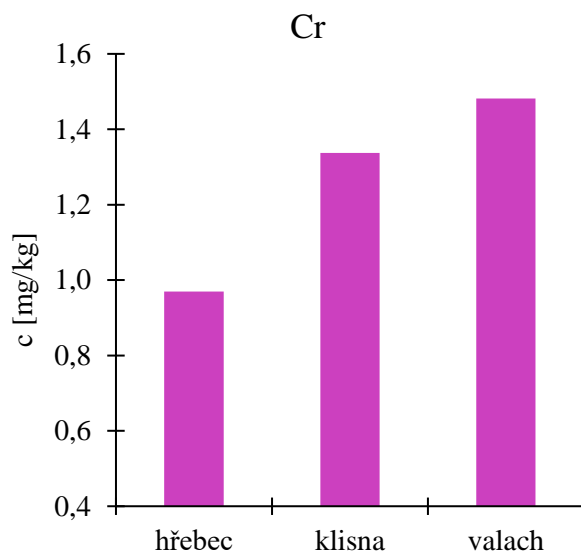
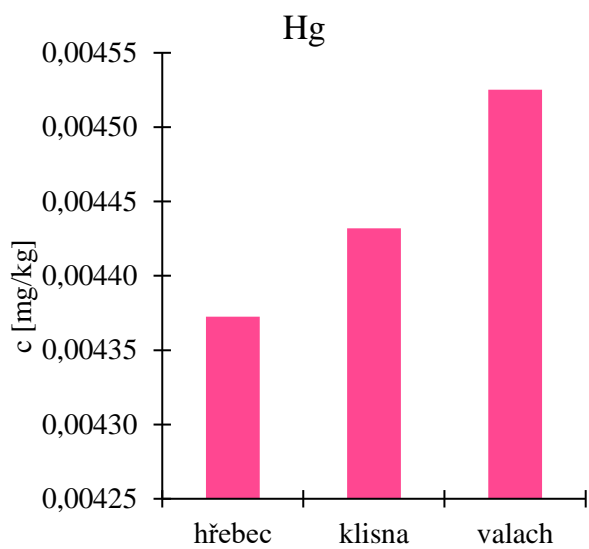
koní není schopen odbourávat a vylučovat větší množství niklu a následně tak dochází k akumulaci v tělech koní. Nejnižší průměrná koncentrace niklu při rozdělení vzorků podle pohlaví koní byla u hřebců 0,693 mg/kg, vyšší u klisen 1,176 mg/kg a nejvyšší u valachů 1,377 mg/kg (viz Obr. 22). Hodnoty průměrných koncentrací niklu při rozdělení vzorků podle zbarvení koní vzrůstaly (viz Obr. 23): ryzák (1,041 mg/kg) < vraník (1,278 mg/kg) < hnědák (1,317 mg/kg) < bělouš (1,497 mg/kg).

5.4.7 Zinek

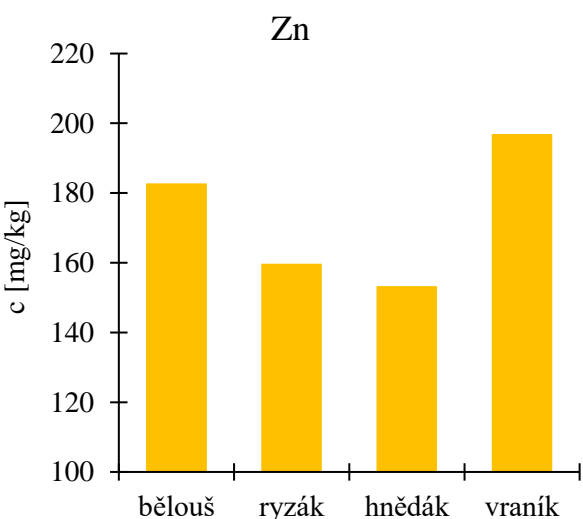
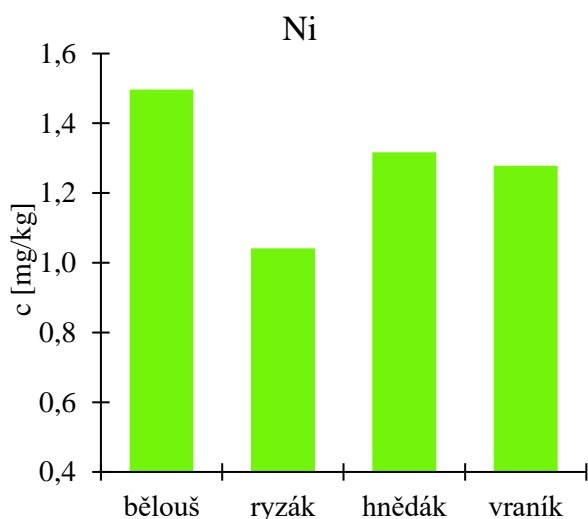
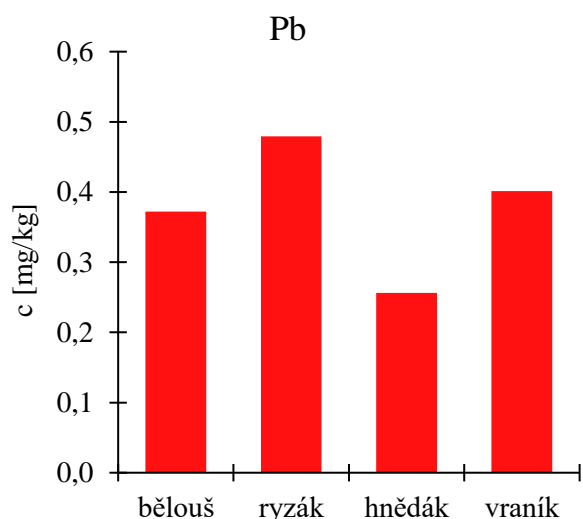
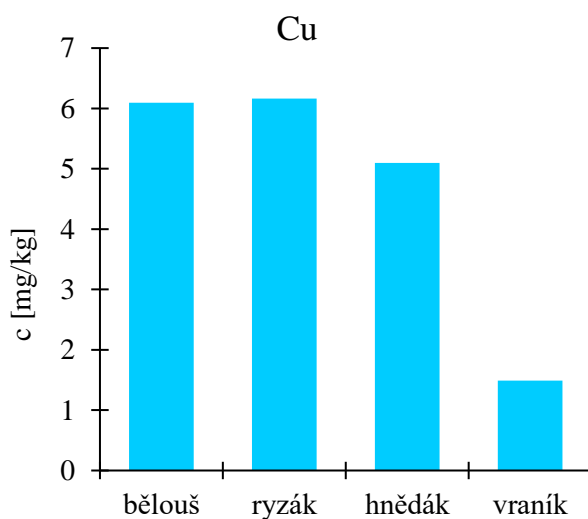
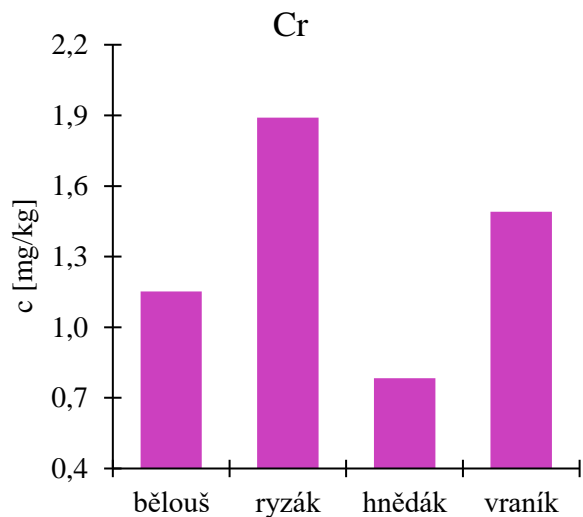
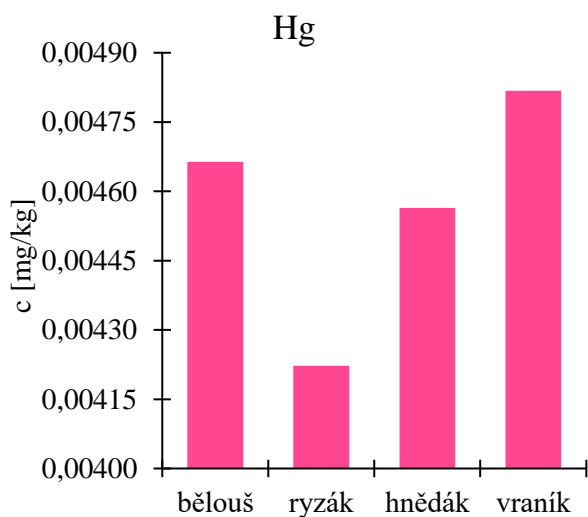
U koncentrací zinku byl mezi odběrovými lokalitami rozdíl v jednotkách mg/kg. V lokalitě JK Osada lípa byla průměrná koncentrace zinku obsažená v koňské hřívě 162,9 mg/kg a v lokalitě U Chytrého poníka byla průměrná koncentrace vyšší a to 164,2 mg/kg zinku. Krmivo odebrané v místě JK Osada lípa obsahovalo zinek ve čtyřech z pěti analyzovaných vzorků, průměrně 128,1 mg/kg. U vzorků z lokality U Chytrého poníka byl zaznamenán klesající trend v závislosti koncentrace zinku na věku koní (viz Obr. 21). U jednotlivých kategorií vzorků rozdělených podle pohlaví koní byla zaznamenána vyšší průměrná koncentrace zinku u valachů, tedy 185,1 mg/kg, oproti tomu průměrná koncentrace u klisen 135,0 mg/kg a u hřebců byla 124,2 mg/kg zinku (viz Obr. 22). Při porovnání průměrných koncentrací u jednotlivých zbarvení vzrůstaly hodnoty koncentrací (viz Obr. 23): hnědák (153,3 mg/kg) < ryzák (159,7 mg/kg) < bělouš (182,8 mg/kg) < vraník (196,9 mg/kg).



Obr. 21: Závislost koncentrace zinku ve vzorcích hřívý na věku koní (U Chytrého poníka)



Obr. 22: Závislost průměrných koncentrací prvků v hřívě na pohlaví koní



Obr. 23: Závislost průměrných koncentrací prvků v hřívě na zbarvení koní

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením rizikových prvků (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni, Zn) v matrici koňské hřívky. Pro srovnání byly odebrány vzorky koňské hřívky ze dvou lokalit JK Osada Lípa a U Chytrého poníka. Pro stanovení rtuti v pevných vzorcích byl použit jednoúčelový atomový absorpční spektrofotometr. Naměřené hodnoty Hg v koňské hřívě se pohybovaly v rozmezí 0,0032–0,0077 mg/kg. Před analýzou zbylých rizikových prvků byly vzorky předem upraveny pomocí mikrovlnného rozkladu. Pro stanovení pomocí atomové absorpční spektrometrie byly použité optimalizované metody ET-AAS, pro stanovení kadmia, chromu, mědi, olova a niklu, a F-AAS, pro stanovení zinku. Koncentrace kadmia byly ve všech vzorcích koňské hřívky pod limitem detekce. Koncentrace Cr se pohybovaly v rozmezí 0,312–3,527 mg/kg, Cu 4,274–7,336 mg/kg, Pb v rozmezí 0,143–1,403 mg/kg, Ni v rozmezí 0,611–2,401 mg/kg, koncentrace Zn v rozmezí 37,0–253,2 mg/kg. Průměrná koncentrace rizikových prvků ve vzorcích koňské hřívě roste v řadě Cd < Hg < Pb < Ni < Cr < Cu < Zn.

Pro možné účely porovnání byly analyzovány také některé druhy krmiva z první lokality. Ve vzorcích krmiva byly naměřeny koncentrace Hg v rozmezí od 0,001 do 0,015 mg/kg. Kadmium bylo stanoveno ve třech vzorcích v rozmezí od 0,052 mg/kg do 0,194 mg/kg. Ostatní rizikové prvky byly naměřeny u všech vzorků krmiva, Cr v rozmezí 3,511–13,195 mg/kg, Cu 1,670–25,241 mg/kg, Pb v rozmezí 0,171–2,709 mg/kg a Ni 1,106–5,917 mg/kg. Koncentrace Zn v krmivu se pohybovaly v rozmezí od 8,6 mg/kg do 242,2 mg/kg. Průměrná koncentrace rizikových prvků ve vzorcích krmiva roste v řadě Hg < Cd < Pb < Ni < Cr < Cu < Zn. Pouze u niklu byla prokázána závislost obsahu kovu v koňské hřívě na obsahu kovu v krmivu.

Mezi naměřenými koncentracemi byly hledány rozdíly mezi lokalitami. Ve vzorcích koňské hřívky z lokality U Chytrého poníka byly stanoveny vyšší koncentrace Hg, Cr, Cu, Pb a Zn, pouze u Ni byly naměřeny vyšší koncentrace ve vzorcích z lokality JK Osada Lípa. Závislost koncentrace rizikových prvků v hřívě na věku koně byla nalezena při stanovení rtuti a zinku u vzorků z lokality U Chytrého poníka. U rtuti se jednalo o rostoucí závislost, hřívky starších koní obsahovaly vyšší koncentrace z důvodu akumulace kovu. U zinku byla nalezena klesající závislost, nejvyšší koncentrace obsahovaly hřívky mladších koní. Při rozdělení vzorků hřívky podle pohlaví koní nejčastěji průměrné koncentrace rostly v řadě hřebec < klisna < valach. Při rozdělení vzorků hřívky podle zbarvení koní nebyla prokázána žádná závislost koncentrace rizikového prvku na obsahu pigmentu melaninu ve vlasu. Pouze u chromu a olova byl zaznamenán stejný vzestupný trend průměrných koncentrací v řadě hnědák < bělouš < vraník < ryzák.

V této bakalářské práci nebylo jednoznačně prokázáno využití matrice koňské hřívky jako vhodného bioindikátoru pro posouzení kontaminace životního prostředí rizikovými prvky. Spíše než životní prostředí, má zásadní vliv na množství rizikových prvků v těle koní krmivo, které pravidelně dostávají. Průměrné koncentrace pěti kovů ze sedmi analyzovaných rizikových prvků byly vyšší ve vzorcích koní z lokality U Chytrého poníka ve Střelicích, která je blíže velké městské aglomeraci, ale nejednalo se o nijak významné rozdíly. Prokázán byl fakt, že kutikula vlasu správně chrání vlasový stvol před vnějšími vlivy. Pravděpodobněji než posuzování kontaminace životního prostředí, by bylo vhodnější využití matrice koňské hřívky pro posouzení celkového zdravotního stavu koní.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Z. Kafka a J. Punčochářová, „Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita“, *Chemické listy*, Praha, s. 611–617, 2002.
- [2] D. Pavlíková, M. Pavlík, L. Matějů, a J. Balík, *Ekotoxikologie*. ČZU Praha, 2009.
- [3] „Arnika“. Viděno: 6. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://arnika.org/toxicke-latky>
- [4] J. Sucharova *et al.*, „Linking chemical elements in forest floor humus (Oh-horizon) in the Czech Republic to contamination sources“, *Environmental Pollution*, roč. 159, č. 5, s. 1205–1214, kvě. 2011, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2011.01.041.
- [5] Zákon pro lidi, „17/1992 Sb. Zákon o životním prostředí“. Viděno: 2. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-17#>
- [6] Česká Geologická služba, „Mapové on-line“, [geology.cz](http://www.geology.cz). Viděno: 6. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <http://www.geology.cz/extranet/mapy/mapy-online/mapove-aplikace#>
- [7] J. Jirásek, M. Sivek, a P. Láznička, „Ložiska nerostů ČR“, [geologie.vsb.cz](http://www.geologie.vsb.cz). Viděno: 6. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <http://www.geologie.vsb.cz/loziska/loziska/index.html>
- [8] CENIA, „Statistická ročenka životního prostředí ČR 2021“. Viděno: 6. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.cenia.cz/publikace/statisticka-rocenka-zivotniho-prostredi-cr/statisticka-rocenka-zivotniho-prostredi-cr-2021/>
- [9] Česká informační agentura životního prostředí, „Zpráva o životním prostředí České republiky 2021“, 2022. Viděno: 11. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.cenia.cz/publikace/zpravy-o-zp/>
- [10] Zákon pro lidi, „Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.“ Viděno: 17. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-401>
- [11] Zákon pro lidi, „201/2012 Sb. Zákon o ochraně ovzduší“. Viděno: 31. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-201?text=201%2F2012+Sb>
- [12] „ČHMÚ - Tabelární přehled, znečištění ovzduší a chemické složení srážek v ČR - 2022“. Viděno: 31. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/2022_enh/index_CZ.html
- [13] Ministerstvo životního prostředí, „Kvalita ovzduší - Zpráva z roku 2021“. Viděno: 31. říjen 2023. [Online]. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/kvalita_ovzdusi
- [14] World Health Organization, *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva: WHO, 1996. Viděno: 13. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9241561734>
- [15] INCHEM, „Zinc (Environmental Health Criteria 221)“. Viděno: 9. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc221.htm>

- [16] P. Pitter, H. Kujalová, a V. Sýkora, *Hydrochemie*, 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2016.
- [17] INCHEM, „Cadmium (Environmental Health Criteria 134)". Viděno: 12. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc134.htm>
- [18] INCHEM, „Chromium (Environmental Health Criterie 61)". Viděno: 12. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc61.htm>
- [19] INCHEM, „Copper (Environmental Health Criteria 200)". Viděno: 27. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm#PartNumber:4>
- [20] Přírodovědecká fakulta UK v Praze, „Periodická video tabulka prvků". Viděno: 12. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.chemickeprvky.cz/prvek/hg/>
- [21] INCHEM, „Mercury (Environmental Health Criteria 1)". Viděno: 12. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc086.htm>
- [22] INCHEM, „Nickel (Environmental Health Criteria 108)". Viděno: 13. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc108.htm#PartNumber:1>
- [23] INCHEM, „Lead (Environmental Health Criteria 3)". Viděno: 12. březen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc003.htm>
- [24] Moje hnojiva, „CORN STARTER", Agrofert, a.s. Viděno: 14. listopad 2023. [Online]. Dostupné z: <https://www.mojehnojiva.cz/corn-starterr>
- [25] R. S. Macdonald, „Zinc and Health: Current Status and Future Directions The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation 1,2", 2000.
- [26] M. Shim, J. Yi, J. H. Pak, a J. W. Chung, „Zinc deficiency triggers hearing loss by reducing ribbon synapses of inner hair cells in CBA/N mice", *Biochem Biophys Res Commun*, roč. 693, led. 2024, doi: 10.1016/j.bbrc.2023.149396.
- [27] I. Wessels, M. Maywald, a L. Rink, „Zinc as a gatekeeper of immune function", *Nutrients*, roč. 9, č. 12. MDPI AG, 1. prosinec 2017. doi: 10.3390/nu9121286.
- [28] A. Aherrera *et al.*, „The association of e-cigarette use with exposure to nickel and chromium: A preliminary study of non-invasive biomarkers", *Environ Res*, roč. 159, s. 313–320, lis. 2017, doi: 10.1016/J.ENVRES.2017.08.014.
- [29] *Heavy Metals Release in Soils*. Boca Raton: Boca Raton : Lewis Publishers, 2001.
- [30] V. V. Kalashnikov *et al.*, „Assessment of regional differences of chemical concentration in mane hair of the Thoroughbred", in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Institute of Physics Publishing, lis. 2019. doi: 10.1088/1755-1315/341/1/012075.
- [31] V. V. Kalashnikov *et al.*, „Reference intervals of essential and toxic elements concentrations in mane hair and blood serum of Arabian purebred horses", in *IOP*

Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing Ltd, bře. 2021. doi: 10.1088/1755-1315/677/5/052084.

- [32] V. V. Kalashnikov *et al.*, „Assessment of Gender Effects and Reference Values of Mane Hair Trace Element Content in English Thoroughbred Horses (North Caucasus, Russia) Using ICP-DRC-MS", *Biol Trace Elem Res*, roč. 191, č. 2, s. 382–388, říj. 2019, doi: 10.1007/S12011-019-1634-9.
- [33] V. Kalashnikov, A. Zaitsev, M. Atroschenko, S. Miroshnikov, A. Frolov, a O. Zavyalov, „The total content of toxic elements in horsehair given the level of essential elements", *Environmental Science and Pollution Research*, roč. 26, č. 24, s. 24620–24629, srp. 2019, doi: 10.1007/s11356-019-05630-z.
- [34] V. Kalashnikov *et al.*, „The content of essential and toxic elements in the hair of the mane of the trotter horses depending on their speed", *Environmental Science and Pollution Research*, roč. 25, č. 22, s. 21961–21967, srp. 2018, doi: 10.1007/s11356-018-2334-2.
- [35] M. Brummer-Holder, B. D. Cassill, a S. H. Hayes, „Interrelationships Between Age and Trace Element Concentration in Horse Mane Hair and Whole Blood", *J Equine Vet Sci*, roč. 87, dub. 2020, doi: 10.1016/J.JEVS.2020.102922.
- [36] R. Asano, K. Suzuki, T. Otsuka, M. Otsuka, a H. Sakurai, „Concentrations of toxic metals and essential minerals in the mane hair of healthy racing horses and their relation to age", *Journal of Veterinary Medical Science*, roč. 64, č. 7, s. 607–610, čvc. 2002, doi: 10.1292/JVMS.64.607.
- [37] K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, R. Asano, a T. Sakai, „Twenty-eight element concentrations in mane hair samples of adult riding horses determined by particle-induced X-ray emission.", *Biol Trace Elem Res*, roč. 107, č. 2, s. 135–140, 2005, doi: 10.1385/BTER:107:2:135.
- [38] K. Asano *et al.*, „Influence of the Coat Color on the Trace Elemental Status Measured by Particle-Induced X-ray Emission in Horse Hair", 2005.
- [39] D. van der Merwe, L. van den Wollenberg, J. van Hees-Valkenburg, T. de Haan, S. van der Drift, a V. Vandendriessche, „Evaluation of hair analysis for determination of trace mineral status and exposure to toxic heavy metals in horses in the Netherlands", *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, roč. 34, č. 6, s. 1000–1005, lis. 2022, doi: 10.1177/10406387221116069.
- [40] L. Wahl a I. Vervuert, „Commercial Hair Analysis in Horses: A Tool to Assess Mineral Intake?", *J Equine Vet Sci*, roč. 119, s. 104145, pro. 2022, doi: 10.1016/J.JEVS.2022.104145.
- [41] M. Dunnett a P. Lees, „Trace element, toxin and drug elimination in hair with particular reference to the horse", *Research in Veterinary Science*, roč. 75, č. 2. Elsevier, s. 89–101, 2003. doi: 10.1016/S0034-5288(03)00074-2.

- [42] A. Ghorbani, A. Mohit, a H. Darmani Kuhi, „Effects of Dietary Mineral Intake on Hair and Serum Mineral Contents of Horses", *J Equine Vet Sci*, roč. 35, č. 4, s. 295–300, dub. 2015, doi: 10.1016/J.JEVS.2015.01.018.
- [43] G. Bravo Mendiburt, V. Agostini, a G. Cañete Betancourt, „Morphological differentiation of bovine and equine hair for species' identification in forensic veterinary investigations", *Forensic Sci Int*, roč. 328, lis. 2021, doi: 10.1016/j.forsciint.2021.111037.
- [44] B. Bilin'ska, „On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu 2 + ions", *Spectrochimica Acta Part A*, roč. 57, s. 2525–2533, 2001, [Online]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/saa
- [45] K. M. Lakhanova, B. Kedelbaev, N. Yeleugaliyeva, a K. Korazbekova, „Study of melanin distribution in the hair cells of Karakul lambs of different colours", *Small Ruminant Research*, roč. 211, čer. 2022, doi: 10.1016/j.smallrumres.2022.106693.
- [46] E. Kalayci, O. Avinc, A. Yavaş, K. Ece, A. Ozan, a Y. Arzu, „Usage of Horse Hair as A Textile Fiber and Evaluation of Color Properties". [Online]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/357174320>
- [47] S. R. Crouch, F. J. Holler, D. M. West, a D. A. Skoog, *Analytická chemie*, 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2019.
- [48] J. Komárek, *Atomová absorpční spektrometrie*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědná fakulta, 2000.
- [49] J. Komínková, „Atomová absorpční spektrometrie-stanovení rtuti pomocí analyzátoru AMA 254 pracovní text pro Podzemní výukové středisko JOSEF", 2010. Viděno: 13. duben 2024. [Online]. Dostupné z: https://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_AMA_2010.pdf
- [50] D. Macdougall *et al.*, „Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT Technical Vice President Chemical Manufacturers Association", 1980. [Online]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [51] G. Long a J. D. Winefordner, „Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition", zář. 2008. doi: 10.1021/ac00258a001.
- [52] „Cushingův syndrom u koní", *Horsevets*. Viděno: 9. květen 2024. [Online]. Dostupné z: <http://horsevets.cz/clanky/cushinguv-syndrom-u-koni-3/>
- [53] „Mapy.cz". Viděno: 14. květen 2024. [Online]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=16.6813800&y=49.2045100&z=11>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AMA	Advanced Mercury Analyser
CLP	klasifikace, označování a balení látek a směsí
ČR	Česká republika
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-DRC-MS	hmotnostní spektro. s indukčně vázaný plazmatem a dynamickou reakční celou
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MW	mikrovlnný rozklad (microwave decomposition)
NEK-NPK	nejvyšší přípustná koncentrace
NEK-RP	průměrné hodnoty koncentrace
PCB	polychlorované bifenyly
PE-LD	polyethylen s nízkou hustotou
PIXE	rentgenové emise indukované částicemi
PM ₁₀	částice menší než 10 µm
REACH	nařízení Evropské unie, registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
USEPA	americké agentury pro ochranu životního prostředí
WHO	Světové zdravotnické organizace
ŽP	životní prostředí

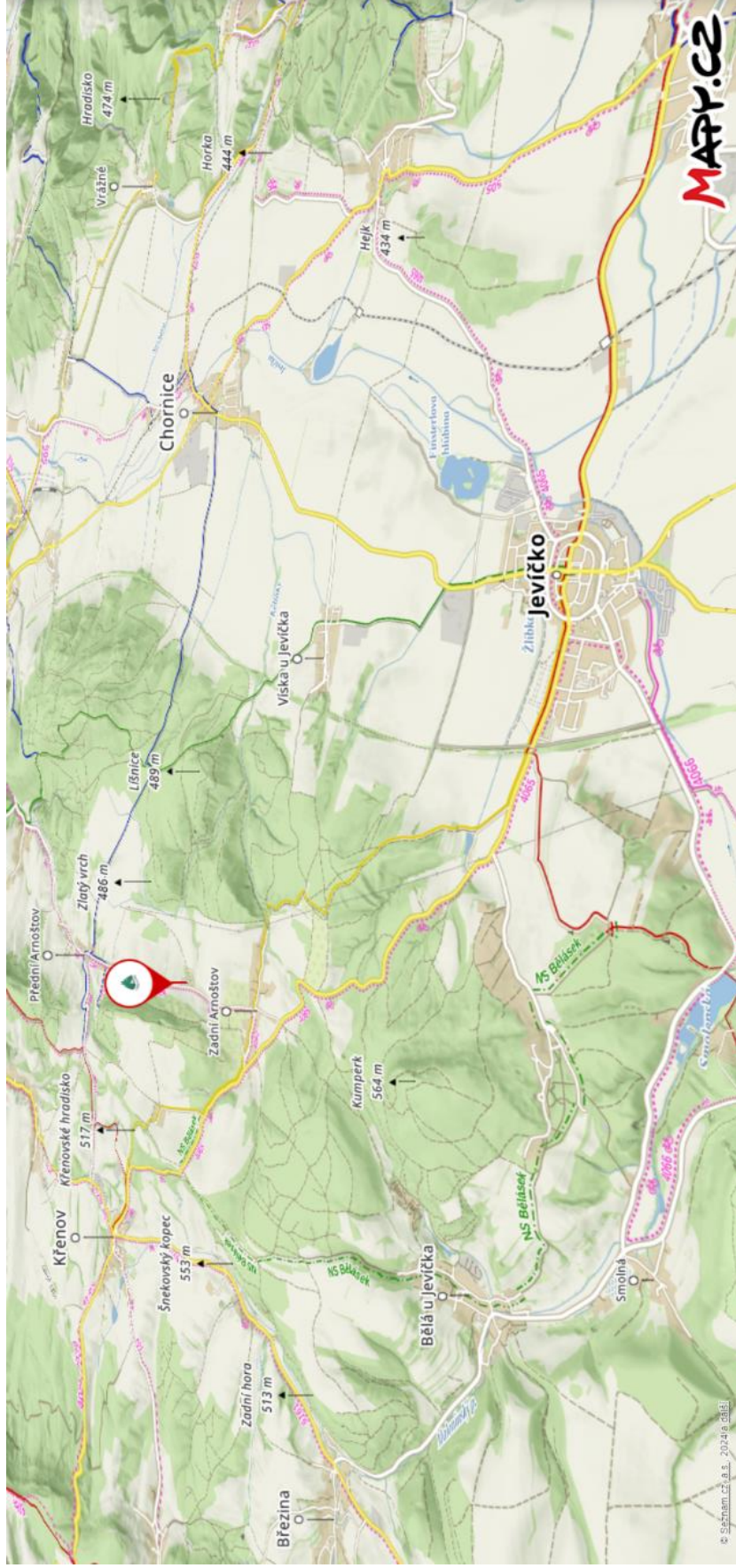
9 PŘÍLOHY

Seznam příloh

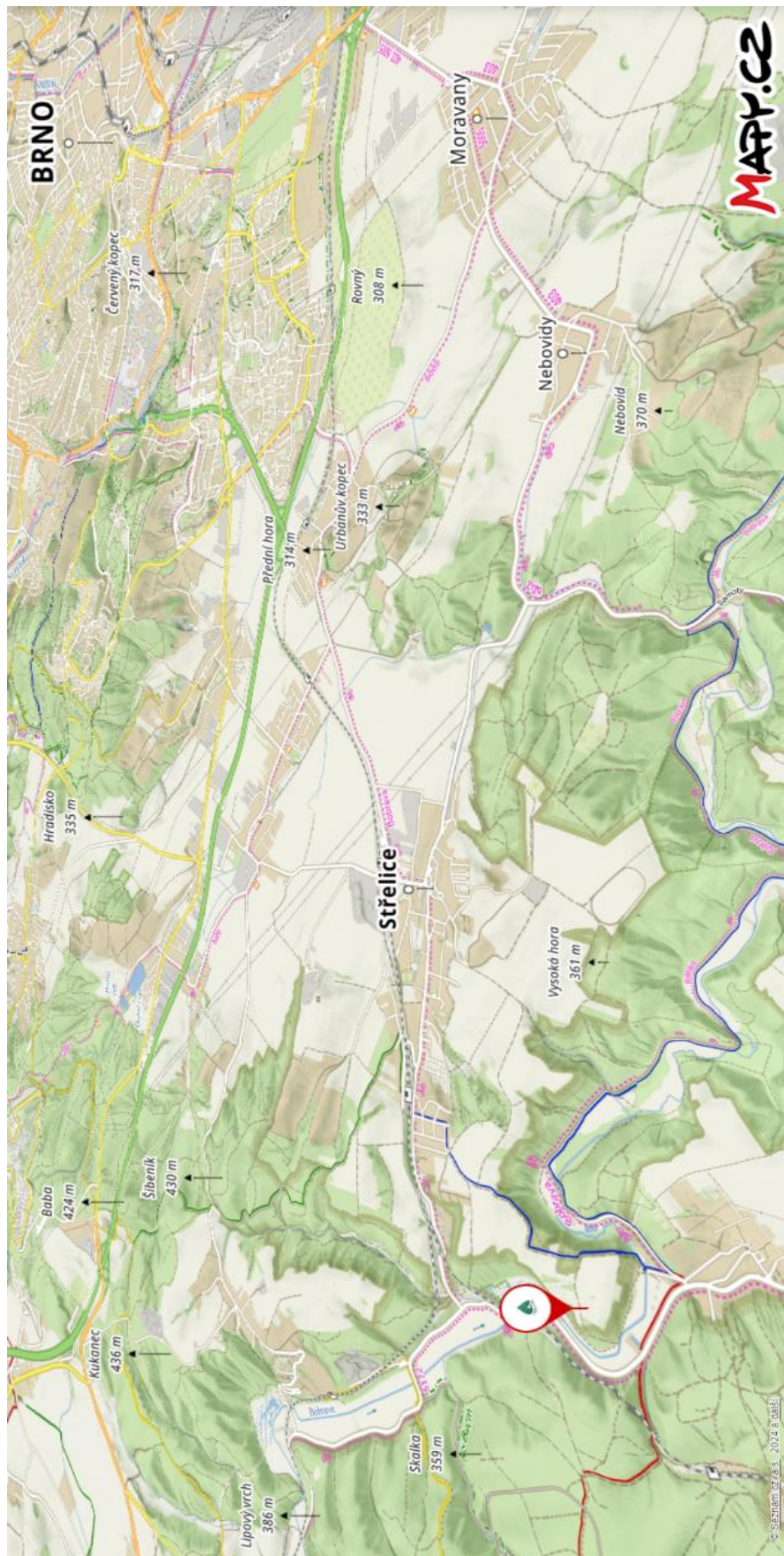
Příloha 1: Oblast lokality odběru vzorků JK Osada Lípa

Příloha 2: Oblast lokality odběru vzorků U Chytrého poníka

Příloha 3: Naměřené koncentrace rizikových prvků ve vzorcích koňské hřívy a vzorcích krmiva



Příloha 1: Oblast lokality odběru vzorků JK Osada Lipa [53]



Příloha 2: Oblast lokality odběru vzorků U Chytrého poníka [53]

Příloha 3: Naměřené koncentrace rizikových prvků ve vzorcích koňské hřívý a vzorcích krmiva

vzorek	prvek m [g]	Hg		Cd		Cr		Cu		Pb		Ni		Zn	
		c [mg/kg]	SD [mg/kg]	c [mg/kg]	SD [mg/kg]	c [mg/kg]	SD [mg/kg]	c [mg/kg]	SD [mg/kg]	c [mg/kg]	SD [mg/kg]	c [mg/kg]	SD [mg/kg]	c [mg/kg]	SD [mg/kg]
L1	0,1007	0,0035	0,0003	<LOD	-	0,312	0,010	4,274	0,128	<LOD	-	1,223	0,036	37,0	2,3
L2	0,2220	0,0043	0,0003	<LOD	-	0,540	0,023	4,351	0,085	0,204	0,004	2,401	0,046	121,7	2,9
L3	0,2080	0,0059	0,0007	<LOD	-	1,302	0,005	6,128	0,165	0,560	0,009	1,680	0,012	121,1	1,2
L4	0,2351	0,0038	0,0000	<LOD	-	1,051	0,014	5,484	0,063	0,396	0,011	1,830	0,013	130,0	2,3
L5	0,2388	0,0034	0,0003	<LOD	-	0,614	0,013	5,158	0,191	0,143	0,001	1,439	0,033	147,3	1,3
L6	0,2434	0,0032	0,0002	<LOD	-	1,047	0,028	5,094	0,219	0,360	0,010	0,757	0,007	110,0	6,2
L7	0,2080	0,0048	0,0005	<LOD	-	0,492	0,003	5,016	0,145	0,160	0,008	1,059	0,023	147,3	4,4
L8	0,2271	0,0047	0,0008	<LOD	-	1,394	0,007	5,643	0,075	0,328	0,014	2,073	0,006	174,2	3,7
L9	0,2070	0,0048	0,0006	<LOD	-	1,377	0,018	5,455	0,185	0,514	0,015	1,956	0,022	217,1	5,2
L10	0,2386	0,0039	0,0004	<LOD	-	0,706	0,015	5,136	0,056	0,202	0,008	0,795	0,021	209,9	9,2
L11	0,2021	0,0072	0,0009	<LOD	-	1,192	0,010	5,487	0,121	0,430	0,010	0,919	0,008	197,5	1,2
L12	0,2422	0,0037	0,0002	<LOD	-	1,652	0,008	5,937	0,148	0,663	0,027	1,444	0,004	155,7	9,0
L13	0,2408	0,0034	0,0002	<LOD	-	0,871	0,016	6,225	0,143	0,210	0,005	1,282	0,017	220,6	6,4
L14	0,2351	0,0034	0,0004	<LOD	-	0,761	0,006	6,516	0,124	0,229	0,008	0,738	0,011	253,2	3,3
L15	0,2257	0,0038	0,0001	<LOD	-	3,527	0,016	5,787	0,122	1,403	0,025	1,924	0,031	201,0	4,0
L16	0,2341	0,0038	0,0001	<LOD	-	1,103	0,019	6,656	0,260	0,262	0,007	0,800	0,022	162,1	7,3
S1	0,2332	0,0032	0,0002	<LOD	-	2,653	0,029	7,336	0,015	0,694	0,003	1,171	0,012	166,7	8,5
S2	0,2382	0,0079	0,0007	<LOD	-	2,669	0,075	6,679	0,287	0,521	0,003	1,116	0,032	239,7	6,0
S3	0,2368	0,0055	0,0002	<LOD	-	2,852	0,066	6,317	0,107	0,555	0,013	1,247	0,019	198,1	3,2
S4	0,2151	0,0041	0,0004	<LOD	-	1,049	0,020	5,992	0,078	0,295	0,003	0,611	0,018	128,9	5,5
S5	0,2291	0,0046	0,0011	<LOD	-	0,891	0,012	5,048	0,162	0,257	0,012	0,775	0,008	119,5	3,7
S6	0,2190	0,0053	0,0012	<LOD	-	1,086	0,020	5,368	0,183	0,226	0,007	0,640	0,006	172,9	5,0
S7	0,2371	0,0048	0,0001	<LOD	-	2,995	0,042	5,473	0,148	0,553	0,012	1,462	0,015	138,5	7,8
S8	0,2333	0,0046	0,0001	<LOD	-	1,248	0,035	5,242	0,210	0,190	0,003	0,732	0,004	149,1	7,1
K1	0,4999	0,0022	0,0001	0,052	0,001	13,195	0,120	5,016	0,401	0,453	0,005	5,917	0,111	41,3	1,3
K2	0,4894	0,0150	0,0010	0,194	0,009	7,923	0,003	23,867	0,931	0,171	0,008	1,857	0,052	242,2	4,9
K3	0,4936	0,0047	0,0003	0,100	0,003	5,960	0,021	25,241	0,959	0,777	0,015	1,384	0,043	220,3	3,2
K4	0,4981	0,0023	0,0002	<LOD	-	7,283	0,071	5,726	0,298	2,709	0,054	1,911	0,021	8,6	0,4
K5	0,4959	0,0010	0,0001	<LOD	-	3,511	0,050	1,670	0,005	0,174	0,004	1,106	0,024	<LOD	-