

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

**Vypovídací schopnost multielementární analýzy
lidských vlasů a zvířecích srstí**

Bc. Tereza Lexová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Lexová**
Osobní číslo: **C15618**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Vypovídací schopnost multielementární analýzy lidských vlasů a zvířecích srstí**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujete literární rešerši zaměřenou na současný stav prvkové analýzy vlasů a srstí, metodických postupů i konkrétní použité analytické techniky s důrazem na přípravu vzorků k analýze. Kriticky posuďte zejména postupy odstranění povrchových nečistot a možnou destrukci vnitřní struktury vlasu vedoucí ke ztrátám cílových analytů.
2. Navrhněte vhodný postup povrchového čištění a následné mineralizace srstí. Optimalizujte podmínky ICP OES a o-TOF ICP MS analýzy s ohledem na koncentrační rozmezí sledovaných prvků a možné vlivy matrice. Ověřte možnosti použití vnitřních standardů při analýze výše uvedených materiálů. Proveďte validaci metod. Metody využijte pro analýzu vzorků koňských srstí.
3. Navrhněte laboratorní pokus, na základě kterého by bylo možné vyhodnotit dopad externí kontaminace a účinnost pracích postupů.
4. Kriticky zhodnoťte dosažené výsledky.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce: **Ing. Lenka Bendakovská**

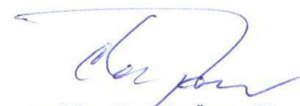
Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 12. května 2017

Bc. Tereza Lexová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce doc. Ing. Anně Krejčové, Ph.D. za odborné rady, materiály, věnovaný čas, veškerou pomoc a trpělivost při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji mé konzultantce Ing. Lence Bendakovské za odborné vedení mé práce v laboratoři. Velké poděkování patří také mé rodině a partnerovi za podporu a pomoc během mého vysokoškolského studia.

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřena na prvkovou analýzu lidských vlasů a koňských žíní. Byl navržen a upraven postup přípravy vzorků koňských žíní pro stanovení 18 prvků pomocí optické spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu a hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a průletovým analyzátozem s ortogonálním urychlováním iontů. Byl proveden kontaminační pokus vzorků s půdou, sedimentem, popílkem a roztokem simulovaného potu s přídavkem prvků.

KLÍČOVÁ SLOVA

ICP-MS, ICP-OES, koňské žíně, prací postupy, prvková analýza, vlasy, zvířecí srst

TITLE

The explanatory power of multi-analyte analysis of human hair and animal fur

ANNOTATION

The thesis is focused on elemental analysis of human hair and horse hair. The process of preparation of horse hair samples for the determination of 18 elements by an inductively coupled plasma optical emission spectrometry and time-of-flight inductively coupled plasma mass spectrometry has been proposed and modified. The contamination experiment of samples with soil, sediment, fly ash and simulated sweat solution with addition of elements was performed.

KEYWORDS

ICP-MS, ICP-OES, horse hair, washing procedures, elemental analysis, hair, animal fur

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1 Lidský vlas	13
1.1.1 Stavba a růstový cyklus vlasu.....	14
1.1.2 Chemické složení vlasu	16
1.2 Zvířecí srst	18
1.3 Prvkové složení vlasů	23
1.3.1 Odběr vzorku a skladování	24
1.3.2 Příprava vzorku k analýze.....	25
1.3.2.1 Metody praní.....	25
1.3.2.2 Metody rozkladu vzorku před analýzou	32
1.3.3 Prvková analýza	33
1.3.4 Referenční hodnoty.....	34
1.3.5 Vypovídací schopnost komerčně nabízených analýz	37
1.3.6 Faktory ovlivňující prvkové složení vlasů a srstí	40
1.4 Spojitost s onemocněním	42
1.4.1 Rakovina	43
1.4.2. Diabetes mellitus.....	44
1.4.3 Krevní tlak	45
1.4.4 Infarkt myokardu	45
1.4.5 Onemocnění ledvin	46
1.4.6 Osteoartritida	47
1.4.7 Autismus	47

1.5 Kontaminační pokusy	48
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	52
2.1 Použitá přístrojová a laboratorní technika	52
2.1.1 Laboratorní pomůcky a nádobí	52
2.2 Použité chemikálie	53
2.3 Příprava kalibračních roztoků	53
2.4 Příprava vzorků a CRM k analýze	55
2.4.1 Praní vzorků	55
2.4.2 Mikrovlnný rozklad vzorků	56
2.5 Kontaminující látky použité v experimentu.....	56
2.6 ICP-OES analýza	58
2.7 ICP-MS analýza	60
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	61
3.1 Optimalizace praní a rozkladu vzorků	61
3.2 Ověření spolehlivosti analytických metod.....	62
3.3 Hodnocení pracích metod	64
3.3.1 Hodnocení povrchu žíní.....	64
3.3.2 Hodnocení pracích metod podle výsledků prvkové analýzy	68
3.4 Hodnocení kontaminačních pokusů.....	73
3.5 Hodnocení experimentu.....	82
ZÁVĚR	84
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	86
PŘÍLOHY.....	99

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Seznam ilustrací:

Obrázek 1: Stavba vlasu	15
Obrázek 2: Fáze růstu vlasů	15
Obrázek 3: Místo odběru vzorku vlasů	24
Obrázek 4: Nastříhané koňské žíně	55
Obrázek 5: Snímky povrchu žíní po praní jednotlivými pracími činidly	65
Obrázek 6: Snímky povrchu žíní po praní jednotlivými pracími činidly (2. část)	66
Obrázek 7: Povrchová analýza žíní nepraných a žíní praných v kyselině dusičné	67

Seznam tabulek:

Tabulka 1: Obsah aminokyselin v nemodifikovaných suchých vlasech	17
Tabulka 2: Referenční rozsahy prvků v žíních zdravých dostihových koní.....	19
Tabulka 3: Přehled obsahu prvků ve zvířecí srsti	22
Tabulka 4: Přehled používaných činidel používaných k praní vlasů a srstí.....	26
Tabulka 5: Přehled pracích postupů používaných k úpravě lidských vlasů před analýzou.....	29
Tabulka 6: Referenční hodnoty pro hladiny prvků v lidských vlasech	36
Tabulka 7: Porovnání koncentrací ve vlasech po obohacení simulovaným potem a vyprání ..	50
Tabulka 8: Koncentrace kalibračních roztoků pro ICP-OES analýzu	54
Tabulka 9: Obsah prvků ve výluzích pevných kontaminujících materiálů	57
Tabulka 10: Spektrální linie a detekční limity pro jednotlivé prvky při ICP-OES analýze	59
Tabulka 11: Pracovní podmínky ICP-OES analýzy	59
Tabulka 12: Pracovní podmínky ICP-MS analýzy	60
Tabulka 13: Koncentrace prvků naměřené v certifikovaném referenčním materiálu	62
Tabulka 14: Výsledky opakovatelnosti kalibračních standardů	63
Tabulka 15: Prvkové složení nepraných žíní a žíní praných v horké vodě	68
Tabulka 16: Porovnání výsledků opakovaných měření	82

Seznam grafů:

Graf 1 (A – F): Porovnání obsahu prvků v nepraných žíních a po vyprání.....	70
Graf 2 (G – L): Porovnání obsahu prvků v nepraných žíních a po vyprání (2. část).....	71
Graf 3 (M – O): Porovnání obsahu prvků v nepraných žíních a po vyprání (3. část)	72
Graf 4 (A – F): Kontaminace pevnými látkami	74
Graf 5 (G – L): Kontaminace pevnými látkami (2. část).....	75
Graf 6 (M – R): Kontaminace pevnými látkami (3. část).....	76
Graf 7 (A – F): Kontaminace simulovaným potem	79
Graf 8 (G – L): Kontaminace simulovaným potem (2. část).....	80
Graf 9 (M – O): Kontaminace simulovaným potem (3. část).....	81

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
CRM	certifikovaný referenční materiál
DDW	double distilled water (angl.), dvakrát destilovaná voda
DIW	deionised water (angl.), deionizovaná voda
DL	detekční limit
DM	diabetes mellitus
DW	distilled water (angl.), destilovaná voda
EDTA	kyselina ethylediaminotetraoctová
ETAAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
FAAS	atomová absorpční spektrometrie v atomizaci v plameni
HV	horká voda
IAEA	International Atomic Energy Agency, mezinárodní agentura pro atomovou energii
ICP	indukčně vázané plazma
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
IS	interní standard
o-TOF-ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a průletovým analyzátozem s ortogonálním urychlováním iontů
PIXE	Particle Induced X-ray Emission, protonová mikrosonda
SD	standard deviation (angl.), směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SLS	laurethsulfát sodný

ÚVOD

Prvková analýza lidských vlasů a zvířecích srstí se stále těší velkému zájmu, a to nejen v oblasti vědecké, ale i komerční, je využívána pro různé účely, např. k hodnocení vlivu životního prostředí a expozice organismu toxickými prvky. Sledují se pracovní expozice vybraných profesí (např. zubaři, zaměstnanci skláren a těžebních dolů) i expozice obyvatel znečištěných městských oblastí či žijících v blízkosti průmyslových oblastí. Komerční laboratoře nabízejí služby prvkové analýzy laické veřejnosti ke zhodnocení nutričního a zdravotního stavu jedince, k úpravě stravovacích návyků a k suplementaci různými doplňky stravy či vitamíny. Vlasy je možno využít také v kriminalistice. Forenzní analýza může odhalit, jakým vlivům (chemikálie, jedy nebo drogy) byl organismus vystaven i několik měsíců zpětně. Analýza vlasů napomáhá při detekci používání nedovolených látek, dopingů, drog apod. Stejně jako vlasy je důležitým a využívaným materiálem také zvířecí srst. Elementární analýza vlasů/srstí má mnoho výhod, mezi které patří jednoduchý, neinvazivní odběr, skladování za běžných podmínek, ale také vyšší obsahy prvků než v jiných biologických materiálech.

Tato diplomová práce se zabývá současným stavem prvkové analýzy vlasů a srstí, zejména v souvislosti s původem vzorku vlasů/srstí, zdravotním stavem jedince a praktickými aspekty prvkové analýzy (postupy přípravy vzorku k analýze). Experimentální část je zaměřena na preanalytickou část prvkové analýzy koňských žíní, tedy na postupy odstranění povrchových nečistot, kdy je zkoumáno a porovnáváno celkem 5 pracích postupů. Dále je v práci navržen kontaminační experiment, který by měl umožnit vyhodnocení dopadů externí kontaminace a účinnost pracích metod při jejím odstranění.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lidský vlas

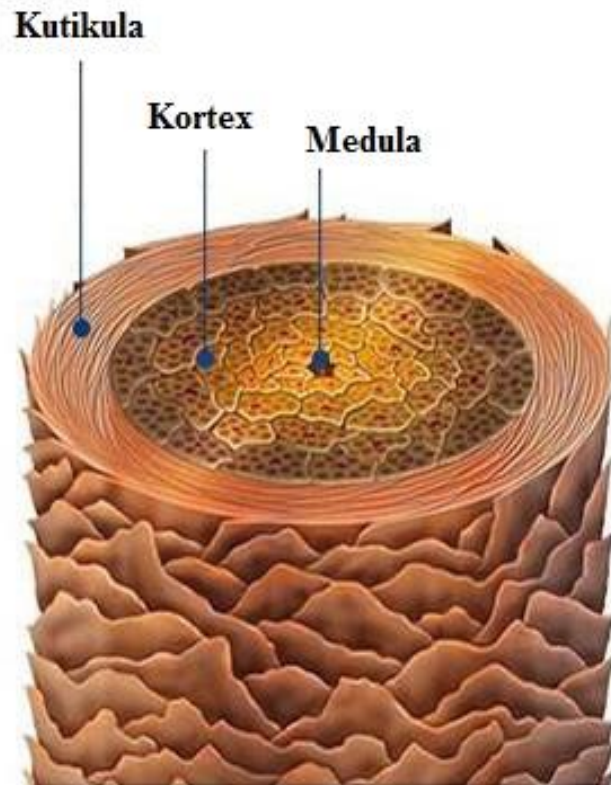
Vlas je derivátem epidermis, jedná se o keratinový útvar, který vyrůstá z vchlípenin epidermis, nazývaných vlasové folikuly. Vlasy vznikají během nitroděložního vývoje, kdy ve 20. týdnu gravidity začíná vyrůstat lanugo (primární ochlupení plodu). Po narození se počet vlasových folikulů nezvyšuje. Celkově je na těle okolo 5 milionů chlupů, z nichž kolem 100 000 vlasů je v kštici. Spodní část folikulu se rozšiřuje v bulbus, ve kterém je vespuďu umístěna vazivová papila a nad ní je umístěna zárodečná matrix. Buňky matrix se postupně dělí a vyvíjejí v další vrstvy spodní části folikulu. Z něj později vlas vyrůstá. Samotný pilus (chlup) se skládá z vlasového stvolu, kořene, pochvy, cibulky a vlasové bradavky. Vlasový stvol je umístěn uvnitř folikulu a skládá se z meduly, kortexu a kutikuly. Kolem stvolu je vnitřní epitelová pochva, která končí v místech vyústění mazových žlázek do folikulu. Pod vývodem mazové žlázy je k folikulu připojen musculus arrector pili, neboli vzpřimovač chlupů (Čihák, 1997; Štork a kol., 2013).

Podle období růstu jsou rozlišovány tři druhy ochlupení: primární, sekundární a terciální. **Primární** ochlupení (*lanugo*) vyrůstá ve fetálním období (4. – 6. fetální měsíc) a maxima dosahuje v 7. a 8. fetálním měsíci, kdy pokrývá téměř celé tělo. Ještě před narozením se u dítěte mohou objevit silnější sekundární chloupky. Toto **sekundární** ochlupení je typické až pro období postnatální a dělí se na chloupky (*pili*) a vlasy (*capili*). Pro vlasy je typické, že pokrývají pouze hlavu. Řasy vyrůstají při okrajích očních víček a slouží primárně k ochraně oka. Obočí se nachází nad horním krajem očnice a svým tvarem a polohou ovlivňuje výraz obličeje. V pubertě se začíná objevovat **terciální** ochlupení, které je tvořeno silnějšími, tmavšími a delšími chlupy. U mužů se objevuje okolo 20. – 25. roku života nad bradavkami, na břicho a končetinách. U žen se vyskytuje v menší míře. K lokálnímu terciálnímu ochlupení patří například vousy, chlupy v podpaží, chlupy v krajině stydké či chlupy v nose (Čihák, 1997).

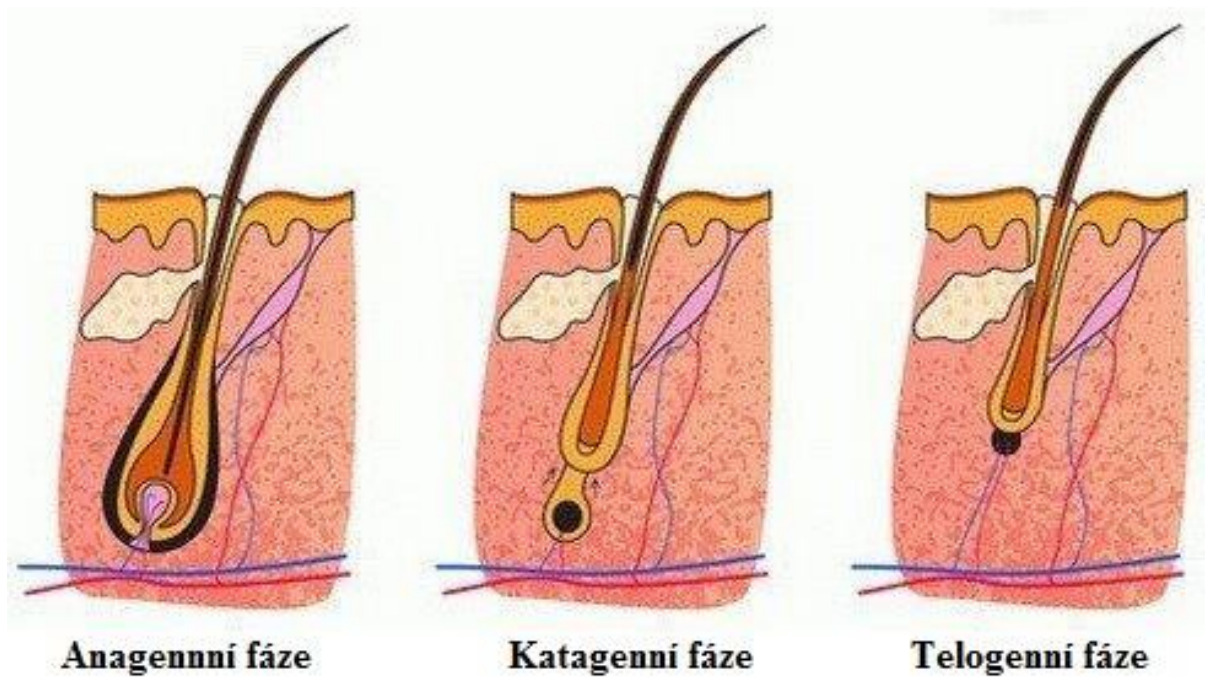
1.1.1 Stavba a růstový cyklus vlasu

Kutikula vlasu (*cuticula pili*) je velmi pevná vnější vrstva, která obklopuje vnitřek vlasu a chrání jej. Je složena ze zrohovatělých, zploštělých buněk. Tyto buňky se posunují vzhůru s růstem vlasů a postupně se mění z tvaru cylindrického na podélný plochý. Buňky tvoří prstence ze sedmi buněk a jsou naskládány podobně jako tašky na střeše (viz. Obrázek 1). Těsně pod kutikulou se nachází **korová vrstva** (*substantia corticalis*). Kortex je složen z hustě rozmístěných a velmi keratinisovaných buněk. Tvoří převážnou část vlasu a dává vlasu pružnost, sílu a pevnost. Ve vlasové kůře se také nachází pigment, jehož množství určuje barvu vlasů. Kolem vlasové papily jsou umístěny melanocyty, které dodávají buňkám vlasového kmene melanin. S věkem množství pigmentu přibývá, proto světlovlasých pětiletých dětí je okolo 27 %, kdežto světlovlasých dospělých jedinců je pouze necelých 6 %. Zrzavá barva vlasů je způsobena melaninem, kterého je menší množství a nedosahuje klasické tmavohnědé barvy a je tedy světlejší a načervenalý. Ve stáří pigmentu naopak ubývá a vlasy šediví. Dojem stříbřitých šedivých vlasů je zapříčiněn bublinkami vzduchu, které vnikají mezi buňky vlasu. **Dřeň vlasu** (*medulla pili*) se nachází uprostřed vlasového stvolu. Středem některých vlasů vede kanálek, ve kterém jsou buňky vyvíjející se ze zárodečné vrstvy směrem od vlasové papily. Některé vlasy kanálek nemají nebo jej mají jen místy. Průměr kanálku se liší podle síly vlasu. Tento kanálek má význam především u zvířat (Hoch a Schmock, 1994; Čihák, 1997).

Jsou rozlišovány tři fáze životního cyklu vlasů: anagen, katagen a telogen (Obrázek 2). **Anagenní** (růstová) fáze trvá 3 až 6 let, kdy vlasový přírůstek činí 0,35 mm za den. V této fázi se nachází 80 až 90 % všech vlasů. Přechodná **katagenní fáze** trvá pouze 10 dnů a nachází se v ní méně než 1 % vlasů. Katagen následně přechází do **telogenní** (klidové) fáze, která trvá 2 až 4 měsíce a na jejím konci vlas vypadne. Denně vypadává okolo 100 vlasů po celé ploše hlavy. V telogenní fázi se nachází 15 až 20 % vlasů. Délka jednotlivých fází a počet vlasů, nacházejících se v této fázi, se mohou výrazně lišit a jsou geneticky podmíněny. Rychlost růstu, pigmentace, tloušťka vlasu a plošná hustota vlasů závisí mimo jiné na pohlaví a geografické lokalitě jedince. Celkový počet a aktivita melanocytů vlasového folikulu určují barvu vlasů. Vlasový přírůstek za měsíc se pohybuje od 0,7 do 3,6 cm, průměrně se počítá s měsíčním přírůstkem 1 cm (Wennig, 2000; Štork a kol., 2013).



Obrázek 1: Stavba vlasu (zdroj: URL 1)



Obrázek 2: Fáze růstu vlasů (zdroj: URL 2)

1.1.2 Chemické složení vlasu

Vlasy obsahují přibližně 65 a 95 % bílkovin. Obsah bílkovin se liší v závislosti na obsahu celkové vlhkosti ve vlasech. Vlhkost vlasů může dosahovat až 32 % jejich celkové hmotnosti. Zbylé sloučeniny jsou lipidy (1 – 9 %), pigment a stopové prvky (Robbins, 2012).

Bílkoviny (proteiny) jsou kondenzované polymery aminokyselin. Vzhledem k velkému počtu chemických reakcí, kterým jsou lidské vlasy podrobeny (trvalá ondulace, barvení vlasů, rovnání vlasů, sluneční záření apod.), je mnoho proteinů fragmentováno a některé aminokyseliny ve vlasech jsou dokonce derivatizovány. Nemodifikované „panenské“ vlasy jsou ty, které nebyly nijak chemicky modifikovány (bělením, trvalou ondulací, rovnáním nebo barvením). V lidských vlasech bylo identifikováno celkem 22 aminokyselin: glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin, tyrosin, lysin, arginin, ornitin, histidin, citrulin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, threonin, serin, cystin, methionin, cystein, kyselina cysteová, prolin a tryptofan. Kyselina cysteová (3-sulfoalanin) a ostatní aminokyseliny odvozené od těchto 22 aminokyselin byly přítomny u vlasů změněných kosmeticky nebo vlivem počasí. Podstatně více cystinu bylo objeveno u mužů než u žen. Také ve tmavých vlasech bylo cystinu více než ve vlasech světlých. Mezi věkem a obsahem cystinu ve vlasech nebyla nalezena žádná souvislost. Tabulka 1 shrnuje kvantitativní složení aminokyselin ve vlasech (Robbins, 2012).

Vlasy mají velkou afinitu ke kovům, která je dána především přítomností cystinu, který je přítomen ve vlasu až ze 14 %. Mnoho kovů nalezených ve vlasech je navázáno přes atomy síry v cystinu nebo přes sulfanylovou (SH) skupinu přítomnou v jiných aminokyselinách. Kovy se mohou navázat do vlasové struktury také pomocí melaninu. Kovové ionty a organické aminy mají k melaninu vysokou afinitu díky jejich pozitivnímu náboji ve fyziologickém pH a také díky interakcím s melaninem pomocí elektrostatických sil. Nenabitě kovy (například elementární rtuť) se také mohou vázat k hydrofobnímu jádru polymerní struktury melaninu (Morton a kol., 2002).

Tabulka 1: Obsah aminokyselin v nemodifikovaných suchých vlasech

Aminokyselina	c [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$]	Aminokyselina	c [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$]
Alanin	314–384	Isoleucin	244–366
Arginin	499–620	Leucin	489–529
Asparagová kyselina	292–578	Lysin	130–222
Citrulin	-	Methionin	47–67
Cysteová kyselina	22–40	Prolin	374–708
Cystein	41–66	Serin	705–1091
Cystin	1380–1512	Threonin	588–714
Glutamová kyselina	930–1036	Tryptofan	20–64
Glycin	463–560	Tyrosin	121–195
Fenylalanin	132–226	Valin	470–513
Histidin	40–86	% N jako amoniak	15,5 - 16,9 %

(upraveno dle: Robbins, 2012)

Lipidy přítomné ve vlasech jsou klasifikovány různými způsoby: volné nebo vázané, endogenní nebo exogenní, vnitřní nebo povrchové a podle chemické funkční skupiny nebo typu. *Vázané lipidy* jsou ty, které nelze odstranit pomocí extrakce rozpouštědly, protože jsou kovalentně navázány na vlasové proteiny. Například kyselina 18-methyleikosanová je připojena k proteinům pomocí thioesterových vazeb. *Volné lipidy* jsou z vlasů odstranitelné pomocí rozpouštědel, jelikož jsou vázány pomocí slabších vazeb, jako jsou van der Waalovy přitažlivé síly nebo vazby vodíkové. *Endogenní lipidy* jsou původem z biosyntéz v buňkách matrix ve vlasovém folikulu. Naopak lipidy syntetizované v mazových žlázách jsou nazývány jako *exogenní*. *Vnitřní lipidy*, na rozdíl od *povrchových*, buď pronikly do vlasu, nebo do něj byly zakomponovány. Z hlediska *chemického typu* jsou lipidy děleny do 4 skupin. Do skupiny A patří skvaleny, vosky, triacylglyceridy a mastné kyseliny. Skupinu B tvoří cholesterol a ceramidy. Skupina C jsou uhlovodíky a ve skupině D je již zmíněná kyselina 18-methyleikosanová (Robbins, 2012).

Voda tvoří základní složku lidského vlasu. Obsah vlhkosti keratinových vláken závisí na podmínkách vysušení vlasů a také na míře relativní vlhkosti. Vlhkost vlasu hraje důležitou roli ve fyzikálních vlastnostech vlasů (Robbins, 2012).

Mezi **stopové prvky** vyskytující se ve vlasech patří Ca, Mg, Sr, B, Al, Na, K, Zn, Cu, Mn, Fe, Ag, Au, Hg, As, Pb, Sb, Ti, W, V, Mo, I, P a Se. Obsah těchto prvků ve vlasech je obecně velmi nízký (méně než 1 %). Původ těchto prvků je z mnoha různých zdrojů.

Bate a kol. (1966) prováděli studii 13 prvků v lidských vlasech a v prostředcích určených k mytí vlasů. Dospěli k závěru, že velká část stopových prvků pochází z potu. Dalším zdrojem stopových prvků (hlavně vápníku a hořčíku) ve vlasech může být voda. Běžné prvky ve vodě jako železo, mangan a měď se také ve vlasech ukládají. Smart a kol. (2010) uvádějí, že barvené vlasy promyté několikrát vodou z vodovodu v sobě hromadí vysoké koncentrace kovů. Bylo prokázáno, že měď z plaveckých bazénů může měnit odstíny blond vlasů do zelena. Dalšími zdroji kovů ve vlasech je také znečištěné ovzduší, strava nebo metabolické odchylky organismu. Kontaminace vlasů kovy může také vzniknout z vlasových přípravků, které často obsahují zinek, selen (přípravky proti lupům), draslík, sodík, hořčík (šampony) nebo dokonce olovo z octanu olovnatého, který se vyskytuje v barvách na vlasy (Bhat a kol., 1979; Robbins, 2012).

1.2 Zvířecí srst

Srst všech savců, napříč různými taxonomickými skupinami, je stejného chemického složení a má stejnou hlavní strukturu, ale může se lišit v morfologii. Jedná se především o uspořádání buněk ve dřeni pesíků (ochranných chlupů), tvar šupinek kutikuly a tvar příčného řezu chlupu. U kriminálních případů se bezpochyby nejčastěji setkáváme s kočičími a psími chlupy. Při forenzní analýze mohou být tyto dva druhy rozlišeny a identifikovány na základě tvaru kořínků. Psí chlupy mají tvar podobný rýči a kočičí chlupy jsou roztřepené. Nicméně oba tyto tvary se mohou vyskytovat u obou druhů zvířat i u ostatních druhů. Proto je nutné zvážit více aspektů k identifikaci (Tridico, 2014).

Analýza prvkového složení srsti volně žijících zvířat, stejně jako lidských vlasů, má mnoho výhod. Pro správnou interpretaci výsledků těchto analýz je třeba mít vhodná vstupní data (Długaszek a Kopczyński, 2014). Srst zvířat je pokládána za dobrý nástroj monitoringu těžkých kovů. Obsah těžkých kovů v srsti zvířat může odrážet jejich obsah v půdách a pícech. Nedostatek či naopak nadbytek některých prvků a těžkých kovů v organismu většinou vede k určitým patologickým stavům. Cu, Zn, Mn, Ni, Co a Fe jsou nezbytné stopové prvky pro lidi i zvířata. Oproti tomu olovo a kadmium jsou velmi toxické prvky (Rashed a Soltan, 2005).

O prvkovém složení srsti volně žijících zvířat existuje jen malé množství záznamů. Doposud byly popsány obsahy některých prvků v srsti hospodářských zvířat, jako jsou koně (Asano a kol., 2002 a 2005a; Budzynska, 2006) nebo krávy (Gabryszuk, 2010). Z domácích zvířat bylo prvkové složení srsti popsáno u psů (Chyla a Zyrnicki, 2000).

Asano a kol. sledovali vybrané prvky (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Se, Si a Zn) pomocí optické emisní spektrometrie s buzením v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES) v koňských žíních. Vzorky pocházely od dostihových koní - 9 klisen a 15 hřebců. Koncentrace prvků mezi pohlavími se výrazně nelišila. Dále byla zkoumána korelace obsahu prvků a věku. Pozitivní korelace s věkem byla objevena u kadmia a molybdenu. Negativní korelace byla objevena u rtuti, manganu a železa. Autoři se domnívají, že hladiny stopových prvků by mohly být využity pro hodnocení nutričního stavu koní, metabolických poruch a chorob v praxi, jelikož se vzorky snadněji odebírají a skladují než ostatní biologické materiály. Z těchto důvodů autoři doporučují níže uvedená (Tabulka 2) referenční rozmezí prvků využívat při léčbě koní v praxi (Asano a kol., 2002).

Tabulka 2: Referenční rozsahy prvků v žíních zdravých dostihových koní

Prvek	Obě pohlaví (n = 24)	Klisky (n = 9)	Hřebci (n = 15)
	$\bar{c} \pm SD [\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$		
Al	64,5 ± 77,0	84,4 ± 113,5	61,4 ± 50,4
As	1,16 ± 0,44	1,25 ± 0,57	1,12 ± 0,36
Ca	1309,0 ± 523,0	1597 ± 484,0	1196 ± 538,0
Cd	0,12 ± 0,12	0,09 ± 0,06	0,15 ± 0,13
Cr	0,22 ± 0,16	0,20 ± 0,17	0,23 ± 0,15
Cu	4,8 ± 1,3	5,0 ± 1,4	5,0 ± 1,7
Fe	69,0 ± 83,0	99,0 ± 132,0	60,0 ± 44,0
Hg	0,31 ± 0,02	0,34 ± 0,23	0,28 ± 0,20
K	617,0 ± 686,0	870,0 ± 904,0	386,0 ± 343,0
Mg	396,0 ± 336,0	548,0 ± 520,0	300,0 ± 153,0
Mn	5,2 ± 3,35	4,86 ± 2,73	5,06 ± 3,77
Mo	0,55 ± 0,65	0,45 ± 0,07	0,67 ± 0,71
Na	582,0 ± 476,3	681,0 ± 606,0	458,0 ± 358,0
Ni	0,26 ± 0,09	0,23 ± 0,07	0,28 ± 0,10
P	324,9 ± 132,8	331,0 ± 98,0	346,0 ± 162,0
Pb	0,93 ± 0,78	1,24 ± 1,28	0,76 ± 0,28
Se	1,29 ± 0,56	1,40 ± 0,83	0,26 ± 0,38
Si	20,2 ± 19,2	17,8 ± 11,9	27,0 ± 25,0
Zn	86,0 ± 24,0	92,0 ± 25,0	88,0 ± 31,0

Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

(upraveno dle: Asano a kol., 2002)

Ve své další studii Asano a kol. zjišťovali vztah mezi atrioventrikulární bloádou a obsahem prvků v koňských žíních a v krevním séru. Vzorky byly získány od 9 klisen a 27 kastrovaných hřebců ve věku $13,2 \pm 4,3$ let. Na základě elektrokardiografických nálezů byly vytvořeny 3 skupiny: 22 koní zcela bez abnormalit, 5 koní s bloádou 1. stupně a 9 koní s bloádou 2. stupně. Pomocí metody PIXE (*Particle Induced X-ray Emission*) bylo sledováno 25 prvků ve vzorcích séra i žíní. Koně s bloádou 1. a 2. stupně měli v žíních podstatně vyšší hladiny prvků Br, Ca, Sr a Zn než koně bez jakýchkoliv elektrokardiografických abnormalit. Při kontrole hladin prvkového složení v séru mezi skupinami nebyl nalezen významný rozdíl. Tyto výsledky obsahu prvků koňských žíní by mohly být využity k předpovědi vzniku srdečních onemocnění u koně ještě dříve, než se objeví první příznaky (Asano a kol., 2005a).

Z volně žijících zvířat byl studován obsah prvků v srsti králíků a akumulace arsenu v jejich srsti (Lin a kol., 2005), lišek (Gunstheimer a kol., 1996) a divočáků (Sobańska, 2005). Wren (1986) ve své studii popisuje srst několika divokých zvířat (vydra, mýval, ondatra, opice, lední medvěd, rys, vačice, veverka) jako možný ukazatel přítomnosti rtuti v životním prostředí. Srst koz, ovcí a velbloudů popisuje Rashed a Soltan (2005) a srstí jelenů se zabýval Jones (2002).

Długaszek a Kopczyński (2014) provedli srovnávací analýzu akumulace prvků v srsti volně žijících zvířat (srnců, divokých prasat a zajíců). Pomocí metody atomové absorpční spektrometrie (AAS) byly stanoveny následující prvky, seřazené od nejvyšších koncentrací sestupně: Ca, Zn, Mg, Fe, Cu, Mn, Pb, Al, Ni, Cr a Cd. Mezi analyzovanými zvířaty byly u srnce naměřeny nejnižší hladiny vápníku. Nejvyšší hladiny Cu, Mg a Zn byly objeveny u zajíců. U divokých prasat byly nejvyšší hladiny Al, Fe a Mn, a naopak nejnižší hladiny Pb a Cd. Srovnatelné hladiny Cr a Ni byly nalezeny v srsti všech testovaných zvířat. Dále Długaszek a Kopczyński porovnávali detekované koncentrace prvků v srsti s obsahem prvků v játrech a ve svalové tkáni těchto tří zvířat. Hladiny prvků Al, Ca, Cr, Mn, Ni a Pb byly v souladu s hodnotami nalezenými v játrech a svalové tkáni těchto zvířat. Tyto informace dokazují, že obsah prvků v srsti může odrážet obsah prvků v těle. Také by srst divokých zvířat mohla být využita k hodnocení životního prostředí či kontaminací některými prvky. Srovnání hladin prvků ve zvířecí srsti, uváděných v literatuře, je shrnuto v Tabulce 3 (Długaszek a Kopczyński, 2014).

Rashed a Soltan (2005) ve své studii sledovali obsah těžkých kovů (Co, Fe, Mn a Ni) a toxických prvků (Cd, Pb) v srsti koz, ovcí, velbloudů a dále také ve vzorcích pícnin a půdy. Vzorky byly odebrány v různých městských i venkovských lokalitách. Zvýšené hladiny železa a manganu byly nalezeny v srsti ovcí, velbloudí srst obsahuje nejvíce olova. V srsti koz byly nalezeny vysoké hladiny kadmia a niklu. Koncentrace těžkých kovů v těchto vzorcích odráží přítomnost sledovaných kovů v půdě a pícninách. Liší se mezi oblastmi a může podat informaci o míře znečištění dané oblasti.

Sobańska (2005) ve své studii zkoumala srst divokých prasat jako možný indikátor znečištění životního prostředí rtutí. Vzorky srsti byly odebrány během dvou loveckých sezón ve 4 regionech v Polsku. Pro úpravu vzorku před analýzou byly testovány dvě prací metody s deionizovanou vodou a za použití Tritonu X-100. Jako vhodnější metodou praní vzorku se osvědčilo praní v deionizované vodě, které odstranilo vnější zdroje rtuti. Obsah rtuti byl detekován pomocí metody AAS. Studie odhalila vyšší obsahy rtuti u samic. Nejvyšší hladiny rtuti byly nalezeny u mladých jedinců ve věku 1-2 let. Naměřené hodnoty také pozitivně korelují s výsledky znečištění životního prostředí uváděnými státními úřady (Sobańska, 2005).

Tabulka 3: Přehled obsahu prvků ve zvířecí srsti [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]

Zvíře	Al	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Pb	Zn
Pes	20,7 – 43,8	381 – 1010	-	-	14,2 – 18,6	52,6 – 108	101 – 215	1 – 2,29	1,3 – 6,6	1,8 – 2,8	222 – 258
Kráva *	14224	-	2,7	75,76	2263	15925	-	3587	69,45	32,67	37552
Kůň	3,58	241,57	0,01	0,02	1,63	11,80	5,19	0,11	0,03	0,12	193,8
Kůň	73	1288	-	0,49	6,72	35	112	1,24	0,19	1,43	178
Liška	1,45	758	0,02	0,42	6	31	87	4,2	0,33	0,3	129
Jelen	-	-	-	-	-	20 – 86	-	-	-	-	85 – 106
Koza	-	-	-	0,71 – 2,11	-	45 – 879	-	0,35 – 12	-	0,12 – 29	-
Ovce	-	-	-	0,6 – 1,75	-	128 – 996	-	0,01 – 8,9	-	0,10 – 6,25	-
Velbloud	-	-	-	0,45 – 1,75	-	85 – 681	-	0,90 – 13	-	0,11 – 5,75	-
Sob	-	-	-	0,43	11,3	-	-	5,40	-	0,63	948

* koncentrace v [$\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$]
 (upraveno dle: Długaszek a Kopczyński, 2014)

1.3 Prvkové složení vlasů

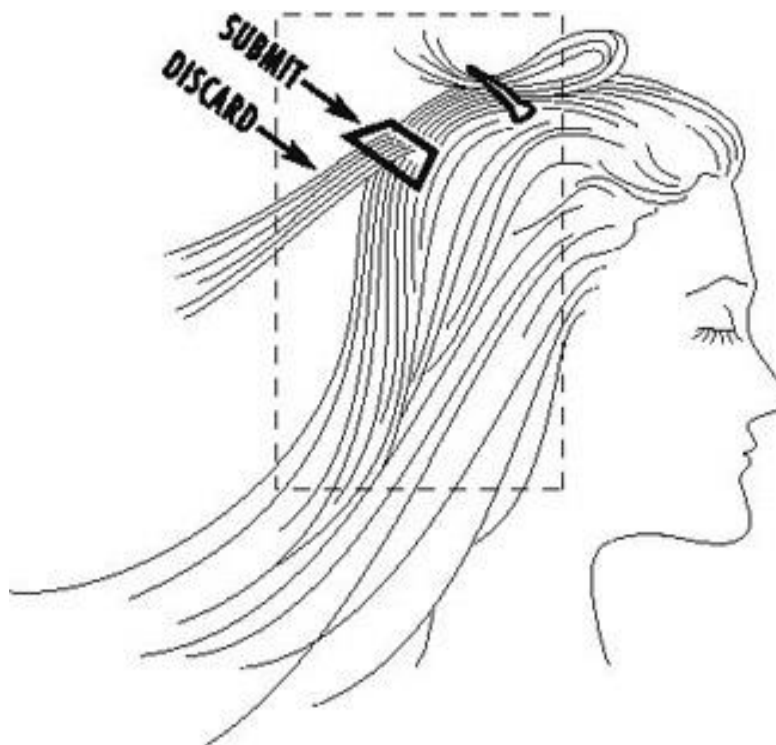
V posledních desetiletích je pozornost stále věnována sledování specifických chemikálií a jejich metabolitů v lidských tkáních (tzv. biologický monitoring). Pro hodnocení účinků látek na zdraví, při pracovní nebo environmentální expozici, jsou používány tělní tekutiny (krev, moč) a také lidské tkáně (vlasy, nehty). Prvková analýza vlasů (i srsti) bývá využívána k hodnocení vlivu životního prostředí, expozice toxickými prvky, pro odhad nutričního stavu jedinců apod. (Sreenivasa Rao a kol., 2002; Dongarrá a kol., 2011; Wołowiec a kol., 2013). Využití má i ve forenzní toxikologii, kde má velký potenciál zejména v případech, kdy nelze pro toxikologické vyšetření použít jiný materiál. Analýza vlasů neprokazuje akutní otravu, ani jestli byla příčinou smrti otrava, ale může prokázat chronickou otravu např. lépe než moč. Pomocí vlasové analýzy také může být zjištěn doping u vrcholových sportovců, kteří užívali anabolické steroidy. Je možné u nich sledovat hladiny hormonů, amfetaminů, různá analgetika, lokální anestetika a jiné (Procházka, 2006). Z hlediska environmentální expozice jsou objektem zájmu především lidé žijící v blízkosti průmyslových oblastí, v městských oblastech se znečištěným ovzduším nebo v geologických oblastech s abnormálním výskytem kovů a polokovů. Profesionální zátěži mohou být vystaveni zubaři, zaměstnanci uhelných dolů nebo pracovníci firem vyrábějící baterie aj. (Szykowska a kol., 2009; Dongarrá a kol., 2011).

Vzorky vlasů se dají shromáždit neinvazivně, rychleji a snadněji než vzorky krve, moče nebo jiné tkáně. Vlasy jsou chemicky inertní a jejich výhodou jsou 50 – 100x vyšší koncentrace stopových prvků ve vlasech než v jiných klinických materiálech (krev, moč). Hladiny prvků v séru totiž často nekorespondují s celkovým obsahem prvků v organismu, neboť koncentrace prvků v krvi je řízena homeostatickými mechanismy. Velkou výhodou je také skladování a transport vzorků, pro které nejsou třeba žádné speciální podmínky (Sreenivasa Rao a kol., 2002; Dongarrá a kol., 2011; Wołowiec a kol., 2013).

Laboratoře více než 25 let nabízejí laické veřejnosti vlasovou analýzu ke zjištění zdravotního stavu organismu i k posouzení zatížení těžkými kovy. Analýza vlasů má však svá omezení: kinetika biochemického mechanismu zabudování prvků do vlasů není zcela objasněna, referenční hodnoty chybí a výsledky analýzy vlasů ne vždy odpovídají jiným biologickým ukazatelům. Navzdory mnohým problémům s interpretací analyzovaných dat má však chemická analýza lidských vlasů určitou praktickou hodnotu (Hambidge, 1982; Kučera, 2006; Dongarrá a kol., 2011).

1.3.1 Odběr vzorku a skladování

Vzorek vlasů by měl být odebírán na zadní části hlavy (oblast zátylku). Odběr by měl být prováděn pomocí ostrých nůžek z nerezové oceli. Vzorky jsou skladovány v plastových sáčcích při pokojové teplotě. The Society of Hair Testing ve svém manuálu pro odběr vzorku pro testování obsahu drog doporučuje odebírat vlasy ze zadní části hlavy, co nejbližší od pokožky. Tato oblast je považována za místo s nejmenšími rozdíly v rychlosti růstu vlasů. Na Obrázku 3 je černě orámovaná oblast použitá k analýze, zbytek ušřížených vlasů je vyřazen. Vzorky vlasů musí být skladovány v suchém, tmavém prostředí o pokojové teplotě, mimo sluneční záření. Nesmí se skladovat v lednici či mrazáku. Vlhké vzorky musí být před skladováním a analýzou vysušeny. Dle polské laboratoře stopových prvků Biomol-MED jsou k prvkové analýze vhodné přírodní nebarvené vlasy. Je třeba je ušříhnout z několika míst těsně u hlavy pomocí ostrých nůžek, aby se neroztřepily. Vlasy nemohou být vytrhnuté či vypadlé. Vlasy by neměly být nijak ošetřeny (vyloučit použití laků, gelů, pěn apod.). Nejlepší vzorek se nachází 3 – 4 cm od pokožky hlavy. K jedné analýze je potřeba zhruba 200 – 300 mg vlasů (Morton a kol., 2002; Cooper a kol., 2011; Analýza prvků z vlasů – zdravotní program, 2017).



Obrázek 3: Místo odběru vzorku vlasů (zdroj: URL 3)

1.3.2 Příprava vzorku k analýze

Příprava vzorku před analýzou je velmi důležitým krokem, který může ovlivnit výsledky analýzy. Účelem přípravy vzorku je odstranit vnější kontaminanty, a tím umožnit stanovení pouze vnitřních analytů. Podle původu jsou rozlišovány dva zdroje kontaminace: exogenní (vnější) a endogenní (vnitřní). Exogenní kontaminanty, které byly navázány až poté, co vlas vyrostl, jsou původem ze životního prostředí a jsou lehce odstranitelné pracími metodami. Endogenní kontaminace je důsledkem nahromadění prvků a produktů metabolismu uvnitř vlasu. Ve vnitřní struktuře vlasu jsou kovy zabudované do vlasových proteinů, tato vazba je inertní vůči metabolismu, nevratná a velmi pevná. Studie, zabývající se prvkovou analýzou vlasů, vedly k řadě protichůdných názorů a diskuzí, týkajících se problémů a překážek v analýze stopových prvků. Kontroverzní částí procesu analýzy se zdá být příprava vzorku před analýzou, konkrétně prací postupy (Chyla a Zyrnicki, 2000; Morton a kol., 2002).

1.3.2.1 Metody praní

Promývací roztoky používané pro přípravu vzorků lze obecně rozčlenit do čtyř skupin. Jsou to organická rozpouštědla (aceton a methanol), ionogenní rozpouštědla (laurethsulfát sodný – SLS), neionogenní rozpouštědla (Triton X-100) a komplexotvorná, chelatační činidla (EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová). V praxi se používají různé postupy praní, které kombinují výše uvedená činidla, s různým počtem opakovaných praní, délkou jednotlivých kroků, použitím ultrazvuku aj. V Tabulce 4 jsou uvedena běžně využívaná činidla k praní a jejich používané koncentrace. V současné době však neexistují žádné standardizované metody praní, které by spolehlivě rozlišily endogenní a exogenní stopové prvky. Většina pracích metod neposkytuje porovnatelné, reprodukovatelné výsledky (Chyla a Zyrnicki, 2000; Morton a kol., 2002).

Běžně používaným pracím postupem je metoda dle Mezinárodní agentury pro atomovou energii (IAEA), zahrnující postupné promývání acetonem, vodou a acetonem. Nejprve jsou vlasy promyty jedenkrát v chemicky čistém acetonu, třikrát v deionizované vodě (vysoké čistoty) a poté opět jedenkrát v acetonu. Vzorek se následně nechá stát 10 minut při pokojové teplotě v kontaktu s promývacím roztokem, ve kterém by měly být vlasy zcela ponořeny. Promývání by se mělo provádět v bezprašném prostředí. Tato prací metoda je pravděpodobně dostatečná pro odstranění nečistot a prachu, ale není prokázáno, že z vlasů odstraňuje pouze externě navázané prvky (Morton a kol., 2002).

Pracími postupy se zabývá řada autorů, kteří se snaží najít univerzální metodu, která by odstranila vnější a zároveň zachovala obsah vnitřních prvků. Existují i přehledové publikace, kde jsou jednotlivé prací postupy a jejich účinnosti porovnávány. Pracovní postupy jednotlivých pracích metod a jejich rozdíly jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 4: Přehled používaných činidel používaných k praní vlasů a srstí

Chemická povaha	Činidlo	Používané koncentrace
Organická rozpouštědla	Aceton	
	Methanol	
Ionogenní detergenty	Laurethsulfát sodný	1%
	Dodecylsírán sodný	5%
Neionogenní detergenty	Triton X-100	1%
Komplexotvorné látky	EDTA	1 – 5%; $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Zředěné kyseliny	HCl	$0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
	HNO ₃	0,01 – 0,125%; $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
Voda	Destilovaná voda	
	Dvakrát destilovaná voda	
	Deionizovaná voda	

Mattera a kol. (1981) hodnotili schopnost různých pracích prostředků (kyselina dusičná, dodecylsírán sodný (SDS) a SDS v kombinaci s EDTA) **extrahovat měď a zinek** z lidských vlasů. 30 gramů lidských vlasů z kadeřnictví bylo odváženo a rozstříháno na malé části pomocí nerezových nůžek. Poté byly vlasy ponořeny do 3 litrů deionizované vody a míchány 30 minut. Pomocí polyethylenové sítky byly vlasy odděleny a vysoušeny 2 dny při 100 °C v sušárně s přívodem dusíku. Jednotlivé vzorky byly naváženy po 0,35 g a rozloženy rozkladem na mokré cestě za pomoci 5 ml směsi HNO₃ a HClO₄ (1:1). Cílem studie bylo hodnocení pracích postupů z hlediska jejich účinku na endogenní a exogenní hladiny zinku a mědi. Prací roztok (200 ml) a dva gramy vlasů byly smíchány v kádince a byly míchány po celou dobu experimentu. Ve stanovených intervalech byly do polyethylenových lahvíček odebírány 5 ml alikvoty promývacích roztoků, ve kterých byly dále stanoveny měď a zinek. Po dokončení pracího experimentu byla část promytých vlasů vysušena, rozložena a spolu s nepranými vlasy byla analyzována. Bylo zjištěno, že roztok 0,125% kyseliny dusičné odstraní 95 % zinku za 30 hodin. Směs 5% SDS a 1,25% EDTA vykazovala zvýšenou extrakci kovů se zvyšujícím se pH. Tato směs je však i při nižších hodnotách pH schopna odstranit více než 60 % mědi a zinku z vlasů.

LeRoy (1986) se zabýval vlivem postupu praní vlasů na výsledky prvkové analýzy. Pomocí AAS porovnával obsahy 15 prvků ve vlasech nepraných, vlasech praných v destilované vodě po dobu 10 minut a vlasech praných v destilované vodě 30 minut. Největší vliv mělo praní na: Ca, K, Mg a Na. Delší doba praní vedla k větší ztrátě minerálů. Větší ztráty prvků po vyprání byly pozorovány ve vlasech ženských než mužských. Tento poznatek podporují studie tvrdící, že ženské vlasy jsou více pórovité.

Borella a kol. (1996) porovnávali 6 různých pracích metod, které zahrnovaly ionogenní a neionogenní detergenty, organická rozpouštědla, chelatační činidla a použití ultrazvuku. Účinnost pracích postupů byla testována pro prvky toxické (Cd, Pb), stopové (Cr, Cu, Se, Zn) a hlavní (Ca, K a Mg). Účinnost praní se lišila podle úpravy vzorku před stanovením a mezi jednotlivými prvky. Nejvyšší účinnost praní byla pozorována u použití EDTA a nejnižší účinnost pro ultrazvuk. Nevyhovující výsledky byly za použití směsi aceton/methanol. Organická rozpouštědla vykazovala nejvyšší účinnost odstranění pro draslík a toxické prvky.

Chyla a Zyrnicki (2000) zkoumali obsah prvků v srsti psů. Byly stanovovány prvky Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Ti, V a Zn za pomoci metody ICP-OES. Cílem práce bylo porovnání vlivu pěti pracích metod – deionizovaná voda, organická rozpouštědla (aceton a methanol), komplexotvorné činidlo (0,05M EDTA) a neionogenní detergent (1% Triton X-100). Oplach vlasů (navážka cca 3 g) byl prováděn při pokojové teplotě ve zkumavkách na mechanické třepačce. Na každé mytí bylo použito 300 ml roztoku a doba promývání byla stanovena na 20 minut. Pro odstranění zbytku promývacích roztoků byly vlasy na konci důkladně opláchnuty deionizovanou vodou. Následně byly vzorky vysušeny při pokojové teplotě přes noc. Triton X-100 byl podle autorů nejvhodnějším pro odstranění exogenních prvků při multielementární analýze vlasů. Kromě toho také výsledky ukázaly, že koncentrace prvků měřených ve vlasech jsou velmi podobné obsahu prvků v lidských vlasech. Vztah mezi obsahem prvků v srsti psů a barvou srsti je také podobný jako u lidí.

Rashed a Soltan (2005) doporučují zvířecí srst omýt metodou doporučenou dle IAEA, zahrnující vícenásobné oplachování acetonem a dvakrát destilovanou vodou.

Sen a Chaudhuri (2001) sesbírali v kadeřnictvích vzorky černých vlasů od 75 jedinců ve věku od 25 do 35 let. Všichni jedinci byli obyvatelé indické Kalkaty, stejného socioekonomického zařazení a původem ze čtyřčlenné rodiny. Na vlasy nebyl aplikován žádný olej, barva, šampon ani lak alespoň týden před odběrem. Vzorky byly odebírány z oblasti krku

pomocí nůžek. 500 mg vlasů bylo uzavřeno a skladováno v celofánovém sáčku. Byly aplikovány tři různé metody praní vzorku: destilovaná voda, směs 1:1 acetonu a ethanolu a kombinace 1% roztoku neionogenního detergentu, destilované vody a acetonu. Praní trvalo 30 minut a poté byly vlasy vysušeny přes noc při 60 °C. Vzorky byly rozloženy pomocí kyseliny dusičné a chloristé. Stanovení olova ve vzorcích bylo provedeno metodou plamenové AAS (FAAS). Destilovaná voda neodstranila špínu, olej, prach ani organické kontaminanty, což je odrazem vysoké koncentrace olova ($13,112 \pm 3,311 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Druhá metoda (aceton, ethanol) částečně odstranila organické kontaminanty, prach a olej, takže koncentrace olova byla nižší ($6,932 \pm 1,971 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Nejlepší výsledky vykazovalo použití neionogenního detergentu, pomocí kterého byly odstraněny všechny kontaminanty a výsledná koncentrace olova tak činila $5,676 \pm 1,801 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Výsledky jsou uvedeny jako průměr koncentrací \pm směrodatná odchylka.

Morton a kol. (2002) testovali 6 postupů přípravy vzorku před analýzou pro stanovení prvků As, Cd, Cr, Cu, Pb, Sb a Se v lidských vlasech pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS). Byl proveden experiment se vzorky obohacenými simulovaným potem s přídavkem prvků As, Cd, Cr, Cu, Pb, Sb a Se. Provedení experimentu je popsáno v kapitole 1.3.2.1. Testované prací metody zahrnovaly použití IAEA metody, omytí deionizovanou vodou, 1% (v/v) SLS, 1% (v/v) Triton X-100, s přídavkem nebo bez přídavku organického oplachu, 1% (w/v) EDTA, isopropanol, 0,1% (v/v) HNO_3 , $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl a komerční šampon, neobsahující sloučeniny selenu. Bylo prokázáno, že exogenně navázaný chrom, kadmium a olovo byly odstraněny pomocí $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl. Naopak antimon, arsen, měď a selen byly nevratně navázány a nebyly odstraněny žádnou z testovaných pracích metod. Ve studii nebyl prokázán významný vliv pracího postupu na obsah cílového kovu.

Kempson a Skinner (2012) porovnávali dva prací postupy: metodu dle IAEA a použití neionogenního detergentu. K analýze prvků byla použita metoda hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s průletovým detektorem (ToF-SIMS). Dvě metody byly použity pro porovnání jejich vlivu na vnitřní a vnější obsahy prvků. Na, K, Ca, Mg a Fe byly hodnoceny s ohledem na jejich relativní signál v porovnání s uhlíkem. Obě metody měly podobný vliv. Všechny prvky s výjimkou železa byly odstraněny z povrchu, stejně jako zevnitř vlasů. U železa se po vyprání změnil pouze vnitřní obsah, což může značit, že externě navázané železo nemusí být odstraněno pomocí většiny pracích metod.

Tabulka 5: Přehled pracích postupů používaných k úpravě lidských vlasů před analýzou (souhrn literatury)

Literatura	Analýza	Činidlo	Postup praní
Salmela a kol., 1981	AAS: Cd, Cu, Fe, Mn, Zn	Aceton	Aceton (30 ml, 20 min) → promytí (deionizovaná voda – DIW)
		Triton X-100	Hexan (30 ml, 20 min) → sušení → 1% Triton X-100 (30 ml, 20 min) → promytí (DIW)
		SLS	Hexan (30 ml, 20 min) → sušení → 1% SLS (30 ml, 20 min) → promytí (DIW)
		EDTA	Hexan (30 ml, 20 min) → sušení → 1% EDTA (30 ml, 20 min) → promytí (DIW)
Mattera a kol., 1981	AAS: Cu, Zn	HNO ₃	0,125% HNO ₃ (200 ml) → promytí
		SDS	5% SDS (w/v) (200 ml) → promytí
		SDS/EDTA	5% SDS (w/v) + 1,25% EDTA (200 ml) → promytí
Borella a kol., 1996	ETA-AAS: Ca, Cd, Cr, Cu, K, Mg, Pb, Se, Zn	Triton X-100	1% Triton X-100 (1x, 30 min) → filtrace → promytí (dvakrát destilovaná voda – DDW)
		SLS	1% SLS (1x, 1,30 min) → filtrace → promytí (DDW)
		EDTA	5% EDTA (1x, 1,30 min) → filtrace → promytí (DDW)
		Aceton, methanol	Aceton : methanol (1:1) (4x, každý 20 min) → filtrace → promytí (DDW)
		IAEA procedura	Aceton (10 min), 3x DDW (3x, 10 min), aceton (10 min) → filtrace → promytí (DDW)
		Ultrazvuk	DDW v UZ lázni (4x, 5 min) → filtrace → promytí (DDW)
LeRoy, 1986	AAS: Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Zn	Destilovaná voda (DW)	DW (třepání, 10 min) → 2x promytí v DW (500 ml) → 2x promytí v tekoucí DW (1 min)
		DW	DW (třepání, 30 min) → 2x promytí v DW (500 ml) → 2x promytí v tekoucí DW (1 min)
Chyla a Zyrnicki, 2000 (psí srst)	ICP-OES: Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Ti, V, Zn	DIW	DIW (300 ml, 20 min) → 1x oplach DIW
		IAEA procedura	3x aceton, 1x DIW, 1x aceton (300 ml, 20 min) → 1x oplach DIW
		Methanol	methanol (300 ml, 20 min) → 1x oplach DIW
		EDTA	0,05 mol · l ⁻¹ EDTA (300 ml, 20 min) → 1x oplach DIW
		Triton X-100	1 % Triton X-100 (300 ml, 20 min) → 1x oplach DIW

Sen a Chaudhuri, 2001	FAAS: Pb	DW	DW (30 min)
		Aceton/methanol	aceton a methanol (1:1) (30 min)
		Neionogenní detergent/aceton	1% roztok neionogenního detergentu (Extran MA01) + DW + aceton (30 min)
Morton a kol., 2002	ICP-MS: As, Cd, Cr, Cu, Pb, Sb, Se	IAEA procedura	aceton, DIW, aceton
		DIW	DIW (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		SLS	1% (v/v) SLS (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		Triton X-100	1% (v/v) Triton X-100 (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		Triton X-100	1% (v/v) Triton X-100 (3 ml, třepání 3 h) s organickým oplachem (isopropanol) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		EDTA	1% (w/v) EDTA (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		Isopropanol	isopropanol (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		HNO ₃	0,1% (v/v) HNO ₃ (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		HCl	0,1 mol · l ⁻¹ HCl (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
		Šampon	komerční šampon bez sloučenin Se (3 ml, třepání 3 h) → 2x DIW (4,5 ml, třepání, 3 h)
Rashed a Soltan, 2005 (zvířecí srst)	AAS: Cd, Co, Fe, Mn, Ni, Pb	IAEA procedura	vícenásobné oplachování acetonem a DDW
Li a kol., 2008	ICP-MS: Hg	EDTA	0,1% (w/w) EDTA (2 ml, 1 hod UZ) → 3x opakování → DIW (2 ml, 1 hod UZ)
		L-cystein	0,2% (w/v) L-cystein (2 ml, 1 hod UZ) → 3x opakování → DIW (2 ml, 1 hod UZ)
		2-merkapt ethanol	0,1% (v/v) 2-merkapt ethanol (2 ml, 1 hod UZ) → 3x opakování → DIW (2 ml, 1 hod UZ)
Hawkins a Ragnarsdóttir, 2009 (ovčí vlna)	ICP-OES: Cu, Mn, Zn	Decon 90/aceton	1% (v/v) Decon 90 → DIW → aceton → DIW
		Decon 90/aceton	1% (v/v) Decon 90 + aceton (1:1) → DIW → 1% (v/v) Decon 90 + aceton (1:1) → DIW
		Decon 90/aceton	Aceton → DIW → 1% (v/v) Decon 90 → DIW → 0,1 mol · l ⁻¹ HCl (1 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)
		Decon 90/aceton	Aceton → DIW → 1% (v/v) Decon 90 → DIW → 1% (w/v) EDTA (1 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)
		EDTA	1% (w/v) EDTA → DIW → 1% (w/v) EDTA (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)

Hawkins a Ragnarsdóttir, 2009 (ovčí vlna)	ICP-OES: Cu, Mn, Zn	HCl	0,1 mol · l ⁻¹ HCl (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)
		Aceton	DIW → aceton (3x 10 min míchání) → DIW (3x 10 min míchání)
		Aceton	Aceton → DIW → 1% (v/v) Decon 90 → DIW
		HCl	0,1 mol · l ⁻¹ HCl (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání) → aceton → DIW
		Aceton/HCl	Aceton → DIW → 0,1 mol · l ⁻¹ HCl (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)
		EDTA	1% (w/v) EDTA (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)
		HNO ₃	0,1 mol · l ⁻¹ HNO ₃ (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání) → aceton → DIW
		Aceton/EDTA	Aceton → DIW → 1% (w/v) EDTA (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)
		DIW	2x DIW (1 hod třepání)
		Decon 90	1% (v/v) Decon 90 → DIW → 1% (v/v) Decon 90 → DIW
		EDTA/Decon 90	1% (w/v) EDTA (3 hod třepání) → DIW (1 hod třepání) → 1% (v/v) Decon 90 → DIW
		EDTA/HCl	1% (w/v) EDTA (3 hod třepání) → DIW (1 hod třepání) → 0,1 mol · l ⁻¹ HCl (3 hod třepání) → DIW (1 hod třepání)
		Decon 90/HCl	1% (v/v) Decon 90 → DIW → 0,1 mol · l ⁻¹ HCl (3 hod třepání) → DIW (1 hod třepání)
		Ethylether/EDTA	Ethylether + aceton (3:1) → sušení (15 min, 50 °C) → 5% (w/v) EDTA (1 hod třepání) → DIW (3x 10 min míchání)
SLS	1% (w/v) SLS (3 hod třepání) → 2x DIW (1 hod třepání)		
Kempson a Skinner, 2012	ToF-SIMS: Na, K, Ca, Mg a Fe	IAEA procedura	aceton (10 min), 3x DW (10 min), aceton (10 min)
		Triton X-100	2% Triton X-100 (30 min) → 3x oplach DW (10 min)

DIW – deionizovaná voda, DW – destilovaná voda, DDW – dvakrát destilovaná voda, UZ – ultrazvuk

1.3.2.2 Metody rozkladu vzorku před analýzou

Před samotnou analýzou je nutné vzorek upravit na podobu vhodnou pro následující instrumentální techniku, což je většinou roztok. Toho můžeme docílit rozkladem vzorku na suché cestě, na mokré cestě či mikrovlnným rozkladem. V literatuře jsou k prvkové analýze vlasů/srstí používány všechny tyto rozkladné postupy v různých modifikacích (Aydin, 2008).

K **rozkladu na suché cestě** lze použít elektrickou pec. Aydin (2008) vzorky zpopelňoval v porcelánovém kelímku za vysoké teploty (až 370 °C) po dobu 2 hodin. Získaný popel se následně za zahřívání rozpouští v HNO₃. Chandola a Lordello (1981) využili muflovou pec, kde vzorek zpopelňovali v platinovém kelímku při 300 °C po dobu jedné hodiny, poté na 4 hodiny teplotu zvýšili na 450 °C. Popel dále rozpustili v HNO₃. Salmela a kol. (1981) vzorky rozkládali na suché cestě při 450 °C a následně je rozpouštěli ve 2 mol · l⁻¹ HNO₃.

Jako nejlepší pro **mokrý rozklad** se dle Aydina (2008) jeví směs HNO₃ a H₂O₂ v poměru 2:1 (HNO₃ : H₂O₂) při teplotě 110 °C a minimální době rozkladu 40 minut. Tyto dvě reagenty používali k rozkladu koňských žíní i Asano a kol. (2002) avšak každou zvlášť. Nejprve žíně rozkládali v HNO₃ po dobu 24 hodin, poté přidali další část HNO₃ a směs zahřívali. Nakonec přidali H₂O₂ a směs opět zahřáli. Sreenivasa Rao a kol. (2002) zkoušeli různé podmínky pro přípravu vzorku, jako je: teplota, délka doby rozkladu nebo poměr kyseliny a peroxidu. Zjistili, že rozklad probíhá beze zbytku v teplotním rozmezí od 120 do 200 °C. Proto byla v této studii teplota udržována na 150 °C. Doba rozkladu byla testována od 15 do 60 minut, po intervalech 15 minut. 30 minut postačovalo pro kompletní mineralizaci vzorku. Složení směsi kyselin bylo optimalizováno na poměr 2 : 1, 2 díly HNO₃ a 1 díl H₂O₂. Navýšení objemu peroxidu na poměr 1 : 1 nemělo na mineralizaci žádný vliv. Rashed a Soltan (2005) zvířecí srst rozkládali v ohřáté směsi HNO₃ : HClO₄ : H₂SO₄ (8 : 1 : 1). Chyla a Zyrnicki (2000) psí srst rozkládali pomocí varu v HNO₃, po ochlazení přidali 2x podíl H₂O₂ a směs byla opět přivedena k varu. Mineralizát následně odpařili na 1 ml, ochladili a zředili deionizovanou vodou.

Sen a Chaudhuri (2001) k rozkladu lidských vlasů používali směs kyseliny dusičné a chloristé bez uvedení poměru. Směsí HNO₃ a HClO₄ (3:1) rozkládal vzorky vlasů LeRoy (1986), kdy nechal vzorky se směsí 30 minut reagovat. Poté je 30 minut zahříval na 95 °C a přes noc je nechal zahřívát na 210 °C. Borella a kol. (1996) také rozkládali vlasy v zahřáté směsi HNO₃ a HClO₄ (2:1) a po rozkladu se vzorky 30 minut vařily se zředěnou HCl (1:9).

Metody rozkladu na suché i mokré cestě jsou časově náročné a komplikované. Rozklad za **použití mikrovlnného pole** má mnoho výhod a v publikacích se často používá. Poskytuje jednodušší, rychlejší, čistší a efektivnější způsob přípravy vzorku. Navíc je vzorek v uzavřeném systému, tudíž je zabráněno vnějším kontaminacím a ztrátám prvků v důsledku odpařování (Aydin, 2008). Pro mikrovlnnou mineralizaci Aydin (2008) standardizoval následující postup: vzorek byl rozložen pomocí 3 ml HNO₃ a 2 ml H₂O₂ v mikrovlnném mineralizátoru. Teplotní program se skládal ze tří kroků: 8 minut při 130 °C, 5 minut při 155 °C a 12 minut při 170 °C. Všechny kroky byly prováděny při výkonu 80 W. Morton a kol. (2002) k mikrovlnnému rozkladu použili směs HNO₃ a H₂O₂ (2:1). Rozkladný program se skládal ze 6 kroků: 5 minut (při 250 W), 2 minuty (0 W), 5 minut (400 W, 2 minuty (0 W), 5 minut (600 W) a následně 10 minut ponechat přístroj větrat s otevřenými dvířky.

1.3.3 Prvková analýza

V publikacích zabývajících se prvkovou analýzou vlasů či srstí je k analýze využívána celá řada metod. Nejčastěji jsou používány metody ICP-OES, ICP-MS a AAS s elektrotermickou atomizací i s atomizací v plameni a řada dalších (Aydin, 2008).

Atomová absorpční spektrometrie je v oblasti anorganické prvkové analýzy nejrozšířenější metodou. Základním principem metody je absorpce elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Pomocí AAS lze stanovit až 68 prvků v koncentracích od desetin g · l⁻¹ až po koncentrace nižší než 1 µg · l⁻¹. AAS je spojována s atomizací v plameni (FAAS), kde je roztok převeden na aerosol ve zmlžovači a aerosol vnášen do plamene. Atomizace může probíhat i v elektrotermickém atomizátoru ETAAS, což je zařízení vyhřívané na danou teplotu pomocí elektrického proudu. AAS nachází uplatnění v mnoha odvětvích prvkové analýzy – analýza životního prostředí, kontrola jakosti, klinická analýza, geologie, výzkum materiálů a mnoho dalších. Díky velmi malé spotřebě vzorku je ETAAS v praxi nenahraditelná pro stopovou a ultrastopovou analýzu malých vzorků. V současné době je AAS často nahrazována metodou ICP-OES (Černohorský a Jandera, 1997; Klouda, 2003).

ICP-OES umožňuje stanovit téměř všechny prvky periodické tabulky. K výhodám metody patří multielementární analýza, rychlost analýzy, široký dynamický rozsah (5 – 6 řádů koncentrací), nízký vliv nespektrálních interferencí, dobrá reprodukovatelnost a dosahované

detekční limity (až setiny $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Nevýhodou je značná spotřeba argonu, z ekonomického hlediska se vyplatí pro větší série vzorků a pro analýzy multielementárního charakteru (Černohorský a Jandera, 1997).

Běžně používanou technikou pro analýzu stopových a zejména ultrastopových prvků je **ICP-MS**. Výhodou metody je nízká spotřeba vzorku, rychlost, vysoká citlivost, lineární rozsah ve velkém rozsahu koncentrací (až 6 řádů), multielementárnost či možnost sledování izotopických poměrů. Nevýhodou může být instrumentální náročnost, tedy i vysoké provozní a pořizovací náklady. Problémem je menší tolerance k vyšším obsahům solí a rozpouštědel a také celá řada vlivů matrice (spektrální a nespektrální). Detekční limity ICP-MS jsou velmi nízké, řádově desetiny $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ až $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ (Černohorský a Jandera, 1997).

V některých studiích je k analýze využívána metoda **PIXE** (Particle Induced X-ray Emission), která pro analýzu využívá rentgenové záření vznikající při bombardování vzorku urychlenými nabitými částicemi. K bombardování se jako budící částice v praxi využívají protony. Detekční limit metody je prakticky stejný pro všechny analyzované elementy, kolem $1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (Černohorský a Jandera, 1997).

1.3.4 Referenční hodnoty

Určení referenčních hodnot prvků ve vlasech není jednoduché. Je nutné zohlednit řadu faktorů, jako je pohlaví, věk, rasa, barva vlasů, kosmetické ošetření vlasů, geografická lokalita a mnoho dalších. Bez celosvětově uznávaných referenčních hodnot prvkové analýzy vlasů nemůže být prvková analýza spolehlivou a užitečnou metodou pro hodnocení nutričního stavu osob. Absence těchto referenčních hodnot vedla Mikulewicze a jeho kolektiv k provedení obsáhlé rešerše dostupné literatury: vybrané studie uváděly referenční meze pro makroelementy, mikroelementy, toxické prvky a ostatní prvky. Jednotlivé práce se lišily v přípravě vzorků před analýzou, v rozkladu vzorků a v samotné analýze (ICP-OES, ICP-MS). Z těchto důvodů se hodnoty uváděné různými laboratořemi značně lišily. Dle autorů je nezbytné metodu minerální vlasové analýzy standardizovat a validovat. Jenom v tom případě pak bude možné poskytnout smysluplné referenční hodnoty a využít tak prvkovou analýzu jako diagnostický nástroj v lékařství (Mikulewicz a kol., 2013).

Na menším počtu subjektů Chojnacka a kol. (2010) určili referenční hodnoty pro obsahy 36 prvků v lidských vlasech. Pro studii byla vybrána populace polských studentů ve věku 21-22 let, jednalo se o 41 mužů a 76 žen. Celkem bylo získáno 117 vzorků vlasů, které byly rozloženy mikrovlnným rozkladem pomocí kyseliny dusičné. Detekce makroprvků proběhla na ICP-OES, mikroelementy a stopové prvky byly stanoveny pomocí ICP-MS. Za referenční rozsahy byly považovány hodnoty mezi 10. a 90. percentilem. Byly porovnány rozdíly mezi pohlavími a u žen také rozdíly mezi barvenými a nebarvenými vlasy. Souhrn referenčních mezí prvků v lidských vlasech ze současně dostupné literatury je uveden v Tabulce 6.

Tabulka 6: Referenční hodnoty pro hladiny prvků v lidských vlasech [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]

	Referenční meze		Počet	♂♀	Zdroj		Referenční meze		Počet	♂♀	Zdroj
Al	2,4	20,0	412	Ž/M	3	Mg	7,4	72,9	411	Ž/M	3
	0,01	12,75	131	Ž/M	4		6	24	655	Ž/M	1
	3	16	655	Ž/M	1		8,67	65,3	218	Ž	2
As	0,14	0,24	263	Ž/M	3	44,4	183,2	76	Ž	6	
	0,0003	0,03	130	Ž/M	4	31,6	106,4	41	M	6	
	0,05	0,20	655	Ž/M	1	Mn	0,04	0,77	378	Ž/M	3
	0,0011	0,016	167	Ž/M	5		0,002	0,91	133	Ž/M	4
Ba	0,18	2,70	130	Ž/M	4		0,10	0,60	655	Ž/M	1
	0,10	0,70	655	Ž/M	1		0,03	0,75	167	Ž/M	5
	0,849	4,963	76	Ž	6	0,464	1,144	76	Ž	6	
	0,379	1,894	41	M	6	0,436	0,829	41	M	6	
Bi	0	0,10	655	Ž/M	1	Mo	0,04	0,98	195	Ž/M	3
Ca	120	365	655	Ž/M	1		0,0001	1,78	135	Ž/M	4
	160	1460	218	Ž	2		0,04	0,10	655	Ž/M	1
	1255	4542	76	Ž	6		0,024	0,19	167	Ž/M	5
	625	2229	41	M	6	Na	2	123	218	Ž	2
Cd	0,04	0,61	168	Ž/M	3	Ni	0,07	3,40	263	Ž/M	3
	0,0004	0,16	132	Ž/M	4		0,036	1,75	131	Ž/M	4
	0,01	0,20	655	Ž/M	1	P	96	299	412	Ž/M	3
	0,0003	0,0128	167	Ž/M	5		108	173	218	Ž	2
Co	0,03	2,95	137	Ž/M	3	Pb	1,0	19,8	358	Ž/M	3
	0,01	1,20	136	Ž/M	4		0,28	3,03	129	Ž/M	4
	0,01	0,02	655	Ž/M	1		< 3	655	Ž/M	1	
	0,001	0,017	167	Ž/M	5		0,008	0,34	167	Ž/M	5
Cr	0,08	4,56	160	Ž/M	3	Sb	0,0002	0,11	135	Ž/M	4
	0,001	0,48	131	Ž/M	4		0,0003	0,02	167	Ž/M	5
	0,20	0,90	655	Ž/M	1	Se	0,30	1,51	327	Ž/M	3
Cu	7,2	82,7	412	Ž/M	3		0,13	1,28	134	Ž/M	4
	9,1	59,7	135	Ž/M	4		0,50	1,00	655	Ž/M	1
	8	36	655	Ž/M	1		0,03	0,20	167	Ž/M	5
	10,1	46,6	218	Ž	2	Si	23,1	149,7	76	Ž	6
	8,9	50,9	76	Ž	6		16,0	61,6	41	M	6
	8,5	16,1	41	M	6	Sr	0,31	3,65	186	Ž/M	3
Fe	5,9	36,8	408	Ž/M	3		1,11	12,72	132	Ž/M	4
	7	21	655	Ž/M	1		1,83	10,7	76	Ž	6
	3,66	17,3	218	Ž	2		0,73	4,21	41	M	6
Hg	0	1	655	Ž/M	1	V	0,04	4,13	156	Ž/M	3
	0,009	0,42	167	Ž/M	5		0,001	0,21	132	Ž/M	4
K	22,5	89,5	76	Ž	6		0,04	0,13	655	Ž/M	1
	32,3	133,4	41	M	6	Zn	64	228	411	Ž/M	3
La	0,216	1,28	76	Ž	6		96,86	329,19	130	Ž/M	4
	0,0848	0,574	41	M	6		30	130	655	Ž/M	1
Li	0,001	0,56	131	Ž/M	4		150	327	218	Ž	2
	0,01	0,02	655	Ž/M	1						

Zdroje: 1 - Park a kol. (2007); 2 - Vanaelst a kol. (2012); 3 - Senofonte a kol. (2000); 4 - Dongarrà a kol. (2011); 5 - Carneiro a kol. (2011); 6 - Chojnacka a kol. (2010)

1.3.5 Vypovídací schopnost komerčně nabízených analýz

Mezi tradičními lékaři není prvková analýza vlasů příliš oblíbená. Analýza je považována za nespolehlivou a nevhodnou pro hodnocení nutričního stavu pacientů. V oblasti monitorování expozice organismu těžkými kovy má určitou hodnotu. Americká lékařská asociace (*American Medical Association Committee on Cutaneous Health and Cosmetics*) v roce 1974 uvedla, že fyzikální a chemický stav vlasů nemusí zcela souviset se zdravotním stavem organismu. Použití multielementární analýzy vlasů jako jediného diagnostického prostředku porušuje zásady lékařské praxe. Laboratorní nálezy by měly být posuzovány společně s historií a fyzikálními nálezy pacienta. Lékař by měl také mít na paměti výskyt laboratorních chyb. Z těchto mnoha důvodů není prvková analýza vlasů považována za spolehlivou techniku pro identifikaci hladiny prvků v lidském těle. Neposkytuje ani platný podklad pro jakékoliv doporučení užívání vitamínů, minerálů a doplňků stravy (Barrett, 1985).

Barrett (1985) ve své práci popisuje experiment, který měl dokázat, zda je komerčně nabízená analýza vlasů spolehlivá. Vzorky vlasů byly odebrány od dvou zdravých dívek ve věku 17 let a byly promyty 20x vodou z vodovodu. Poté byly usušeny, rozstříhány a promíchány. Vzorky byly dále připraveny podle specifických instrukcí každé ze 13 laboratoří komerčně nabízejících analýzu vlasů a zaslány do laboratoří pod falešnými jmény. Tento postup byl zopakován o tři týdny později s použitím jiných jmen. Cena jedné analýzy se pohybovala od 17 do 40 amerických dolarů (průměrně 26,8 dolarů). Celkově bylo získáno 52 výsledkových zpráv. Uváděné hladiny látek pro jeden vzorek se mezi jednotlivými laboratořemi velmi lišily, u některých prvků až desetinásobně. I kdyby byly naměřené hladiny správné, interpretace byla stále obtížná. Mezi jednotlivými laboratořemi se velmi lišily rozmezí „normálních“ hladin prvků. Stejná hladina byla u jedné laboratoře považována za nízkou, u jiné za normální a u další za vysokou. Také navrhované doplňky stravy byly značně odlišné – směsi různých vitamínů, minerálů, enzymů či extrakty ze zvířecích orgánů. Počet doporučených doplňků stravy byl průměrně 6, s množstvím denní dávky lišící se od 2 až do 46 dávek (průměrně 18). Dle Barretta je užití vlasové analýzy nevědecké, ekonomicky nevhodné a pravděpodobně i nezákonné.

Seidel a kol. (2001) zmapovali situaci v oblasti prvkové analýzy vlasů ve Spojených státech amerických v roce 2001. V USA bylo průměrně prováděno 225000 prvkových analýz vlasů ročně za celkem 9,6 milionů dolarů v 9 laboratořích. Bylo vybráno 6 laboratoří, které zajišťovaly 90 % prováděných analýz v USA. Chemicky neošetřené, hnědé vlasy byly

získány od zdravé, 40leté ženy se světlou pletí. Byly upraveny dle požadavků konkrétních laboratoří a odeslány k analýze. Mezi výsledky jednotlivých laboratoří byly velké rozdíly. Obsahy arsenu, rtuti a hliníku byly laboratořemi označeny jako zvýšené, rizikové, s možným původem ze životního prostředí a bylo doporučeno opakované testování. Dárkyně vlasů měla údajně zvýšené riziko různých nemocí jako je nedostatečnost nadledvin, anémie, kardiovaskulární onemocnění, porucha produkce insulínu, pasivně agresivní chování a podobné. Nicméně nebyl objeven žádný klinický důkaz, který by potvrzoval přítomnost zdravotních problémů. Vlasová analýza je podle autorů nespolehlivá. V publikaci autoři doporučují upustit od používání této analýzy k hodnocení nutričního stavu jedince nebo při podezření na znečištění životního prostředí. Dále poukazují na problémy s certifikací a řízením jakosti těchto laboratoří.

Obdobnou studii spolehlivosti prvkové analýzy provedli v Německu v roce 2002 Drasch a Roider. Do 6 německých a jedné americké laboratoře, které komerčně nabízely prvkovou analýzu vlasů, byly poslány vzorky vlasů od dvou dobrovolníků. O šest týdnů později byly do stejných laboratoří poslány identické vzorky od prvního dobrovolníka. Tímto postupem bylo hodnoceno intra-laboratorní porovnání. Každá laboratoř detekovala rozdílný počet prvků. Dohromady bylo stanoveno 50 prvků, z čehož 23 prvků bylo detekováno všemi sedmi laboratořemi. Celkově bylo získáno 20 výsledků, jeden ze vzorků se pravděpodobně ztratil při transportu. Studie byla vedena anonymně, jako by o analýzu žádali sami pacienti. Do laboratoří nebyl zaslán žádný certifikovaný referenční materiál, proto nebylo možno určit, která laboratoř měřila správně. Porovnání vlasů pocházejících od jedné osoby odhalilo, že pouze jedna laboratoř zařadila prvky z obou analýz do stejné kategorie (tedy pod, vně nebo nad normální hladinou). Ostatní laboratoře zařadily 4 až 7 prvků podruhé jinak než poprvé. Porovnání mezi laboratořemi bylo hodnoceno na základě výsledků obou dobrovolníků. Vzorek od dobrovolníka č. 1 měl alespoň 6 ze 23 prvků v přijatelném rozmezí ($\pm 30\%$) od průměru hodnot všech 7 laboratoří. Pouze 3 prvky byly identicky hodnoceny všemi 7 laboratořemi. Vzorek od dobrovolníka č. 2 měl v přijatelném rozmezí pouze dva prvky. Autoři konstatovali, že neexistuje vzájemná srovnatelnost výsledků laboratoří pro převážnou většinu sledovaných prvků a tyto výsledky nemohou být považovány za platné. Studie víceméně souhlasí s předchozí studií Seidelové (2001) a potvrzuje, že vlasová analýza těchto laboratoří je velmi nespolehlivá. Také doporučuje upustit od používání takovýchto analýz (Seidel a kol., 2001; Drasch a Roider, 2002).

Frisch a Schwartz (2002) popisují úskalí vlasové analýzy v klinické praxi na třech na sobě nezávislých případových studiích. Tři pacienti přišli na kliniku po obdržení diagnózy intoxikace kovy, založené na výsledcích vlasové analýzy. Lékaři diagnostikovali nespecifické, multisystémové příznaky. Celková anamnéza, prostředí ani fyzické prohlídky pacientů nenaznačovaly, že by za příčinou příznaků mohla být intoxikace kovy. Jeden nebo více prvků, které byly ve vlasech sledovány, byly podle prohlášení laboratoří zvýšené. Díky těmto výsledkům pacienti věřili, že trpí intoxikací kovy, ačkoliv jí podle lékařských vyšetření ve skutečnosti netrpěli.

První pacientka, se zvýšeným obsahem rtuti ve vlasech, nebyla profesionálně ani environmentálně exponována rtutí a její fyzická prohlídka byla v normě. Diagnóza intoxikace rtutí se obvykle stanovuje z krve nebo moči. Pacientka měla obsah rtuti v krvi $11 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, což spadá do normálního rozmezí hladin rtuti v krvi, které je od 5 do $20 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Pacientka č. 2 měla také obavy, že trpí intoxikací rtutí a začala samovolně užívat chelatační terapii ve formě tablet, určených k detoxikaci organismu. Pacientka si také nechala odstranit 12 amalgámových zubních výplní. Bylo zjištěno, že vysoké hladiny rtuti v těle pacientky jsou zapříčiněny nadměrnou konzumací ryb, které jedla 6x týdně. U osob, které konzumovaly ryby více než 4x týdně byla průměrná celková hladina rtuti $44 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, což koresponduje v hladinou rtuti v těle pacientky č. 2. Pacientce bylo doporučeno snížit příjem ryb na jednu porci za týden a podstoupit opakované měření za 1 až 2 měsíce. Pacient č. 3 na doporučení, založené na výsledcích vlasové analýzy, podstupoval 2,5 roku chelatační léčbu pro snížení olova v organismu. Fyzikální vyšetření pacienta bylo v normě a laboratorní výsledky také neprokázaly intoxikaci olovem a nutnost chelatační léčby. Pacient byl vystaven zátěžovému chelatačnímu testu, kdy mu byla sbírána moč za 24 hodin a následně v ní byl stanoven obsah olova. Pacientovy hodnoty nepřesahovaly $22 \mu\text{g}$ olova za 24 h, přitom za zvýšený obsah vylučovaného olova se považují hodnoty $600 \mu\text{g}/24 \text{ h}$. Bylo prokázáno, že pacient i přes vysoké hodnoty olova ve vlasech intoxikací ve skutečnosti netrpí. Společným tématem těchto případů jsou nespolehlivé výsledky analýzy kovů ve vlasech. Jsou ovšem i případy, kdy může být analýza vlasů užitečná. Například při studiu úrovně methylrtuti v populaci či v případě otrav rtutí a arsenem. Je však důležité rozlišovat mezi použitím vlasové analýzy ve výzkumu (kde se analyty měří v definované populaci) a v oblasti prvkové analýzy sloužící ke stanovení diagnózy jednotlivce. Zejména u pacientů, jejichž expoziční historie a symptomy vykazují nízkou pravděpodobnost pro intoxikaci, se často může jednat o falešně pozitivní test. Několik studií

v posledních desetiletích prokázalo omezenou spolehlivost vlasů jako diagnostického nástroje. Lékaři by v diagnostice intoxikací kovy neměli spoléhat pouze na vlasovou analýzu. Tyto testy jsou nespolehlivé a nemají pevně stanovené referenční meze (Frisch a Schwartz, 2002).

V České republice prvkovou analýzu vlasů komerčně nabízí několik firem, které ovšem pouze interpretují data polské laboratoře Biomol-MED, kam vzorky zasílají k ICP-OES analýze. MUDr. Jaroslav Orlík, odborný zástupce laboratoře Biomol-MED pro Českou republiku, na svých webových stránkách uvádí, že se analýzou vlasů zabývá od roku 2001, je certifikovaným účastníkem kurzů analýzy vlasů a má za sebou více než 8000 analýz vlasů. Dle Orlíka (2010) analýza stopových prvků umožňuje určení metabolického typu, zhodnocení biochemických tendencí v organismu, zhodnocení působení stresu na organismus, slouží k doporučení způsobů stravování a suplementace pomocí doplňků stravy. Zároveň uvádí, že se nejedná o zázračnou léčebnou metodu ani diagnostickou metodu u akutních chorob. Cena jedné analýzy prvků ve vlasech včetně lékařské konzultace je 3000 Kč.

Česká webová stránka (komplexnizdravi.cz) nabízí prvkovou analýzu vlasů za 2200 Kč a možnost poradenství za dalších 600 Kč. Výsledky jsou k dispozici do 3 týdnů od zaslání vzorků. Analýza má klientům zajistit zhodnocení metabolismu, zvýšení výkonnosti fyzické i psychické, minimalizaci zdravotních rizik, prevenci většiny onemocnění, zachování zdraví a krásy. Na dalších webových stránkách je prvková analýza nabízena v různých variantách za různé ceny, ale vždy se jedná pouze o odeslání vzorků do výše jmenované polské laboratoře. Autoři webových stránek pak zajišťují interpretaci vyhodnocených dat pacientům a konzultace za příplatek. Také navrhuje možnost suplementace léčivy a doplňky stravy (Analýza stopových prvků ve vlasech, 2017).

1.3.6 Faktory ovlivňující prvkové složení vlasů a srstí

Obsah prvků ve vlasech a srsti je ovlivněn různými faktory, jak biologickými (vnitřními), tak behaviorálními (vnějšími). Věk, pohlaví, barva vlasů/srstí, rychlost růstu, roční období, geografická poloha apod. Také působení různých chemických látek, jako jsou barvy na vlasy, zesvětlovače, šampony, může ovlivňovat hladiny prvků ve vlasech. Sreenivasa Rao a kol. (2002) uvádějí 4 parametry ovlivňující obsah stopových prvků v lidských vlasech: vzdálenost od hlavy (I); věk a pohlaví jedince (II); geografický výskyt jedince (III) a doplňky

stavy spolu s medikací (IV). Podle autorů mohou být faktory I a IV eliminovány pečlivým odběrem vzorku a výběrem zkoumaného subjektu. Výše uvedené faktory musí být při prvkové analýze brány v úvahu, neboť mohou podstatně ovlivnit výsledky a interpretaci dat (Barrett, 1985; Sreenivasa Rao a kol. 2002; Sobańska, 2005).

Dongarrà a kol. (2011) zaznamenali statisticky významné rozdíly obsahu prvků mezi **pohlavími**. Vlasy mladých dívek obsahovaly značně vyšší hladiny Al, Ba, Sr a Zn než vlasy chlapců. Chlapci měli oproti dívkám zvýšené obsahy Cr, Li, R, Sb a U ve vlasech. Zvýšené hladiny Ba, Sr a Zn u dívek mohou být díky modifikaci kostní hmoty a stavby těla, ke kterým dochází v pubertě. Podle všeho mají chlapci, u kterých dochází k pubertě obecně později, menší tělesné zásoby Zn než dívky. Zvýšené hladiny Al u dívek nebyly vysvětleny. Vyšší obsahy stroncia u žen uvádí mimo jiné také Chojnacka a kol. (2010).

Sobańska (2005) ve své práci zkoumala různé faktory, které by mohly významně ovlivnit nutriční stav organismus a prvkové složení srsti: věk, pohlaví, roční období, lokalita a dietní stav testovaných zvířat. Pro pozorování sezónních změn v obsahu kovů v srsti byly vzorky odebrány od divokých prasat a od zvířat ze zoologické zahrady. Z hlediska **faktoru pohlaví** bylo zjištěno, že samice mají nepatrně vyšší hladiny rtuti v srsti než samci. Pro hodnocení **vlivu věku** na prvkové složení srsti byly zkoumané subjekty rozděleny do tří věkových kategorií (věk do 1 roku, 1 – 2 roky a jedinci starší než 2 roky). Mezi všemi věkovými skupinami byly objeveny rozdíly v obsahu rtuti, nejvyšší hladiny pak byly naměřeny u subjektů ve věku 1-2 let. Dalším testovaným faktorem byla **barva srsti**. Červená srst obsahovala vyšší koncentrace rtuti než srst černá. Také se **vzdáleností od těla** se obsah prvku zvyšoval. V koncových částech srsti byly naměřeny nejvyšší koncentrace prvků. Rozdíly v barvě v distribuci kovů v jednotlivých pramenech lze eliminovat pečlivou homogenizací vzorku.

Hawkins a Ragnarsdóttir (2009) zkoumali změny hladin prvků v ovčí srsti se **změnou délky** jednotlivých vláken, tedy i **stářím vzorku**. Zvyšující se koncentrace prvků byly již pozorovány u lidí a divokých prasat, proto se autoři rozhodli zkoumat koncentrace prvků (Cu, Mn, Zn) v ovčí vlně. Vlnu nařezali na 2 cm části od začátku pramene (0-2 cm) až po konečnou část (6-8 cm) a zbytek vzorku delší než 8 cm vyřadili z důvodu možného poškození vzorku „zvětráváním“. Obsah prvků ve vlně se lišil v závislosti na vzdálenosti odebraného vzorku od pokožky, což mohlo souviset s delšími expozicemi vnějších faktorů (špína nebo prach). U prvků Cu a Zn byly pozorovány rozdíly podle **barvy vlny**. U černé vlny byl obsah těchto

prvků vyšší než u vlny bílé. To může být díky tomu, že černé vlasy/srst mají vysoký obsah melaninu, který je známý svou vysokou vazebnou kapacitou ke kovům.

Asano a kol. (2005b) studovali **vliv barvy** na obsah stopových prvků v koňských žíních. Pomocí metody PIXE sledovali hladiny 28 prvků v různě zbarvených žíních, které rozdělili do 3 barevných skupin (světlé, hnědé a černé). Šedé žíně obsahovaly výrazně vyšší hladiny Cu, Ti a Zn. Naopak byly u šedých žíní naměřeny nízké hladiny Br, Ca, Se a Sr v porovnání s žíněmi jiného zbarvení. Nalezené koncentrace odpovídaly obsahům v lidských vlasech a psí srsti. Při interpretaci dat by se mělo přihlížet ke skutečnosti, že barva vlasů, zvláště šedé zbarvení, může ovlivňovat koncentrace některých prvků v koňských žíních.

Szykowska a kol. (2015) se ve své práci zabývali souvislostí mezi **kosmetickým ošetřením vlasů** a obsahem vybraných prvků. Ženy s barvenými nebo zesvětlovanými vlasy mají nižší průměrné hladiny mědi a stroncia. Vyšší hladiny chromu, kobaltu a olova byly naopak objeveny v přírodních vlasech. Produkty k barvení nebo zesvětlování vlasů jsou silně zásadité a mohou porušovat strukturu vlasů. V důsledku těchto poruch může docházet ke ztrátám prvků z vlasové matrix či naopak se některé prvky mohou do vlasu snadněji zabudovat. Rozdíly obsahu prvků ve **vlasech barvených** a nebarvených řešili také Chojnacka a kol. (2010). Statisticky významné rozdíly mezi barvenými a nebarvenými vlasy byly objeveny pro prvky Ba, Ca, Cu, K, La, Mg, Si, Sr a Ti.

1.4 Spojitost s onemocněním

Prvky přítomné v lidském těle hrají důležitou roli v životních procesech. Esenciální prvky jako je vápník, chrom, měď, draslík, hořčík, sodík a zinek tvoří základ mnoha enzymů, podporují nervová spojení a kontrakce svalů. Nedostatek těchto prvků nebo jejich zvýšené vylučování může vést k mnoha zdravotním problémům. Dalším problémem pro tělo mohou být toxické prvky, jako jsou hliník, arsen, kadmium, rtuť a olovo, které mají cytotoxické, mutagenní a karcinogenní účinky. Mnoho autorů popisuje vzájemný vztah mezi minerálním složením vlasů a fyzickými nebo psychickými poruchami. Zároveň konstatují, že odhalení minerální nerovnováhy ve vlasech by mohlo být užitečným nástrojem pro diagnózu mnoha chorob. Hladiny prvků v krvi jsou spojovány s různými nemocemi, jako například hořčík s depresemi nebo kadmium s vysokým krevním tlakem. Kovy jsou zapojeny do procesů spojených

s výskytem a progresí onemocnění, jako je například role selenu a olova ve vývoji karcinomu prsu. Podobně mají koncentrace zinku vliv na aterosklerózu, skrze buněčnou regulaci a expresi. (Kempson a Lombi, 2011; Wołowiec a kol., 2013).

Prvková analýza vlasů jako možný diagnostický nástroj byla hodnocena v souvislosti s různými onemocněními. Wołowiec a kol. (2013) uvedli systematický souhrn celkem 66 studií, kde většina autorů konstatuje, že existuje korelace mezi hladinou prvků ve vlasech a výskytem některých nemocí. Výsledky studií se poměrně liší. Tyto rozdíly mohou být díky rozdílům v počtu testovaných jedinců, pohlaví, věku, díky metodám přípravy vzorku nebo různými metodami analýzy. Proto je třeba tyto metody standardizovat, především postup praní vzorku, jeho rozklad a metodu detekce prvků (Wołowiec a kol., 2013).

1.4.1 Rakovina

Joo a kol. (2009) porovnávali hladiny 17 minerálů ve vlasech pacientek s **rakovinou prsu** vůči zdravým kontrolám. Pacientky s rakovinou měly nižší hladiny Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn a Pb. Naopak hladiny As, Na a K měly vyšší než zdravé ženy. Suzana a kol. (2008; 2009) vedli několik studií zaměřených na roli selenu ve vývoji karcinomu prsu. U pacientek s karcinomem prsu byl detekován snížený obsah selenu oproti zdravým pacientkám. Kilic a kol. (2004) u pacientů s rakovinou prsu ve třetím stádiu objevili významně zvýšené hladiny chromu a snížené hladiny manganu. Benderli Cihan a kol. (2011) sledovali 36 prvků ve vlasech pacientek ve třetím stádiu rakoviny prsu. Pacientky měly významně vyšší hladiny As, B, Cd, Ce, Co, Cs, Mn a Sb, zatímco zdravé ženy měly značně vyšší hladiny Ag, Au, Ba, Be, Ca, Ga, Ni, Pb, Se a Zn. Podle autorů této studie by mohla být prvková analýza vlasů potenciálně využívána jako diagnostický marker rakoviny prsu.

Borella a kol. (1997) zkoumali hladiny selenu, zinku, mědi u žen s rakovinou prsu a u mužů s **rakovinou plic**. Výsledky však neodhalily žádné významné rozdíly mezi obsahem prvků u pacientů a u kontrol. Pasha a kol. (2010) u pacientů s **rakovinou gastrointestinálního traktu** objevili zvýšené hladiny Zn, Fe, Pb, Cu a Cd. Yasuda a kol. (2009) měřili koncentrace 24 minerálů ve vlasech pacientů trpících **různými formami rakoviny** (např. prsu, střeva, žaludku, prostaty, plic a dalších). Pro porovnání byly použity vlasy zdravých jedinců. Bylo zjištěno, že hladiny I, As, Zn a Na pozitivně korelovaly s rakovinou. Oproti tomu hladiny

Se, Mn a V korelovaly negativně. Kromě toho hladiny arsenu byly znatelně vyšší u lidí s rakovinou než u zdravých lidí.

Cho a kol. (1997) porovnávali hladiny 11 prvků ve vlasech lidí žijících ve velkých městech, na venkově, lidí pracujících ve sklárně a **pacientů s rakovinou**. Pacienti s rakovinou měli vyšší hladiny I a nižší hladiny Ca, Zn, Br a Mn. Lidé žijící ve městě měli zvýšené hladiny prvků Ca, Mg, Zn, Cu, Na, Br, Mn, I a S v porovnání s lidmi žijícími na venkově. Na druhou stranu vlasy lidí z venkovských oblastí obsahovaly více Al a As. U zaměstnanců skláren byly ve vlasech detekovány vysoké hladiny Al, Mn, As, Mg a Zn.

Czerny a kol. (2014) porovnávali hladiny prvků ve vlasech u skupin lidí s různou formou rakoviny. U skupiny s **rakovinou závislou na hormonech** byly zvýšeny prvky K, Al, Hg, Ca, Na, Mo oproti kontrole. Naopak sníženy byly hladiny prvků B, Cu, Fe, Se, Ge, Mg, Cr, Mn a Zn. Další testovanou skupinou byli pacienti, kteří mají **rakovinu s vysokou glykolýzou** (mozkové nádory, rakovinu lymfatického systému a leukémii). Zvýšené byly hladiny prvků Al, Cd, K, Hg, Na, Pb, Mo, V a P. Sníženy byly hladiny prvků Mg, Ge, Se, B, Cu, Ca, Fe, Zn. V případě toxických prvků studie zaznamenala statisticky významné rozdíly v koncentracích hliníku, olova, kadmia, mědi a boru. Třetí skupinou byli pacienti s **rakovinou trávicího systému** (rakovina jater, slinivky, střeva a plic). U nich byly zvýšené prvky: Al, Hg, K, Na, V, Ca, Cd, Pb a Mo. Oproti tomu byly snižené prvky: Se, Zn, Mg, B, Fe, Ge, Cu a Cr. Ve všech testovaných skupinách je statisticky významně snížena hladina selenu. Tato zjištění je v souladu s výsledky Kolachiho a jeho kolektivu (2012), kteří publikovali snížené hladiny selenu v krvi, séru i vlasech u pacientů s rakovinou jater. Dá se tedy konstatovat, že selen by mohl být zahrnut do léčby rakoviny trávicího traktu.

1.4.2. Diabetes mellitus

Afridi a kol. (2008a) zaznamenali významně vyšší hladiny Pb, Cd a As ve vlasech mužů s onemocněním **diabetes mellitus** (DM). Pacienti, kuřáci s cukrovkou, měli vyšší hladiny Pb, Cd a As než porovnávaná skupina nekuřáků se stejným onemocněním. Stejný trend se objevil i při porovnání kuřáků a nekuřáků bez onemocnění cukrovkou. Pacienti s DM ve studii Kazi a kol. (2008a) měli značně nižší hladiny Zn, Mn a Cr a naopak vyšší hladiny Cu a Fe oproti zdravé kontrolní skupině.

Afridi a kol. v další studii (2008b) porovnávali obsah prvků mezi jednotlivými druhy diabetes mellitus. Do studie byli zahrnuti pacienti s onemocněním DM s vysokým krevním tlakem a DM s normálním krevním tlakem. Značně nižší hladiny K, Mg a Ca byly nalezeny u obou typů DM oproti zdravé kontrole. Hladiny sodíku byly významně vyšší u obou typů pacientů s DM než u kontrol.

1.4.3 Krevní tlak

Afridi a kol. (2010) porovnávali hladiny Cd, Ni, Pb a Zn ve vlasech pacientů s **vysokým krevním tlakem**, kteří byli dále rozděleni na kuřáky a nekuřáky. Kontrolní vzorky poskytlí zdraví jedinci (kuřáci a nekuřáci). Hladiny Cd, Ni a Pb byly výrazně zvýšeny, zatímco hladiny Zn byly značně nižší u obou skupin s vysokým tlakem oproti zdravé kontrole. V jejich předchozí studii (Afridi a kol., 2006) měli pacienti značně vyšší hladiny Ni, Cd, Cu, Cr a Pb ve vlasech než porovnávaná kontrola, zatímco hladiny Fe a Zn byly u těchto pacientů nižší.

Vztah stravovacích návyků, obsahu minerálů ve vlasech a **krevního tlaku** zkoumal Ródenas a jeho kolektiv (2011). Pro testování byly vybrány ženy **po menopauze**, ženy s normálními stravovacími návyky a částečné vegetariánky (které vyloučily červené maso z jejich stravy). Vegetariánky měly vyšší obsah Al, Ba, K, Mn, Na a Pb a nižší obsah Ca a Zn ve vlasech. Obsah kobaltu pozitivně koreloval se systolickým tlakem a obsah draslíku negativně koreloval s diastolickým tlakem.

González-Muñoz a kol. (2010) také vedli studii týkající se žen po menopauze, porovávající krevní tlak a obsah minerálů ve vlasech. Ženy s vysokým krevním tlakem měly značně vyšší obsahy Cd, Co a Mo a značně nižší obsahy Fe, Na, Mn a K než ženy s tlakem v normě. Poměry Ca/Mg a Zn/Cu byly také zvýšeny u žen s vysokým krevním tlakem. Autoři se shodují, že hladiny určitých prvků (Cd, Co, Fe, K, Mn, Mo a Na) ve vlasech by mohly sloužit jako biomarkery pro hypertenzi u žen po menopauze.

1.4.4 Infarkt myokardu

Pacienti s **infarktem myokardu** mají nižší hladiny železa, chromu a zinku ve vlasech. Naopak hladiny olova, kadmia a niklu mají vyšší. Co se týče obsahu mědi, muži mají hladiny

nižší v porovnání s kontrolou a ženy naopak hladiny vyšší. Muži i ženy s infarktem myokardu mají oproti kontrole nižší poměry Zn/Cu, Zn/Pb a Zn/Cd (Afridi a kol., 2006). Ve své další studii Afridi a kol. (2010) objevili, že pacienti s infarktem prvního, druhého i třetího stupně mají vyšší hladiny As, Cd, Ni a Pb. Vyšší hladiny obsahu těchto prvků pak pozitivně korelují se stupněm infarktu. Kazi a kol. (2008b) zjistili, že obsah zinku je značně nižší u pacientů s infarktem myokardu prvního, druhého a třetího stupně. Bylo také zjištěno, že pacienti s infarktem prvního a druhého stupně mají značně vyšší hladiny železa než kontrolní zdravé osoby.

Dle Tan a kol. (2009) mají pacienti s **kardiovaskulárním onemocněním** nižší hladiny Al, Cd, Cr, Fe, Ni a Se a vyšší hladiny Cu, Mn a Zn oproti zdravým jedincům. Také poměry Se/Fe byly nižší a poměry Mn/Cu vyšší. U mužských pacientů s **ischemickou mrtvicí** Karaszewski a kol. (2007) detekovali značně vyšší hladiny hořčíku a draslíku.

1.4.5 Onemocnění ledvin

Ortac a kol. (2006) se zabývali **onemocněním ledvin** a vlivem různých typů onemocnění na obsah prvků ve vlasech dětských pacientů na hemodialýze, pacientů docházejících pravidelně na ambulantní peritoneální dialýzu a pacientů s chronickým selháním ledvin. U všech tři skupin byl oproti zdravým dětem prokázán snížený obsah selenu. Długaszek a kol. (2008) porovnávali obsah prvků ve vlasech pacientů s chronickým selháním ledvin, pacientů s poruchou funkce ledvin a nedialyzovaných lidí. Zjistili, že pacienti s chronickým selháním ledvin mají značně vyšší hladiny Ca, Mg, Fe, Al a Cr.

Pacienti s **chronickým onemocněním ledvin** (muži, kuřáci) mají značně vyšší hladiny Al, Cd, Pb a Ni ve vlasech než kouřící i nekouřící kontrolní osoby. Obsah kadmia ve vlasech zdravých nekuřáků je vyšší než u zdravých kuřáků (Kazi a kol., 2009).

Khan a kol. (2011) měřili hladiny hliníku ve vlasech pacientů se **selháním ledvin** a tyto hladiny byly vyšší než u porovnávaných kontrol. Ochi a kol. (2011) stanovovali obsah 22 stopových prvků ve vlasech 80 hemodialyzovaných mužských pacientů a porovnávali je s obsahem prvků ve vlasech 100 zdravých dárců. Hladiny Pb, Hg, Cu, Ge a Br byly nižší u hemodialyzovaných pacientů. Naopak hladiny Be, As, Mg, Cr, Mn, Fe, Se, Mo, I, V a Co

byly značně vyšší než u kontrol. Také byla objevena pozitivní korelace mezi obsahem Mg, Mn a Cd a délkou trvání hemodialýzy.

1.4.6 Osteoartritida

Lech a kol. (2002) studovali obsah Pb, Cu, Zn a Mg ve vlasech dětí ve spojitosti s **poruchami kloubního systému**. Hladiny Pb, Zn a Mg byly vyšší a hladiny mědi nižší u pacientů v porovnání se zdravými dětmi. Pacienti měli také vyšší poměry Zn/Cu a nižší poměry Mg/Pb a Mg/Zn. Wang a kol. (2009) u žen s **osteoartritidou** prokázali vyšší hladiny Cu, K, Na a poměry Zn/Cu. Tyto ženy měly také nižší poměry Na/K a Fe/Cu.

Hashmi a Shah (2011) zkoumali skupinu pacientů s **revmatoidní artritidou** a **osteoartritidou**. Ve vlasech těchto pacientů detekovali obsah 10 prvků. Hladiny kobaltu a chromu měli pacienti výrazně vyšší oproti zdravým jedincům. Naopak hladiny mědi, železa a hořčíku měli pacienti nižší. Mierzecki a kol. (2011) porovnávali obsah zinku v séru, erytrocytech a vlasech pacientů s revmatoidní artritidou. Obsah zinku ve vlasech pacientů byl výrazně nižší než v ostatních biologických vzorcích.

1.4.7 Autismus

DePalma a kol. (2011) stanovovali obsah 17 prvků ve vlasech **autistických dětí**. Autisté měli značně vyšší obsah lithia, molybdenu a selenu. Z hlediska pohlaví bylo lithium vyšší u autistických chlapců než u dívek s autismem. Kadmium měli významně vyšší autističtí chlapci ve srovnání se zdravými chlapci. Zajímavá je Holmesova (2003) analýza prvních vlásků autistického dítěte. Matky byly vystaveny injekcím imunoglobulinu Rho D a měly amalgámové výplně zubů. Z tohoto důvodu měly vyšší obsah rtuti v těle. Avšak jejich autistické děti měly obsah toho prvku výrazně nižší v porovnání se zdravými dětmi. Lubkowska a Sobieraj (2009) zkoumali obsahy Mg, Ca, Fe, Se, Zn a Cu ve vlasech autistických dětí. Autistické dívky měly značně nižší hladiny mědi a hořčíku v porovnání se zdravými dívkami. Autističtí chlapci měli vyšší hladiny selenu a nižší hladiny železa.

1.5 Kontaminační pokusy

Používané prací postupy nemusí dokonale odstranit pouze vnější kontaminanty, ale mohou odstraňovat i prvky z vnitřní struktury vlasů. Za účelem určení, zda je prací metoda schopna rozlišit exogenně a endogenně vázané prvky, jsou zkoumány obohacené vzorky. Existuje několik kontaminačních studií, kde jsou vlasy/srst nejprve kontaminovány roztokem určitého prvku či směsí prvků a poté jsou promývány různými pracími metodami. Koncentrace prvků jsou měřeny ve vzorcích před kontaminací, v kontaminovaných vzorcích a následně po vyprání (Morton a kol., 2002).

V dlouhých pramenech vlasů bylo pozorováno, že se zvýšenou vzdáleností od hlavy se zvyšuje koncentrace většiny prvků. To naznačuje, že čas a zvýšená externí kontaminace může být příčinou hromadění prvků ve vlasech. Tyto poznatky vedly k provedení experimentu (Bate, 1966), který by prokázal, v jaké míře může být ovlivněn obsah stopových prvků ve vlasech adsorpcí prvků z vnějšího prostředí a zda je možné je odstranit pomocí rozpouštědel. Mnoho prvků nacházejících se ve vlasech je také přítomno v potu či jiných materiálech, které přicházejí do kontaktu s vlasy. Tato vnější kontaminace nám může vysvětlit původ těchto prvků. Pro účely studie byly použity vlasy, které byly promyty neionogenním detergentem a vysušeny. Kontaminační **roztok simulovaného potu** byl připraven rozpuštěním 2,61 g NaCl, 0,72 g KNO₃, 2,25 g kyseliny mléčné a 0,3 g močoviny v 1 litru vody. K 10 ml simulovaného potu bylo přidáno známé množství radioizotopové stopovací látky a stabilní prvek. Pro každý prvek byly připraveny 3 roztoky a pH bylo upraveno na hladinu okolo 3; 4,2 a 5,5. Ke každému roztoku byl přidán vzorek vlasů, směs byla důkladně protřepána a byla ponechána stát přes noc. Po 16 hodinách byly vzorky vyjmuty z kontaminačního roztoku, byly opláchnuty a promyty. Byly sledovány prvky: Ag, As, Au, Ba, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, I, K, Mn, Na, Sb, Se, Sr a Zn. Všechny prvky kromě Na a K se do vlasů adsorbovaly. Míra adsorpce prvků ve vlasech závisela na pH roztoku a také na konkrétním prvku. Jedno vyprání detergentem odstranilo maximálně 50 % kontaminace z vlasů. Dodatečné praní detergentem nepřispělo k dalšímu poklesu kontaminace. Ba, Co, Fe, Mn, Sb a Zn byly odstraněny pomocí rozpouštědel obsahujících EDTA. Nebylo objeveno žádné rozpouštědlo, které by odstranilo Ag, Au a Se. Výsledky této studie dokazují, že vlasy mohou absorbovat na svém povrchu mnoho prvků a prací metody absorbované prvky nemusí dostatečně odstranit. Pro forenzní analýzu vlasů je důležité, že koncentraci téměř jakéhokoliv stopového prvku lze ovlivnit přidáním neutrálního roztoku soli kovu k vlasům (Bate, 1966).

Mattera a kol. (1981) kontaminovali vzorky vlasů roztokem mědi ($20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) po dobu 48 hodin, následně hodnotili schopnost promývacích činidel odstranit **exogenně navázanou měď**. Část vzorků byla po kontaminaci opláchnuta deionizovanou vodou a část byla vyprána v 5% (w/v) roztoku SDS po dobu 30 minut. Promyté vzorky byly vysušeny a rozloženy. K analýze byly použity i nekontaminované vlasy. Před expozicí roztokem mědi bylo ve vzorcích vlasů detekováno $40 \pm 6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ mědi. Po 48 hodinové expozici se hladina mědi zvýšila na $62 \pm 8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Po promývání roztokem SDS při pH 7 hladina mědi poklesla na $45 \pm 8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. To odpovídá odstranění 78 % povrchově navázané mědi (Mattera a kol., 1981).

Morton a kol. (2002) zkoušeli vzorky lidských vlasů obohatit **simulovaným potem**. Obsah jednotlivých složek simulovaného potu byl zvolen s ohledem na fyziologické hladiny přítomné v ekrinním potu. Pot obsahoval síran vápenatý (0,04 g), chlorid sodný (0,38 g), síran hořečnatý (0,0005 g), síran draselný (0,223 g), síru (0,003 g), močovinu (0,09 g), rozpuštěné ve 100 ml deionizované vody. Ke vzorku vlasů byly přidány 3 ml směsného roztoku prvků (As, Cd, Cr, Hg, Pb, Sb, Se) o koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, přidávaných v roztoku potu. Kontaminace probíhala 24 hodin, poté byl roztok slit a vzorky vlasů byly usušeny. Vzorky byly promyty vždy 3 ml následujících pracích roztoků: 1% (v/v) SLS, 0,1% (w/v) EDTA a $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HCl. Neobohacené vzorky, obohacené vzorky neprané i vyprané byly rozloženy a analyzovány pomocí ICP-MS. Z výsledků uvedených v Tabulce 7 je patrné, že kromě olova se všechny prvky absorbovaly do vlasů. Rtuť a selen se absorbovaly ve větší míře, hladina koncentrace prvků vzrostla přibližně na pětinašobek. Olovo bylo po přidání simulovaného potu odstraněno. Tato skutečnost značí, že původní olovo nebylo pevně navázáno. Pomocí prací metody s EDTA byl zcela odstraněn absorbovaný chrom a kadmium, naopak arsen a selen nebyl z vlasů odstraněn. Antimon byl přibližně ze 34 % odstraněn pomocí SLS. Přibližně 30 % rtuti bylo vypráno pomocí HCl. Odstranit rtuť úplně nebylo možné žádnou z testovaných pracích metod (Morton a kol., 2002).

Tabulka 7: Porovnání koncentrací ve vlasech po obohacení simulovaným potem a vyprání

Prvek	Neprané, neobohacené vzorky	Obohacené vzorky	Obohacené a prané v SLS	Obohacené a prané v EDTA	Obohacené a prané v HCl
Koncentrace prvků [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]					
Cr	0,49	0,66	0,60	0,50	0,49
As	0,004	0,24	0,32	0,33	0,31
Se	0,58	3,41	3,34	3,23	3,25
Cd	0,0005	0,15	0,02	0,03	0,001
Sb	0,01	0,43	0,28	0,33	0,34
Hg	0,54	2,45	2,04	2,03	1,71
Pb	1,25	0,39	0,45	0,21	0,07

(upraveno dle: Morton a kol., 2002)

Ve stejné studii Morton a kol. (2002) kontaminovali vzorky vlasů izotopem kadmia (^{106}Cd). 3 ml zředěného roztoku kadmia byly na 24 hodin přidány ke vzorku vlasů, poté byl roztok slit a vlasy vysušeny přes noc. Část kontaminovaných vzorků byla ponechána nepraná, praná v 1% (v/v) SLS, v 1% (w/v) EDTA, v 0,1 mol \cdot l $^{-1}$ HCl a vysušena přes noc. Analýza proběhla pomocí ICP-MS, kde byl stanoven poměr izotopů ^{106}Cd a ^{111}Cd . Z původních nekontaminovaných vzorků byly záměrně zvoleny vzorky s různým obsahem kadmia. Výsledky ukazují, že po obohacení vzorků izotopem kadmia se poměr izotopů zvýšil. Po vyprání dvěma různými metodami (SLS a HCl) se pak poměr snížil. To dokazuje, že odstraněné kadmium bylo absorbováno z obohacujícího roztoku (Morton a kol., 2002).

Li a kol. (2008) ve svém experimentu sledovali, zda je možné z lidských vlasů odstranit **kontaminaci rtuťi**. Kontaminaci provedli pomocí roztoku HgCl_2 o různých koncentracích. Koncentrace 1; 10; 20; 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a 1; 50; 100; 500 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ byly použity pro exponované vlasy a koncentrace 10; 50; 100; 500 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro certifikovaný referenční materiál lidských vlasů. 1 ml obohacujícího roztoku byl vždy přidán ke 20 mg vlasů. Zkumavky byly uzavřeny a ponechány stát 24 hodin nebo 1 měsíc, poté byl kontaminant odpipetován. Následoval promývací krok se 2 ml pracích činidel: 0,1% (w/w) EDTA; 0,2% (w/v) L-cystein a 0,1% (v/v) 2-merkptoethanol. Směs byla vložena do ultrazvuku, po hodině byl promývací roztok odpipetován a proces byl 3x zopakován. V posledním kroku byly přidány 2 ml deionizované vody, směs byla vložena na 1 hodinu do ultrazvuku. Poté byla voda odpipetována a vzorky

byly ponechány přes noc volně uschnout při pokojové teplotě. Ke vzorkům byl přidán 1 ml směsi $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ a směs byla rozkládána 24 hodin. Následující den byly vzorky zahřívány v peci na $150\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 hodin. Poté bylo 0,5 ml rozložené směsi zředěno na objem 10 ml. Analýza vzorků probíhala pomocí ICP-MS. Neobohacené vlasy obsahovaly $13,6\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ rtuti, obohacené neprané vlasy obsahovaly $3625\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Při praní obohacených vlasů bylo odstraněno pouze 2,6 % Hg pomocí EDTA, 5,6 % pomocí L-cysteinu a 17,4 % pomocí 2-merkptoethanolu. Je patrné, že ani činidla s vysokou afinitou ke rtuti (jako je L-cystein a 2-merkptoethanol) nejsou schopny exogenní kontaminaci rtutí dokonale odstranit (Li a kol., 2008).

Hindmarsch a Savory (2008) prováděli **kontaminaci** vlasů **arsenem**. Přivedl je k tomu fakt, že u Napoleona Bonaparte byl po úmrtí nalezen vysoký obsah arsenu ve vlasech. Cílem jejich studie bylo zjistit, zda mohl být Napoleon arsenem otráven, či se mohlo jednat o kontaminaci vzorku. Arsen je vylučován v potu a mazových žlázách, například pacientům s leukémií, kterým je vstřikován arsen do těla, se arsen ukládá i na vnějším povrchu těla. Autoři namáčeli vlastní vlasy do roztoku arsenu na dobu od 1 měsíce až po rok. Zjistili, že arsen se do vlasů absorboval ve velké míře. Praním vzorku byla část arsenu odstraněna, ale velká část ve vlasech zůstala i po promytí. Promytí vzorku tedy nerozliší, zda jde o vnější kontaminaci nebo se arsen dostal do vlasů požitím (při otravě). V této studii bylo prokázáno, že po požití arsenu i po vnější kontaminaci lze arsen nalézt zabudovaný ve vnitřní struktuře i na povrchu vlasů. Proto není možné určit původ kontaminace podle toho, jestli byla vysoká koncentrace prvku nalezena na povrchu či uvnitř vlasů (Hindmarsh a Savory, 2008).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použitá přístrojová a laboratorní technika

- Automatické mechanické pipety o objemu 100 - 1000 μl a 1 - 5 ml (Biohit Proline, Finsko),
- Laboratorní sušárna UM 400 (Memmert, Německo),
- Mikrovlnný rozkladný systém MWS-2 Speedwave (Berghof, Německo),
- ICP-OES spektrometr Integra XL 2 (GBC, Austrálie),
- Plastové nádobí (Vitelab, Česká republika),
- pH metr MV 870 Digital-pH-Messgerät (Präcitronic, Německo),
- Podvarové destilační zařízení Distillacid BSB 939IR, (Berghof, Německo),
- o-TOF-ICP-MS spektrometr OptiMass 8000 (GBC, Austrálie),
- Předvážky 440-22N (Kern, Německo),
- Třepačka rotační RSR 01 (Labio, Česká republika),
- Třepačka Vibramax X100 (Heidolph Instruments GmbH, Německo),
- Ultrazvuková lázeň Powersonic UCC1 (Slovensko),
- Váhy New Classic, MS semimikro (Mettler Toledo, Švýcarsko),
- Váhy VIBRA SA-120CE (Shinko Denshi Co., Ltd., Japonsko),
- Výrobník demineralizované vody Ultra Clear UV plus Watersystem (SG, Německo),
- Výrobník demineralizované vody Milli Q⁺ (Millipore, USA).

2.1.1 Laboratorní pomůcky a nádobí

Pomůcky a nádobí užívané pro přípravu a nakládáním se vzorky byly výhradně plastové, z důvodu vyloučení možné kontaminace kovy. Na stříhání koňských žíní byly použity keramické nůžky, na následnou manipulaci byla používána plastová pinzeta a plastová laboratorní lžička. Dále byly používány skleněné odměrné válce, skleněné nálevky, skleněné i plastové odměrné baňky a skleněné i automatické pipety. Propylenové lahvičky pro uchování vodných roztoků vzorků a kalibračních roztoků byly před používáním vylouženy $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HNO_3 po dobu minimálně 24 hodin a následně byly opakovaně vypláchnuty demineralizovanou vodou a vysušeny.

2.2 Použité chemikálie

- Aceton p.a. (PENTA s. r. o., ČR),
- Certifikovaný referenční materiál Human Hair Powder (GBW 07601, China),
- Demineralizovaná voda,
- Hydroxid sodný p.a. (PENTA s. r. o., ČR),
- Chelaton III p.a. (Lachema, n. p., ČR),
- Kyselina chlorovodíková p.a. (Lachner, ČR),
- Kyselina dusičná 65% p.p. (PENTA s. r. o., ČR), pro účely analýzy dále upravena podvarovou destilací,
- Jednoprvkový standardní roztok Ba o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (VÚK Panenské Břežany a.s., ČR),
- Jednoprvkové standardní roztoky Al, As, Ca, Cd, Cu, In, Mn, P, Pb, Rh, o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Analytika Co. Ltd., ČR),
- Jednoprvkové standardní roztoky Fe, Mg, Na, Si, Ti, Zn o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (SCP Science, Kanada),
- Jednoprvkové standardní roztoky K, S, Sr o koncentraci $10,000 \pm 0,002 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (SCP Science, Kanada),
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA).

2.3 Příprava kalibračních roztoků

Na přípravu multielementárního kalibračního standardu pro **ICP-OES** analýzu byly použity jednoprvkové kalibrační standardy Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, P, Si, Ti, Zn o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a standardní roztoky K, S, Sr o koncentraci $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro stabilizaci roztoků byla přidávána koncentrovaná HNO_3 v množství 1 ml na výsledných 100 ml roztoku. Koncentrace prvků v multielementárním kalibračním standardu „žíně 1“ a jeho příprava jsou uvedeny v Tabulce 8. Tento kalibrační standard byl použit pro přípravu dalších multielementárních standardů „žíně 2“ (ředěno 2x), „žíně 3“ (ředěno 5x) a „žíně 4“ (ředěno 10x). Kalibrační řada pro Ba, Cu, K, Na byla navíc doplněna o jednoprvkové standardní roztoky (viz Tabulka 8).

Tabulka 8: Koncentrace kalibračních roztoků pro ICP-OES analýzu

Prvek	ZS	Žině 1		Žině 2	Žině 3	Žině 4	Jedno-prvkové standardy
	c [g · l ⁻¹]	V _p [ml]	c [mg · l ⁻¹]	c [mg · l ⁻¹]	c [mg · l ⁻¹]	c [mg · l ⁻¹]	c [mg · l ⁻¹]
Al	1	5	10	5	2	1	
Ba	1	0,5	1	0,5	0,2	0,1	0,05
Ca	1	25	50	25	10	5	
Cu	1	0,5	1	0,5	0,2	0,1	0,01 a 0,05
Fe	1	2,5	5	2,5	1	0,5	
K	10	5	100	50	20	10	5
Mg	1	2,5	5	2,5	1	0,5	
Mn	1	0,5	1	0,5	0,2	0,1	
Na	1	5	10	5	2	1	0,1 a 0,5
P	1	5	10	5	2	1	
S	10	10	200	100	40	20	
Si	1	5	10	5	2	1	
Sr	10	5	0,1	0,05	0,02	0,01	
Ti	1	0,5	1	0,5	0,2	0,1	
Zn	1	0,5	1	0,5	0,2	0,1	
Příprava	V _p jednotl. ZS →500 ml		50 ml „Žině1“ →100 ml	20 ml „Žině1“ →100 ml	10 ml „Žině1“ →100 ml	ředěno ze ZS	

ZS – základní standardní roztok prvku, c – koncentrace prvku v kalibračním standardu;

V_p – pipetovaný objem příslušného ZS

Na přípravu směšného kalibračního roztoku pro **ICP-MS** byly použity jednoprvkové kalibrační standardy As, Cd a Pb o koncentraci 1 g · l⁻¹, ze kterých byl připraven směšný roztok prvků o koncentraci 10 mg · l⁻¹ a objemu 10 ml. Ze směšného roztoku (o koncentraci 10 mg · l⁻¹) byl ředěním připraven roztok o koncentraci 100 µg · l⁻¹. Z tohoto zásobního roztoku (o koncentraci 100 µg · l⁻¹) byla dále připravena kalibrační řada o koncentracích 0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 3 - 5 - 10 µg · l⁻¹. Pro stabilizaci byla přidávána podvarová HNO₃ v množství 100 µl na výsledný objem 10 ml.

Pro ICP-MS analýzu byly jako interní standardy (IS) zvoleny prvky indium a rhodium. IS byly připraveny z jednoprvkových standardů In a Rh o koncentraci 1 ± 0,002 g · l⁻¹. Postupným naředěním jednoprvkových standardů byl připraven IS In (o koncentraci 100 µg · l⁻¹) a IS Rh (o koncentraci 100 µg · l⁻¹), které byly dávkovány do kalibrační řady a k naředěným vzorkům. Dávkované množství jednotlivých IS bylo 0,3 ml na výsledných 10 ml roztoku.

2.4 Příprava vzorků a CRM k analýze

K experimentu byly použity koňské žíně získané roku 2015 ze soukromého hřebčína Siglavy, České Budějovice. Celková hmotnost získaného vzorku byla přibližně 0,5 kg, jedná se o směsný vzorek získaný při hřebelcování koní. Koňské žíně byly nastříhány pomocí keramických nůžek na části o velikosti několika milimetrů (Obrázek 4). Následně došlo k promísení a homogenizaci vzorku v plastové nádobě o objemu 1 litr. V této nádobě byl vzorek na suchém a tmavém místě uschován před dalším postupem. Pro ověření správnosti metody byl použit certifikovaný referenční materiál (CRM) lidských vlasů – Human hair powder (GBW 07601, China).



Obrázek 4: Nastříhané koňské žíně

2.4.1 Praní vzorků

Bylo testováno 5 pracích činidel: horká demineralizovaná voda, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselina dusičná, 0,5% Triton X-100, 2% EDTA a čistý aceton. Všechny chemikálie byly čistoty p.a. Při každém pracím postupu byly dodrženy stejné podmínky. Do plastové lahvičky o objemu 100 ml byl navážen 1 g vzorku a bylo přidáno 50 ml pracího roztoku. Na 10 minut byla lahvička s touto směsí vložena do ultrazvukové vany. Následně byl vzorek 3x propláchnut demineralizovanou vodou o laboratorní teplotě a tekutina byla slita přes punčochu. Vzorek v plastové lahvičce byl poté vložen do sušárny a byl vysušen při $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do druhého dne.

2.4.2 Mikrovlnný rozklad vzorků

Do teflonových nádobek bylo naváženo 0,2 g koňských žíní a bylo přidáno 7 ml podvarové kyseliny dusičné. Směs se nechala 10 minut reagovat. Současně byl také připraven slepý pokus, obsahující 7 ml podvarové HNO₃. V mikrovlnném rozkladném systému MWS-2 Speedwave byl za pomoci následujícího programu vzorek rozložen: 1. krok 160 °C, 5 minut při 80% výkonu; 2. krok 200 °C, 10 minut, při 80% výkonu; 3. krok bez ohřevu, 10 minut při výkonu 0 %. Po dokončení mineralizace byly roztoky ochlazeny na laboratorní teplotu, kvantitativně převedeny do plastových odměrných baněk o objemu 50 ml a následně doplněny po rysku demineralizovanou vodou. Poté byly vzorky přelity do předem vyloužených polyethylenových lahvíček o objemu 100 ml a ihned zanalyzovány, případně uchovány při - 20 °C až do doby analýzy. Identickým způsobem byly připraveny i vzorky certifikovaného referenčního materiálu lidských vlasů GBW 07601.

2.5 Kontaminující látky použité v experimentu

Pro účely kontaminační studie byly použity kontaminující látky pevné i kapalné. Byla použita půda z pole, na kterém byla pěstována řepa (Jaromeř, 50°19'28.489"N, 15°52'25.193"E), sediment získaný z výtoku Máchova jezera, popílek ze spalovny nemocnice Pardubice a roztok simulovaného potu s přísadkou vybraných prvků.

Před použitím v kontaminační studii byly v půdě, sedimentu a popílku stanoveny obsahy cílových analytů. Výluhy půdy a sedimenty byly připraveny podle Jednotných pracovních postupů Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského, které se řídí vyhláškou 13/1994 Sb. (Vyhláška Ministerstva životního prostředí, kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu) a vyhláškou 257/2009 Sb. (Vyhláška o používání sedimentů na zemědělské půdě). Do polyethylenové nádoby o objemu 500 ml bylo naváženo 10 g vzorku půdy nebo sedimentu a bylo přidáno 100 ml zředěné kyseliny dusičné. Suspenze byla důkladně ručně protřepána a byla ponechána stát 16 hodin (přes noc) při laboratorní teplotě (20 °C). Po této době byla směs opět ručně protřepána, aby vznikla suspenze. Poté byla směs extrahována 60 minut na rotační třepače při 50 otáčkách za minutu. Suspenze byla přefiltrována přes filtrační papír do čisté a suché polyethylenové nádoby

o objemu 100 ml. Byl filtrován celý objem extraktu, prvních 5 - 10 ml filtrátu bylo odstraněno (Jednotné pracovní postupy, 1996).

Dle Metodického pokynu odboru odpadů Ministerstva životního prostředí k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů (2002) byl proveden výluh popílku následujícím způsobem. Do polyethylenové nádoby o objemu 500 ml bylo naváženo 10 g vzorku popílku a bylo přidáno 100 ml destilované vody. Suspenze byla protřepána v třepačce 24 hod a následně byla směs ponechána sedimentovat 15 minut. Suspenze byla přefiltrována přes filtrační papír do čisté a suché polyethylenové nádoby o objemu 100 ml. Byl filtrován celý objem extraktu, prvních 5 – 10 ml filtrátu bylo odstraněno. Analýza výluhů kontaminujících materiálů byla provedena pomocí ICP-OES. As byl analyzován na AAS z důvodu nízké citlivosti ICP-OES. Výsledky analýzy jsou shrnuty v Tabulce 9.

Kontaminace žíní byla provedena následujícím způsobem. Do polyethylenové nádoby byl navážen 1 g koňských žíní a bylo přidáno 5 g kontaminantu (půdy, sedimentu nebo popílku). Průběh kontaminace byl nafocen a je uveden v Příloze 3. Nádobka byla uzavřena a po dobu 15 hodin byla třepána v třepačce. Žíně byly poté za pomoci síta odděleny od kontaminantu a použity v další části pokusu.

Tabulka 9: Obsah prvků ve výluzích pevných kontaminujících materiálů

	Půda	Sediment	Popílek
Prvek	\bar{c} [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]		
Al	10,6 *	270	-
As	0,185	0,0526	0,340
Ba	109	5,33	0,954
Ca	5,41 *	992	11,2 *
Cd	0,272	-	63,3
Cu	15,2	29,6	52,8
Fe	1,12 *	164	-
K	866	98,2	55,5 *
Mg	1,11 *	65,4	371

	Půda	Sediment	Popílek
Prvek	\bar{c} [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]		
Mn	220	26,2	2,35
Na	4,49	37,9	36,4 *
P	1,80 *	30,0	-
Pb	14,12	1,07	97,4
S	8,6 *	43,6	23,0 *
Si	1,15 *	153	106
Sr	34,7	1,83	29,4
Ti	152	2,53	0,265
Zn	127	257	38,6 *

* výsledky v [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

Zásobní roztok simulovaného potu byl připraven dle normy ČSN EN 1811 + A1. Roztok obsahoval 0,1 % močoviny, 0,5 % NaCl a 0,1 % kyseliny mléčné. Celkové množství připraveného roztoku byl 1 litr. Kontaminační roztoky se lišily koncentrací prvků a pH. Z jednoprvkových standardů (o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) byl připraven směsný roztok As, Cd, Cu, Pb, Zn o koncentraci $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, ze kterého bylo dávkováno tak, aby byla výsledná koncentrace prvků v umělém potu 0,1; 1 a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. pH bylo upraveno na hodnotu 3; 5,5 a 8, pomocí roztoků NaOH a HCl s měřením pomocí pH metru. Kontaminace žíní byla provedena následujícím způsobem: k 1 g žíní v polyethylenové láhvi bylo přidáno 10 ml umělého potu, nádoba byla uzavřena a po dobu 1 hodiny, 6 hodin nebo 24 hodin třepána v třepačce. Poté byly žíně odděleny od roztoku pomocí punčochy, 3x propláchnuty demineralizovanou vodou a do druhého dne sušeny v sušárně při $45 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.6 ICP-OES analýza

Pro stanovení prvků Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr, Ti a Zn byla použita ICP-OES analýza. K analýze byl použit spektrometr Integra XL 2 australské firmy GBC, který má detekční limity pohybující se od hodnot menších než 0,01 až po $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Detekční limit menší než $0,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ mají prvky Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Hf, Hg, Ho, Ir, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nb, Ni, Os, P, Pd, Pr, Pt, Rb, Re, S, Sb, Sc, Si, Sn, Sr, Tb, Te, Th, Ti, Tm, V, W, Y, Yb, Zn a Zr. Prvky C, Ga, Nd, Pb, Ru, Se, Sm, Ta, Tl mají detekční limit $0,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Detekční limit do $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ platí pro prvky Ce, Cs, Ge, In, K, Rh, U (AAS or ICP-OES - Are They Competing Techniques, 2000; Bendakovská, 2013).

Pro stanovení výše uvedených 15 prvků byla použita metoda optimalizovaná v předchozích diplomových pracích Niemczykové (2011) a Pátkové (2012). Použité spektrální čáry a konkrétní korekce pozadí jsou uvedeny v Tabulce 10. Ostatní pracovní podmínky ICP-OES analýzy (toky argonu, výška pozorování, napětí na fotonásobiči aj.) jsou uvedeny v Tabulce 11.

Detekční limit je softwarem spektrometru vyhodnocován jako koncentrace analytu, která odpovídá trojnásobku směrodatné odchylky intenzity pozadí měřené v místě korekce pozadí. Detekční limity (Tabulka 10) jsou uvedeny jako průměr hodnot z výstupu softwaru

přístroje získaných pro nejnižší kalibrační standard z jednotlivých analytických sérií, tato hodnota byla zaokrouhlena směrem nahoru.

Detekční limit postupu určuje minimální množství analytu, jež je možné detekovat v původním materiálu v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a zohledňuje naředění vzorku při rozkladu vzorku mineralizací. Je násobkem faktoru zředění a detekčního limitu. Při minimální navážce žíní 200 mg a objemu mineralizátu 50 ml je zředovací faktor 250.

Tabulka 10: Spektrální linie a detekční limity pro jednotlivé prvky při ICP-OES analýze

Prvek	λ [nm]	Korekce pozadí [nm]	DL [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	DL _P [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]
Al	308,22	0,0239	0,06	15,0
Ba	493,41	-0,039	0,001	0,250
Ca	317,93	-0,054	0,001	0,250
Cu	324,75	-0,048	0,002	0,500
Fe	259,94	-0,025	0,002	0,500
K	769,90	-0,052	0,5	125
Mg	280,27	-0,025	0,001	0,25
Mn	257,61	-0,026	0,002	0,500
Na	589,59	-0,053	0,02	5,00
P	213,62	-0,014	0,05	12,5
S	180,73	-0,018	2	500
Si	251,61	-0,020	0,02	5,00
Sr	407,77	-0,042	0,001	0,250
Ti	334,94	-0,046	0,05	12,5
Zn	202,55	-0,016	0,002	0,500

λ – vlnová délka, DL – detekční limit, DL_P – detekční limit postupu

Tabulka 11: Pracovní podmínky ICP-OES analýzy

Parametr	Hodnota	Parametr	Hodnota
Příkon do plazmatu	1100 W	Doba integrace signálu	0,15 s
Výška pozorování	6 mm	Průtok vnějšího plynu	0,6 $\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
Napětí na fotonásobiči *	600 V	Průtok nosného plynu	0,60 $\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
Rychlost pumpy	10 rpm	Průtok plazmového plynu	11 $\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
Kroky	60 bodů	Počet opakovaných měření	3

* Napětí na fotonásobiči: Ba 570 V; Fe, Mn 580 V; Ca 530 V; Mg 450 V

2.7 ICP-MS analýza

Prvky As, Cd a Pb byly stanoveny pomocí hmotnostního spektrometru OptiMass 8000 (GBC, Austrálie) s průletovým analyzátozem TOF. Pro prvky Ag, Ba, Bi, Ce, Co, Ho, In, Mn, Nb, Pb, Rb, Rh, Sc, Sr, Ta, Tb, U, V, Zr je detekční limit pod $10 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$. Detekční limity pro Al, Au, Cu, Ga, Li, Mg, Mo, Nd, Pr, Pt, Re, Ti dosahují hodnot pod $1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ a (Zelenková, 2012).

Před každým spuštěním ICP-MS analýzy byly pracovníky laboratoře optimalizovány pracovní podmínky přístroje pro dosažení maximálního rozlišení a citlivosti odezvy signálu izotopu ^{238}U . Výkon generátoru byl 1200 W , průtok nosného plynu byl $0,99 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, průtok plazmového plynu byl $11 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ a průtok vnějšího plynu byl $0,55 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$. Každé stanovení prvku bylo provedeno ve 3 replikách. Další parametry jsou uvedené v Tabulce 12. Pracovní izotopy byly zvoleny s ohledem na jejich citlivost a možné spektrální interference vzhledem ke složení analyzovaných vzorků: ^{75}As , ^{114}Cd a $^{206+207+208}\text{Pb}$. Prvky indium a rhodium byly zvoleny jako interní standardy. Tyto prvky se nevyskytují ve vzorcích a nejsou ovlivňovány interferencemi. ^{115}In a ^{103}Rh se nevyskytují ani ve směsném standardu, který byl používán pro přípravu kalibračních standardů. Detekční limit je vyjádřen jako koncentrace úměrná trojnásobku směrodatné odchylky intenzity nejnižšího standardu ($0,1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Detekční limit pro izotop ^{75}As je $0,016$; pro izotop ^{114}Cd $0,0068$ a pro $^{206+207+208}\text{Pb}$ $0,048 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Určení limity detekce postupu zohledňuje naředění mineralizátu žíní. Při minimální navážce žíní 200 mg , objemu mineralizátu 50 ml a jeho naředění 10x je zředovací faktor 2500 . Detekční limit postupu pro izotop ^{75}As je 40 ; pro izotop ^{114}Cd 17 a pro směs izotopů $^{206+207+208}\text{Pb}$ $120 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Tabulka 12: Pracovní podmínky ICP-MS analýzy

Parametr	Hodnota	Parametr	Hodnota
Skimmer	-1300 V	Fill grid	-10 V
Extraction	-1200 V	Pushout grid	-465 V
Z1	-900 V	Pushout plate	540 V
Y mean	-280 V	Blanker	200 V
Y deflection	0 V	Reflectron	640 V
Z lens mean	-1100 V	Multiplier gain	3000 V
Z lens deflection	-40 V	Acquisition time	5 s
Lens body	-130 V	Replicates	3
Fill	-40 V	Sample intro time	10 s
Fill bias	0,01 V		

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce se zabývá hodnocením schopností pěti pracích činidel, která jsou často zmiňována v odborné literatuře, odstranit vnější kontaminaci (prachové částice, kontaminanty adsorbované na povrchu) před analýzou koňských žíní. Jsou porovnávány horká demineralizovaná voda, $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselina dusičná, 0,5% Triton X-100, 2% EDTA a čistý aceton. Dále je studována účinnost praní v horké demineralizované vodě při odstranění kontaminantů adsorbovaných na povrchu žíní. Pro tento účel byl navrhnut pokus, ve kterém jsou žíně kontaminovány třemi pevnými látkami (půda, sediment, popílek) a roztoky simulovaného potu s přidavkem vybraných prvků (As, Cd, Pb, Cu, Zn) na třech koncentračních úrovních při různých hodnotách pH.

3.1 Optimalizace praní a rozkladu vzorků

Před provedením samotné prvkové analýzy vzorků je třeba žíně zbavit povrchových nečistot a převést je do formy roztoku. Postupy praní a mikrovlnného rozkladu vycházely z předchozích diplomových prací (Niemczykova, 2011; Pátková, 2012) a z práce provedené na pracovišti (Krejčová a kol, 2015). Nicméně byly upraveny a optimalizovány pro konkrétní požadavky této studie. Volba pracího postupu k odstranění vnější kontaminace (prach, zbytky trávy, bláto, podestýlka apod.) vycházela z výsledků analýzy žíní po aplikaci výše zmiňovaných pěti činidel a z hodnocení povrchu žíní po praní (viz kapitola 3.3.1). Byl použit prací postup s horkou vodou: 1 g žíní byl namočen v 50 ml horké demineralizované vody 10 minut v ultrazvukové lázni, poté byly žíně 3x propláchnuty demineralizovanou vodou přes punčochu. Pro kontrolu možné kontaminace byl proveden slepý pokus, kdy byly analyzovány oplachové vody z punčochy. Rozkladný teplotní program (kapitola 2.4.2) vycházel z diplomové práce (Pátková, 2012): navážka vzorku 0,2 g a 7 ml podvarové HNO_3 . Oproti předchozí práci byla při stejném výkonu v 1. kroku teplota zvýšena a ve 2. kroku mírně snížena. Třetí krok byl zvolen bez ohřevu a při nulovém výkonu. Mineralizáty po rozkladu byly číré a bezbarvé.

3.2 Ověření spolehlivosti analytických metod

Ačkoliv tato práce navazuje na předchozí diplomové práce, bylo třeba ověřit spolehlivost použitých analytických postupů. Metoda byla validována analýzou certifikovaného referenčního materiálu lidských vlasů GBW07601. Příprava CRM pro analýzu se shodovala s přípravou vzorků žíní (kapitola 2.4). Pro ověření, zda při některém z kroků příprav před analýzou nedochází ke kontaminaci byly za stejných podmínek připraveny i slepé mineralizační pokusy (mineralizace 7 ml HNO₃). Celkem bylo připraveno 7 mineralizátů CRM a 3 mineralizační blanky, které byly analyzovány pomocí metod ICP-OES a ICP-MS. Nalezené koncentrace sledovaných prvků byly porovnány s hodnotami uvedenými v certifikátu referenčního materiálu (Tabulka 13). Experimentálně zjištěné hodnoty se shodují s certifikovanými hodnotami deklarovanými výrobcem. Opakovatelnost analýzy prvků v CRM se pohybovala v řádu jednotek až desítek (od 1,87 do 29,0 %). Vyšší obsah byl zaznamenán u hliníku, což mohlo být zapříčiněno kontaminací vzorku při přípravě. Opakovaně naměřené nižší obsahy sodíku v CRM nebyly vysvětleny. Obsah draslíku v certifikovaném materiálu 20 µg · g⁻¹ byl pod detekčními schopnostmi metody. Hladiny draslíku naměřené v CRM byly opakovaně pod detekčním limitem.

Tabulka 13: Koncentrace prvků naměřené v certifikovaném referenčním materiálu GBW07601

Prvek	Certifikováno [µg · g ⁻¹]	Naměřeno [µg · g ⁻¹]	RSD [%]
Al	-	9348 ± 672	7,2
As	0,28 ± 0,05	0,28 ± 0,03	10
Ba	17 ± 2	15 ± 1	9,4
Ca	2900 ± 300	2984 ± 126	4,2
Cd	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,003	2,4
Cu	10,6 ± 1,2	9,6 ± 1,2	12
Fe	54 ± 10	52 ± 5	9,0
Mg	360 ± 40	397 ± 11	2,7
Mn	6,3 ± 0,8	5,6 ± 0,9	15
Na	152 ± 17	30 ± 2	6,7
P	170 ± 10	167 ± 10	5,7
Pb	8,8 ± 1,1	7,8 ± 2,3	29
S	43000 ± 3000	43500 ± 812	1,9
Si	870 ± 190	687 ± 67	9,7
Sr	24 ± 1	25 ± 1	4,9
Ti	2,7 ± 0,6	2,4 ± 0,3	12
Zn	190 ± 9	182 ± 6	3,1

Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka

Dlouhodobá opakovatelnost byla ověřována analýzou kalibračních standardů o různých koncentracích. U ICP-OES analýzy byl opakovaně použit standard „žíně 1“ (koncentrace viz kapitola 2.3 Tabulka 8), u ICP-MS analýzy standardní roztoky 0,1; 1 a 10 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Tyto roztoky byly během každé analýzy zařazeny minimálně 3x, a to vždy na začátku, po každých 10 vzorcích, uprostřed a na konci analýzy. Výsledky opakovaných analýz jsou shrnuty v Tabulce 14. Návratnosti výsledků analýz kalibračních standardů vyjádřené jako poměr nalezené a teoretické koncentrace v procentech se pohybovaly v rozmezí od 92,2 do 114 %. Dlouhodobá opakovatelnost pro sledované kalibrační standardy vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (v procentech) byla v rozmezí od 0,046 do 9,1 %. Byly analyzovány i mineralizační slepé pokusy, sledované prvky byly opakovaně pod detekčním limitem pracovního postupu.

Pro každou sérii vzorků byly počítány průměrné hodnoty, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky. Pokud nebyl sledovaný analyt detekován nebo byl pod detekčním limitem, nejsou statistické parametry počítány a hodnoty nejsou uváděny.

Tabulka 14: Výsledky opakovatelnosti kalibračních standardů

Prvek	c_s [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	RSD [%]	R [%]
Al	10,0	0,87	111
As	1,00	2,9	103
Ba	1,00	0,16	109
Ca	50,0	0,057	108
Cd	1,00	9,1	95,1
Cu	1,00	7,6	108
Fe	5,00	0,064	110
K	100	0,15	113
Mg	5,00	0,62	110
Mn	1,00	1,1	108
Na	10,0	0,39	114
P	10,0	0,21	111
Pb	10,0	2,2	102
S	200	0,81	109
Si	10,0	0,046	108
Sr	0,100	0,59	110
Ti	1,00	0,092	92,2
Zn	1,00	5,0	102

c_s – koncentrace standardu; RSD – relativní směrodatná odchylka; R – výtěžnost

3.3 Hodnocení pracích metod

Hodnocení pracích postupů koňských žíní bylo na pracovišti již studováno a první předběžné výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení (Krejčová a kol., 2015). Prací postupy byly voleny na základě studia literatury. V této práci byly prací postupy hodnoceny vizuálně pomocí elektronové mikroskopie povrchu žíní i pomocí prvkové analýzy.

3.3.1 Hodnocení povrchu žíní

Povrchová struktura žíní po praní v jednotlivých činidlech byla hodnocena na snímcích z mikroskopu pořízených ve Společné laboratoři chemie pevných látek ústavu makromolekulární chemie AV ČR a Univerzity Pardubice Ing. Milanem Vlčkem, CSc. (skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-5500LV; JEOL Ltd., Japonsko; urychlovací napětí primárního svazku elektronů 10 kV, povrch vzorků zvodivěn naprášením tenké vrstvy zlata). Snímky byly nafoceny při zvětšení 300x a 1000x a jsou uvedeny na Obrázku 5 (a, b, c) a 6 (d, e, f). Na snímku nepraných koňských žíní (Obrázek 5 a) je patrný relativně hladký povrch žíně s útvary na povrchu, patrně částicemi prachu, podestýlky, potravy aj. Žíně prané v kyselině dusičné (5 b) mají oproti nepraným žíním povrch narušený spíše do hloubky. Po vyprání v horké vodě mají žíně (5 c) povrch ze všech porovnávaných žíní nejhladší a bez viditelných útvarů. Použitím tohoto pracího postupu byla pravděpodobně odstraněna většina částic. Stejně tak žíně vyprané v detergentu Triton X-100 (6 d), v EDTA (6 e) a acetonu (6 f) mají povrch bez viditelných částic. Na povrchu nepraných žíní jsou patrné nečistoty, po praní kyselinou dusičnou je povrch viditelně narušen, ostatní prací činidla odstraňují povrchové nečistoty a případně i tukovou vrstvu a povrch nenarušují. Odstranění prachových částic je patrně důsledkem mechanického působení pracího roztoku, částečně i odmašťovacích schopností. Pro další zpracování vzorku bylo dále používáno praní v horké vodě. Tento postup je jednoduchý, levný a nevyžaduje žádné další chemikálie, s dopady na životní prostředí, neprodukuje žádné odpady.

Byla rovněž provedena povrchová analýza žíní nepraných a praných v kyselině dusičné (rentgenový energiově disperzní mikroanalyzátor IXRF Systems, USA, detektor GRESHAM Sirius 10). Z Obrázku 7 je zřejmé, že praním v kyselině dusičné dochází k odstranění stopových prvků a v žíních zůstávají hlavní prvky, jako C, O, S.

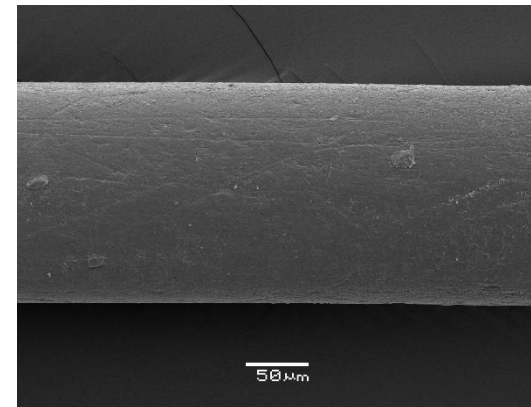
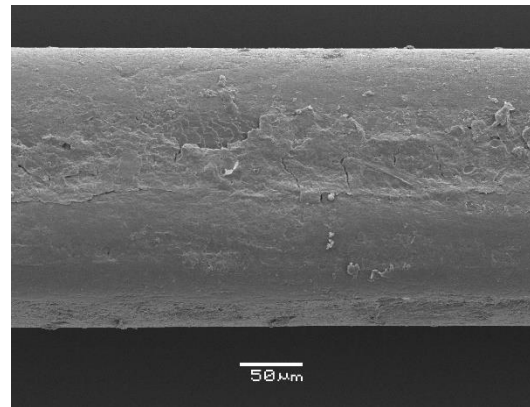
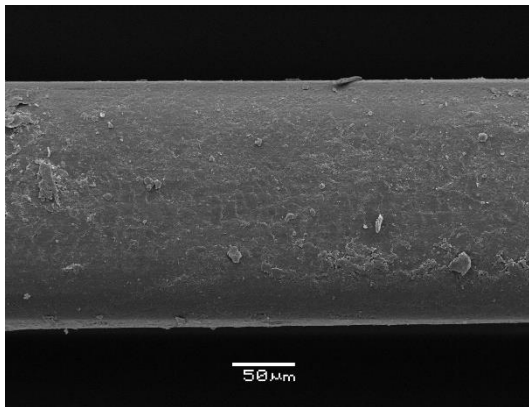
Zvětšení

Neprané žině (a)

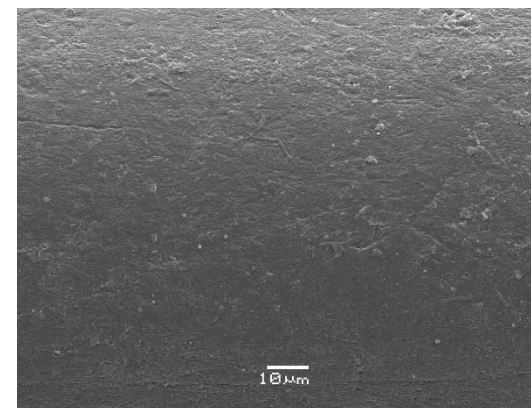
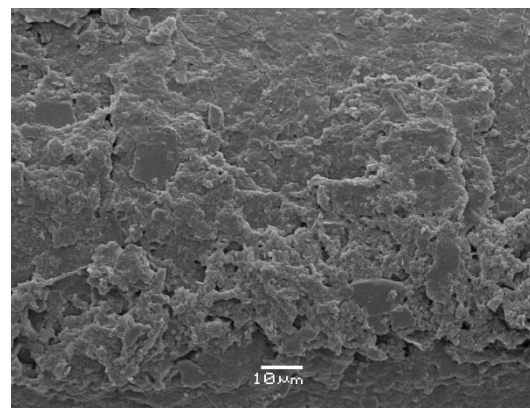
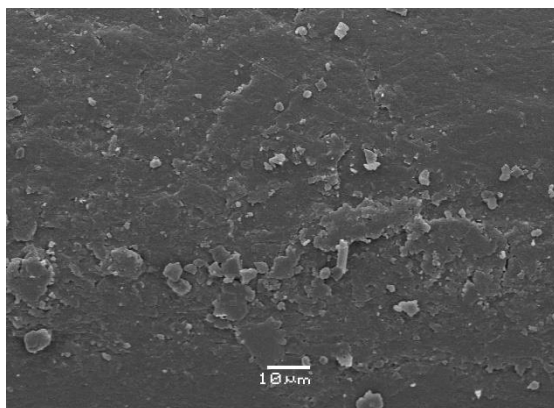
Kyselina dusičná (b)

Horká voda (c)

300x



1000x



Obrázek 5: Snímky povrchu žiní po praní jednotlivými pracími činidly

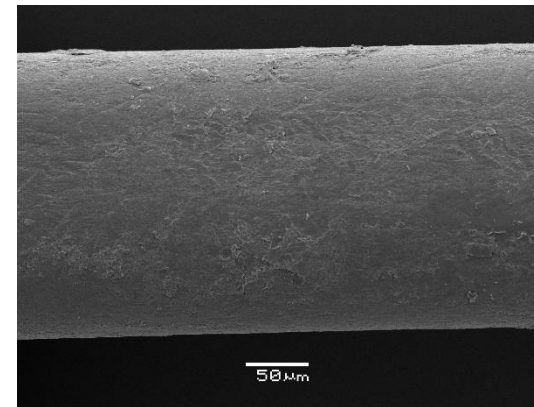
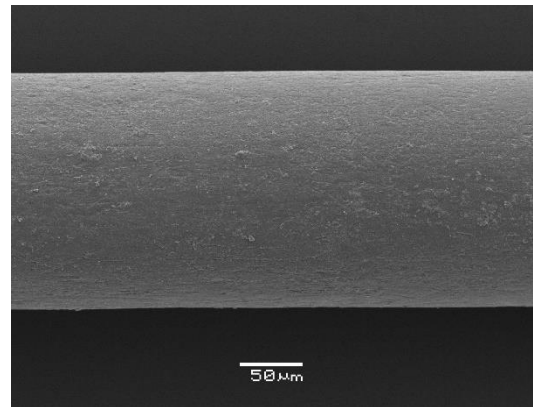
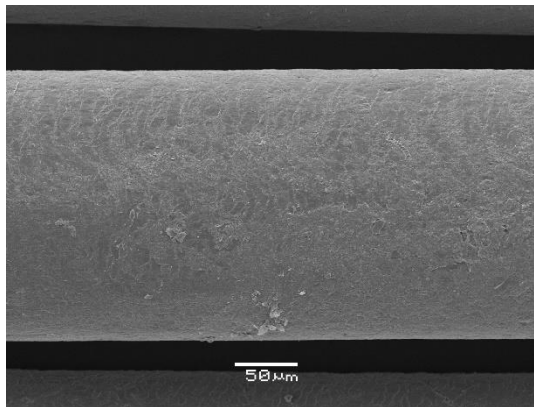
Zvětšení

Triton X-100 (d)

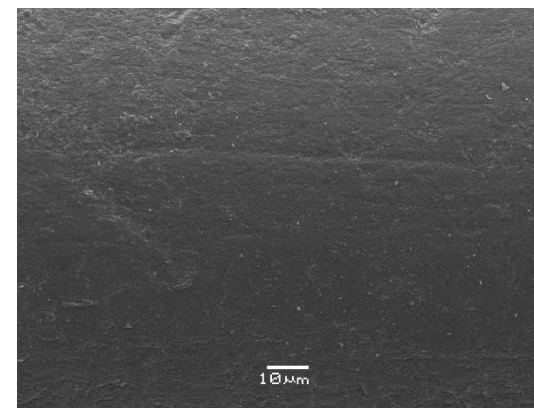
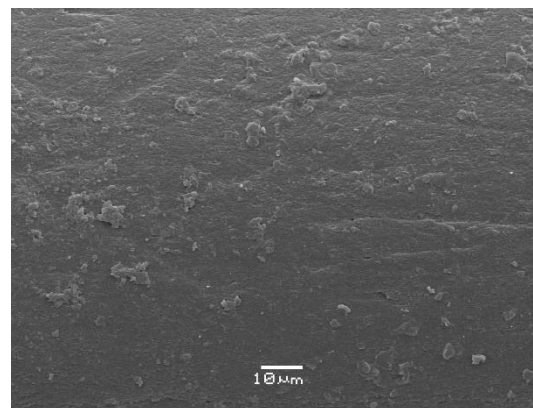
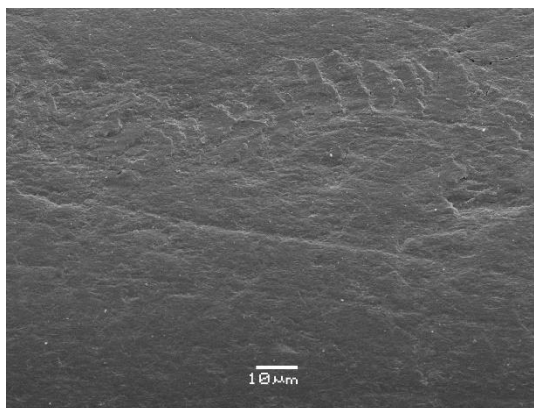
EDTA (e)

Aceton (f)

300x

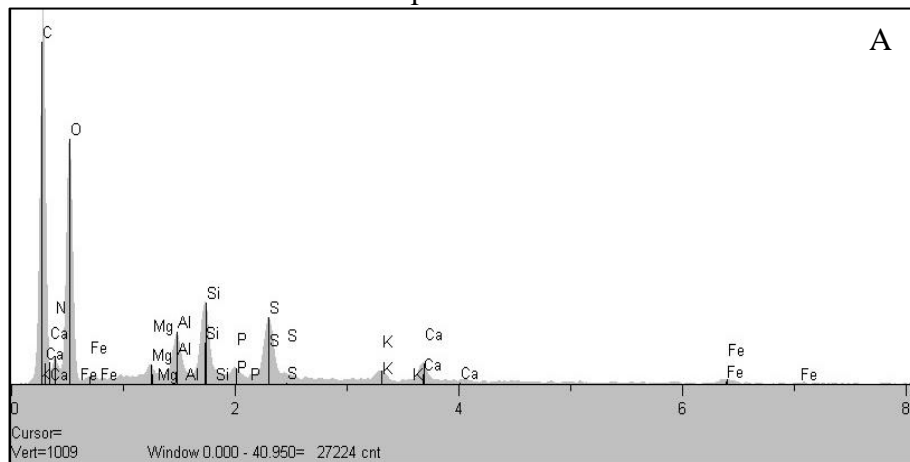


1000x

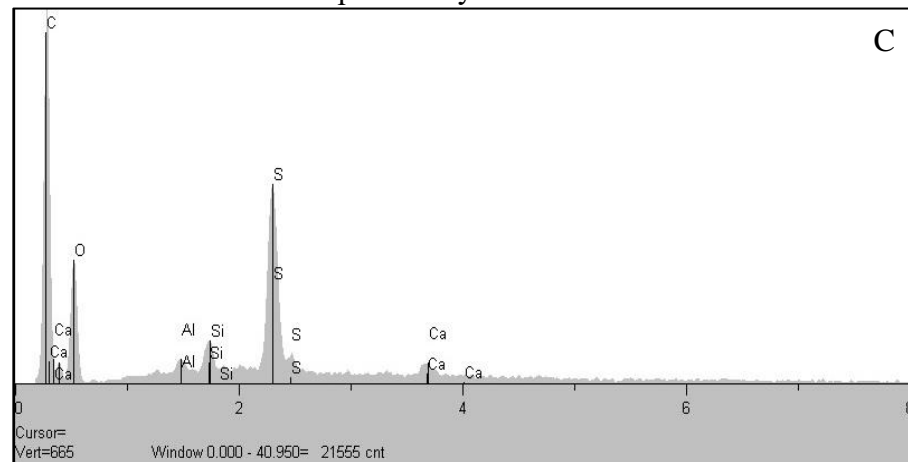


Obrázek 6: Snímky povrchu žíní po praní jednotlivými pracími činidly (2. část)

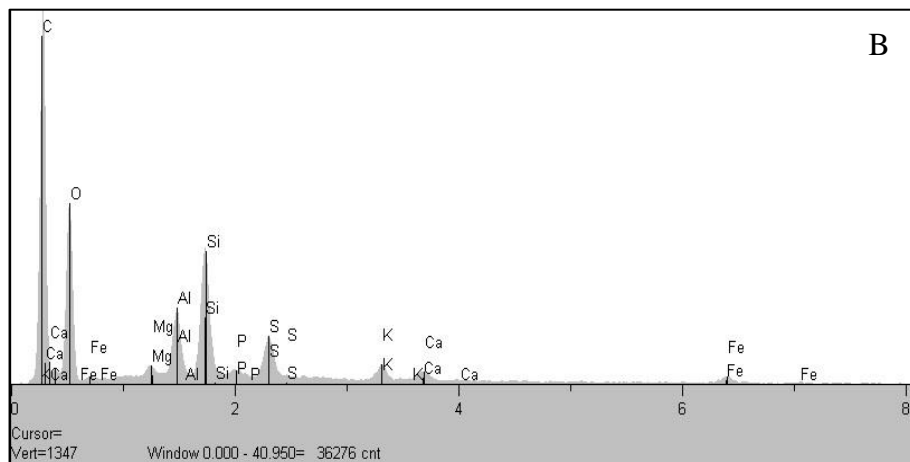
Neprané žíně



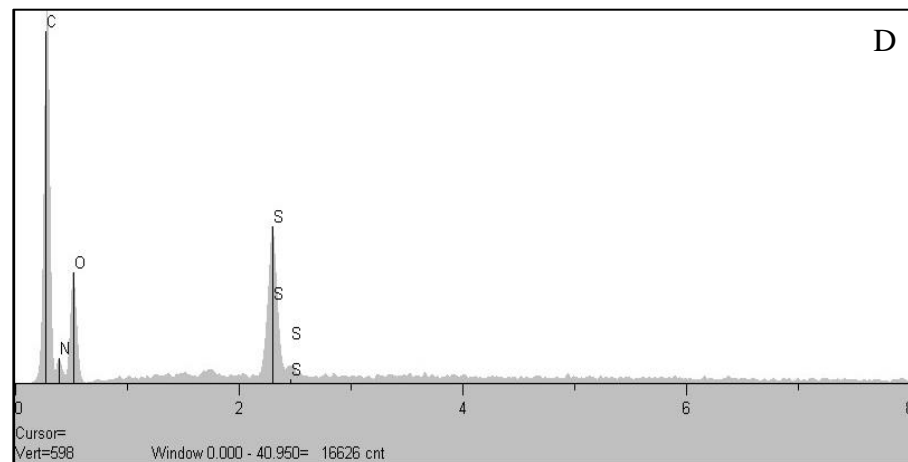
Žíně prané v kyselině dusičné



B



D



Obrázek 7: Povrchová analýza žíní nepraných (A, B) a žíní praných v kyselině dusičné (C, D)

3.3.2 Hodnocení pracích metod podle výsledků prvkové analýzy

Krejčová a kol. (2015) porovnávali 6 pracích činidel: horká a studená demineralizovaná voda, kyselina dusičná ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), Triton X-100 (0,5%), EDTA (2%) a čistý aceton. Bylo stanoveno 15 prvků (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr, Ti a Zn; Příloha 1), ve dvou opakováních. Na základě těchto výsledků i výsledků povrchové analýzy bylo dále v experimentu použito praní horkou vodou. Škála prvků byla rozšířena o As, Cd a Pb. Obsahy celkem 18 prvků byly stanoveny v 10 vzorcích nepraných a 10 vzorcích žíní praných v horké vodě. V Tabulce 15 jsou uvedeny průměrné koncentrace (\bar{c}) a procentuální rozdíl mezi nepranými a pranými vzorky (rozdíl koncentrace prvku v nepraných a praných žíních vztahovaný k nepraným žíním, vyjádřeno v procentech). Kompletní data jsou uvedena v Příloze 2. Nalezené výsledky jsou porovnány s předchozími studiemi Krejčové a kol. (2015) graficky (Graf 1, 2, 3).

Pro **arsen**, **kadmium** a **olovo** jsou k dispozici pouze vlastní naměřená data. Po vyprání žíní v horké vodě došlo k výraznému poklesu obsahu všech tří prvků. U olova činil rozdíl mezi nepranými a pranými žíněmi prakticky 100 %.

Tabulka 15: Prvkové složení nepraných žíní a žíní praných v horké vodě

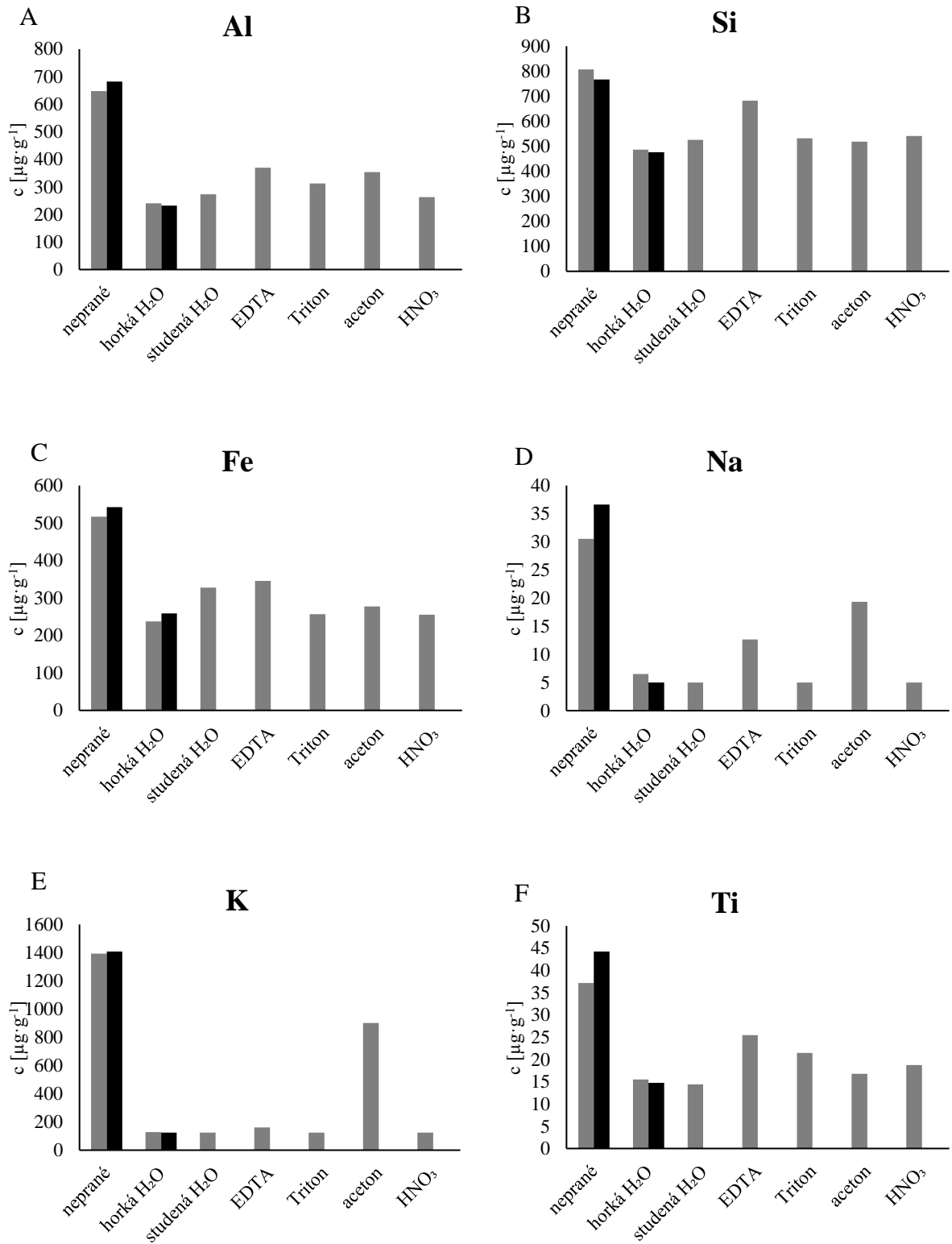
Prvek	Neprané žíně		Prané žíně		Rozdíl
	\bar{c}	RSD	\bar{c}	RSD	
	$[\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$	[%]	$[\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$	[%]	
Al	647	11	241	42	62,8
As	0,164	67	0,0224	76	86,4
Ba	28,5	7,4	24,1	9,0	15,3
Ca	4,88 *	3,1	4,43 *	5,0	9,19
Cd	0,156	16	0,0934	49	40,1
Cu	2,14	43	0,693	3,4	67,6
Fe	517	3,2	238	31	54,0
K	1,39 *	2,2	54,3	7,1	96,1
Mg	1,05 *	2,3	856	14	18,7
Mn	109	3,8	104	10	4,41
Na	30,5	17	6,23	34	79,6
P	915	4,0	745	15	18,6
Pb	4,87	58	0,00	-	100
S	33,4 *	1,7	32,2 *	9,8	3,67
Si	807	16	486	20	39,7
Sr	17,4	3,7	15,3	7,6	12,3
Ti	37,2	13	13,4	23	63,9
Zn	138	10	127	17	7,93

* výsledky v $[\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}]$

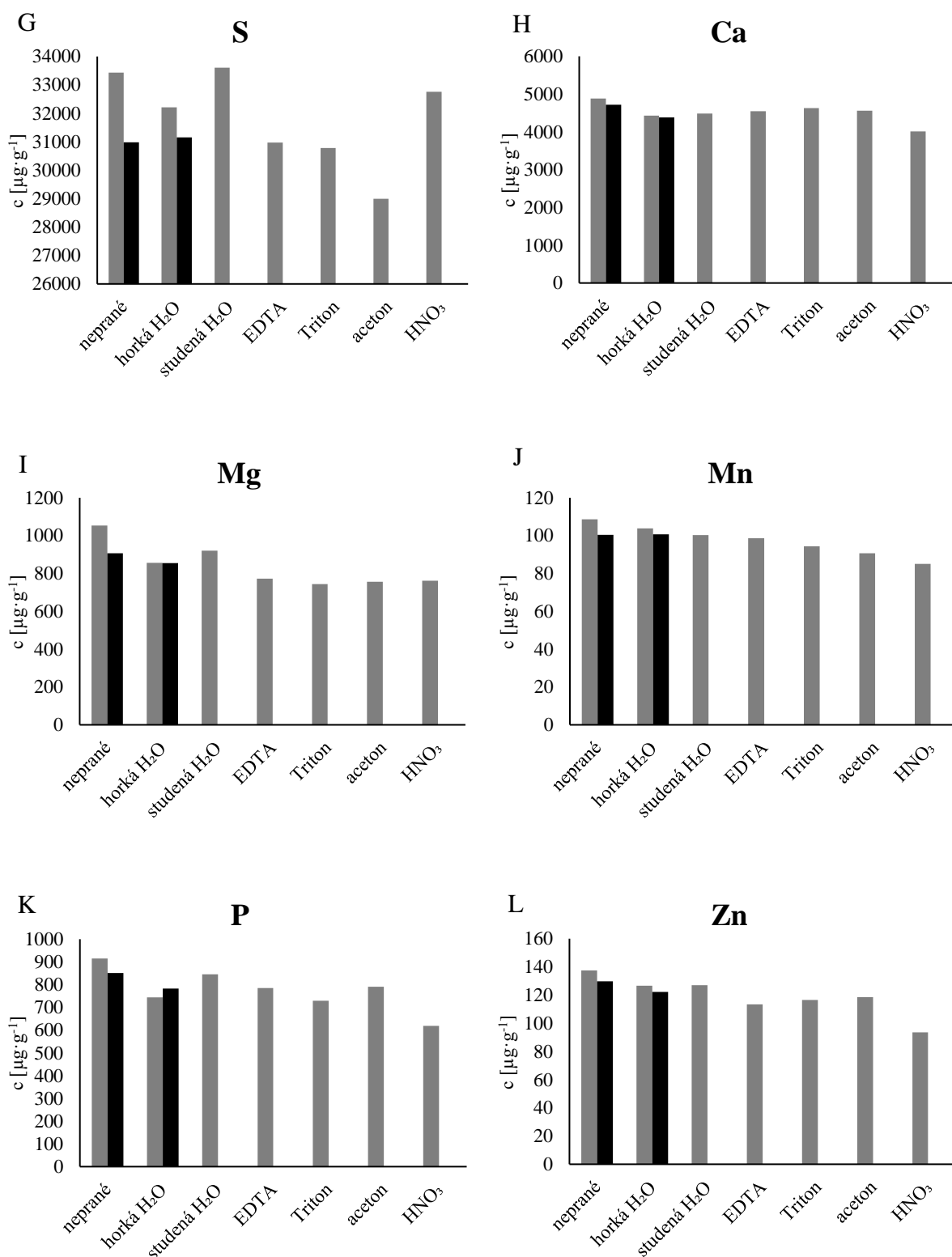
Hliník (Graf 1 A) a **křemík** (Graf 1 B) jsou hojně zastoupeny v zemské kůře a jsou obsaženy i v půdě a prachových částicích. Z obou grafů je patrný velký rozdíl mezi nepranými a pranými žíněmi. Mezi jednotlivými pracími činidly pak nejsou patrné velké rozdíly. Podobná situace nastává i u **železa** (Graf 1 C). Všechny prací metody pravděpodobně odstraní prachové částice. **Sodík** (Graf 1 D) a **draslík** (Graf 1 E) jsou často dávány do spojitosti s pozůstatky potu zvířat, který ulpí na povrchu srstí ve formě krystalků. Byl pozorován rozdíl mezi nepranými a pranými vzorky. Po vyprání všemi metodami kromě acetonu se koncentrace obou prvků snížila na hodnoty blížíící se detekčnímu limitu postupu. U **titanu** (Graf 1 F) se po vyprání všemi metodami také dostáváme na hodnoty detekčního limitu. Obsah **síry** (Graf 2 G) ve vnitřní struktuře koňské žíně je velmi vysoký, řádově kolem 3 %. Vzhledem k tomuto vysokému obsahu je obsah povrchové síry zanedbatelný. Proto nejsou vidět rozdíly mezi nepranými a pranými žíněmi. **Vápník** (Graf 2 H), **hořčík** (Graf 2 I) **mangan** (Graf 2 J), **fosfor** (Graf 2 K) a **zinek** (Graf 2 L) jsou prvky, které jsou obsaženy také ve vnitřní struktuře žíní, ale mohou být i součástí prachových částic. Sledovaná prací činidla poskytla srovnatelné výsledky. Byl zaznamenán rozdíl v koncentracích prvků mezi nepranými a pranými žíněmi. Tyto prvky nejsou příliš vhodné pro hodnocení účinnosti pracích metod. U **barya** (Graf 3 M) a **stroncía** (Graf 3 N) nedochází po vyprání k žádným výrazným změnám v obsahu prvků. Naměřené koncentrace **mědi** (Graf 3 O) byly celkově nízké již na počátku (v nepraných žíních), proto jsou rozdíly mezi jednotlivými pranými zanedbatelné a nehodnotitelné.

Všechny prací postupy odstranily povrchovou kontaminaci prachem. Při použití kyseliny dusičné došlo k narušení struktury povrchu. Na základě výsledků lze konstatovat, že praní splnilo účel. Jiným způsobem hodnocení účinnosti praní je analýza pracích roztoků po provedení procedury. Toto využila ve své diplomové práci Niemczyková, ovšem bez jasného závěru. Problémem byly nízké koncentrace analytů na úrovni detekčních limitů ICP-OES metody. Bylo by možné hodnotit složení roztoků po opakovaném praní – zejména při použití kyseliny dusičné. Pokud by docházelo k narušení žíní/vlasů, do pracích roztoků by se dostaly právě prvky, které odpovídají vnitřnímu složení.

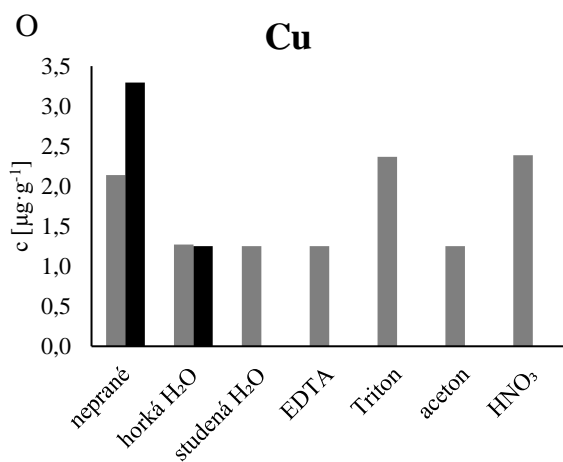
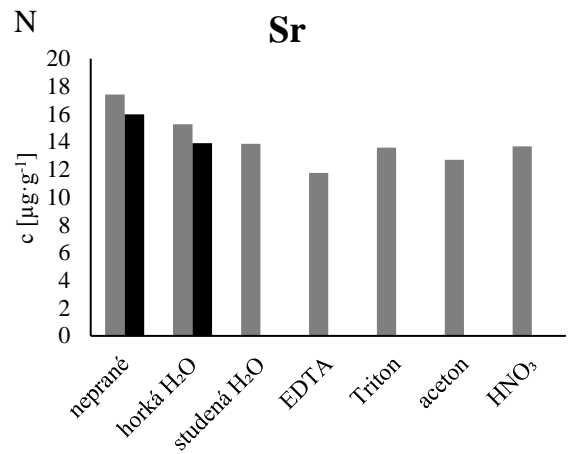
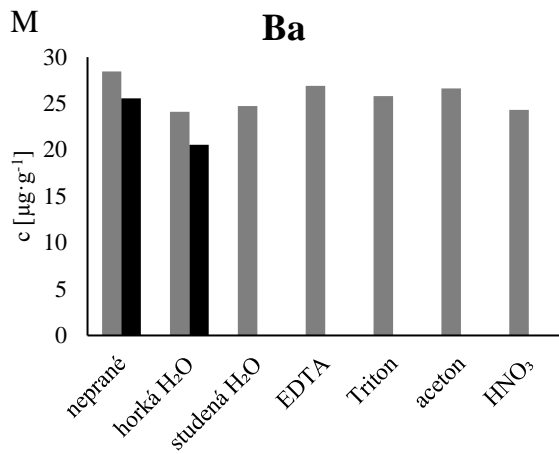
Metoda praní žíní v horké vodě byla na základě výsledků mikroskopické analýzy, povrchové analýzy a prvkové analýzy koňských žíní určena jako nejvhodnější metodou pro naše účely. Tato metoda je jednoduchá na přípravu, dostupnost chemikálií a je šetrná k životnímu prostředí.



Graf 1 (A – F): Porovnání obsahu prvků v nepraných žíních a po vyprání různými pracími metodami (vlastní měření ■, Krejčová a kol. (2015) ■)



Graf 2 (G – L): Porovnání obsahu prvků v nepraných zíních a po vyprání různými pracími metodami (vlastní měření ■, Krejčová a kol (2015) ■) (2. část)



Graf 3 (M – O): Porovnání obsahu prvků v nepraných žiních a po vyprání různými pracími metodami (vlastní měření ■, Krejčová a kol (2015) ■) (3. část)

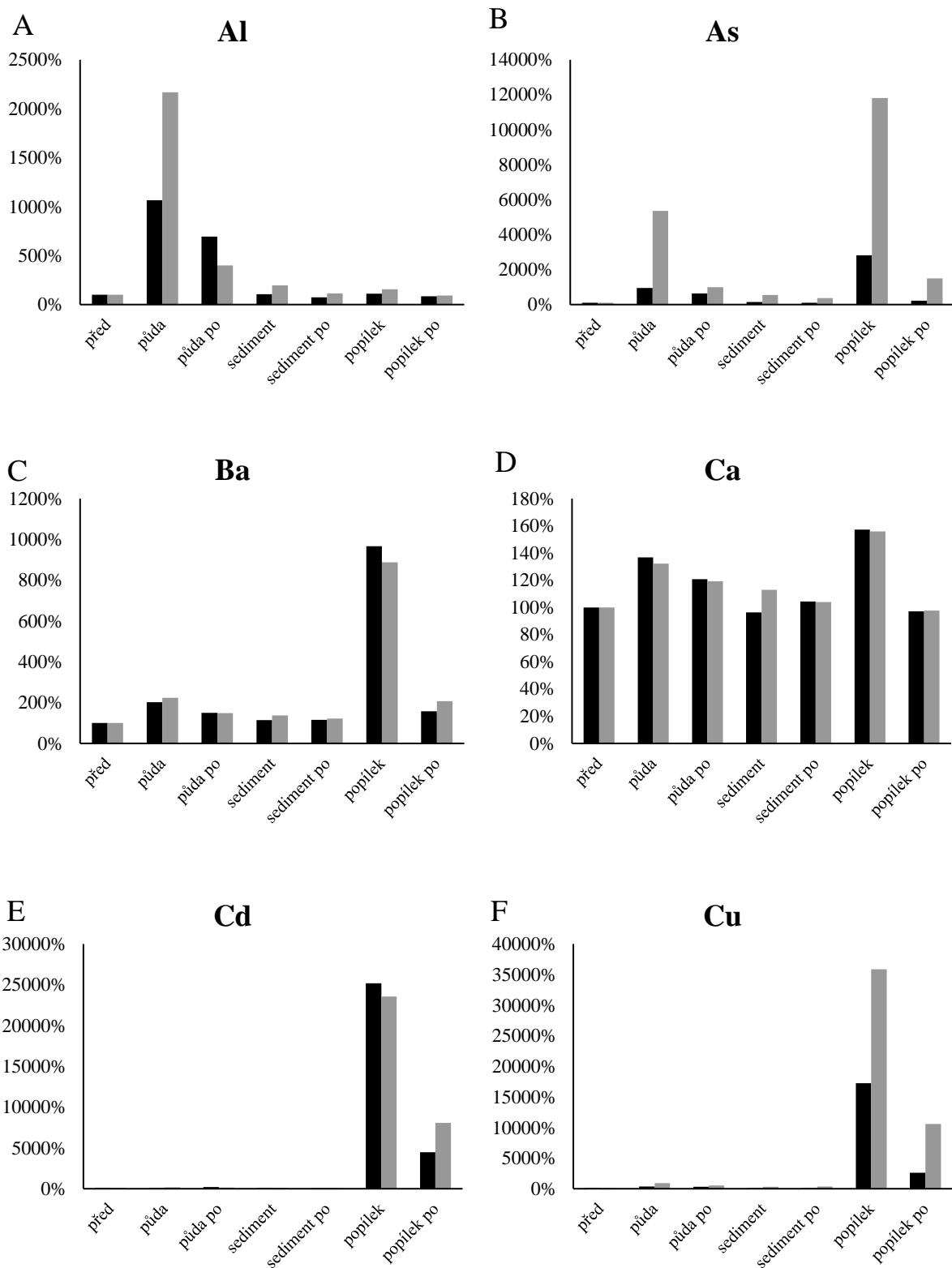
3.4 Hodnocení kontaminačních pokusů

V další části práce bylo zkoumáno, zda je prací metoda s horkou vodou schopna odstranit exogenní kontaminaci. Koňské žíně byly podrobeny kontaminačnímu pokusu se třemi pevnými látkami a s roztokem simulovaného potu s přídatkem vybraných prvků.

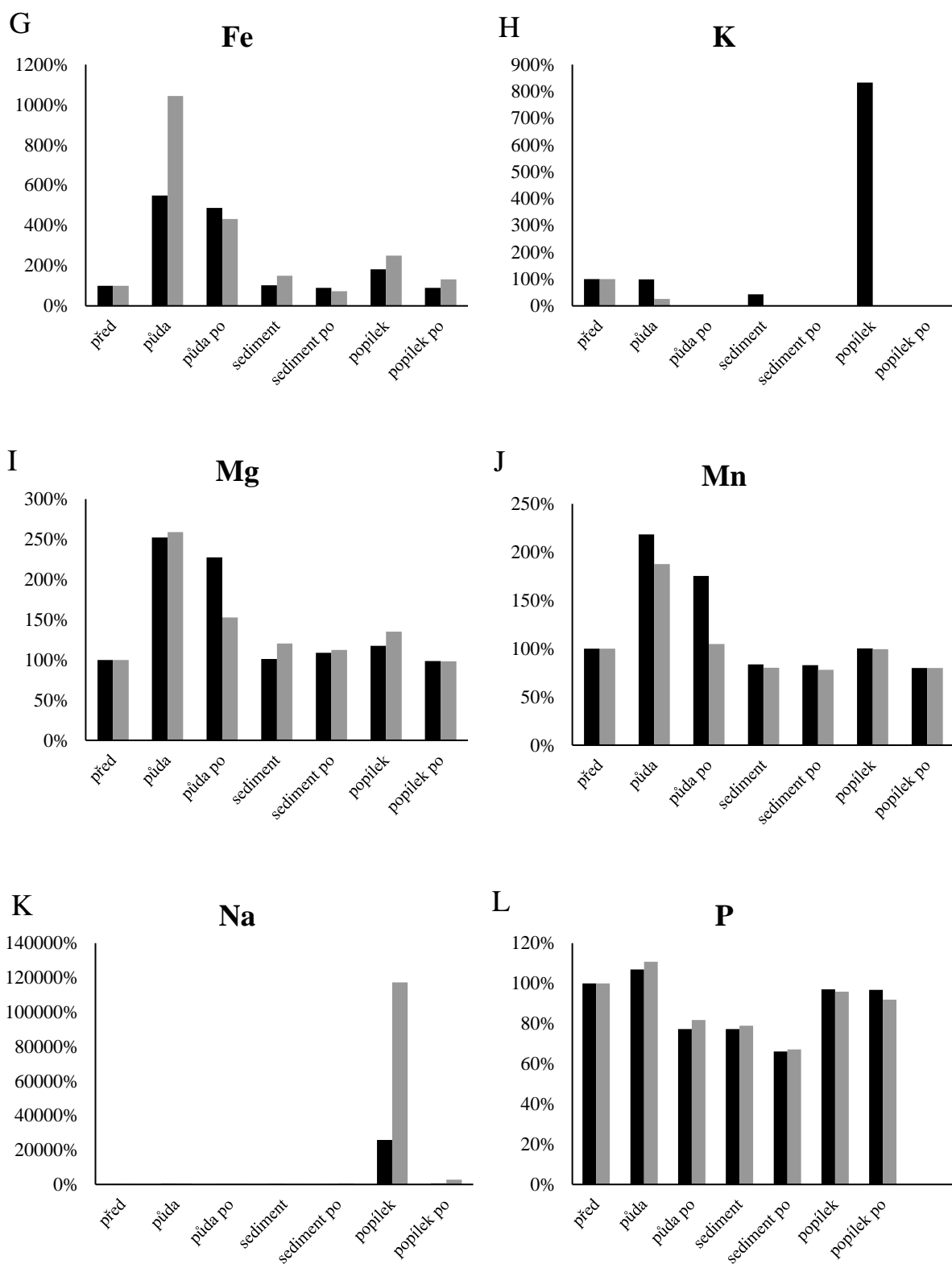
Pevné kontaminanty byly vybrány s ohledem na dostupnost vzorků v archivu laboratoře a také na reálné možnosti kontaminace koňské žíně v přírodě. Půda byla zvolena na základě běžného kontaktu koně s půdou, hlínou, prachem. Sediment byl zvolen převážně z důvodu jeho dostupnosti v archivu a také by mohl simulovat kontakt koně s bahnem nebo pískem. Popílek v našem experimentu simuluje emise znečišťující ovzduší. Různorodost kontaminantů je také díky jejich různému podílu organické hmoty. Nejvíce organické hmoty obsahuje půda, méně sediment, popílek obsahuje organické hmoty minimum, neboť byl spálen. Podíl anorganické a organické hmoty do značné míry ovlivňuje sorpční schopnosti materiálů, tudíž i množství kovů na nich zachycené. Popílek obsahuje velmi vysoké hladiny draslíku, zinku, sodíku, síry a vápníku, půda značné množství hliníku, vápníku, fosforu, železa, hořčíku. Koncentrace prvků v sedimentu byly o několik řádů nižší než u popílku a půdy; nejvíce bylo v sedimentu nalezeno vápníku (kapitola 2.5.1, Tabulka 9).

Kontaminace žíní probíhala 15 hod za stálého třepání (kapitola 2.5.1). 4 vzorky nepraných žíní a 4 vzorky žíní praných v horké vodě byly postupně kontaminovány půdou, sedimentem a popílkem. Ke každým 4 vzorkům byl připraven také slepý mineralizační pokus. Po kontaminaci a vysušení byly žíně rozděleny na dvě poloviny – jedna byla ponechána beze změn a druhá polovina byla vyprána v horké vodě. Kvůli případné kontaminaci z přípravného postupu byly analyzovány také veškeré oplachové vody z punčochy, pomocí které byly kontaminanty oddělovány. V těchto oplachových vodách nebyly detekovány sledované prvky. Kontaminace pevnými látkami byla hodnocena pomocí sloupcových grafů (Grafy 4, 5, 6). Do grafu pro jednotlivý prvek byla relativně vynesena koncentrace prvku v žíních (napraných a praných) před kontaminací, v kontaminovaných žíních a po kontaminaci s následným vypráním v horké vodě.

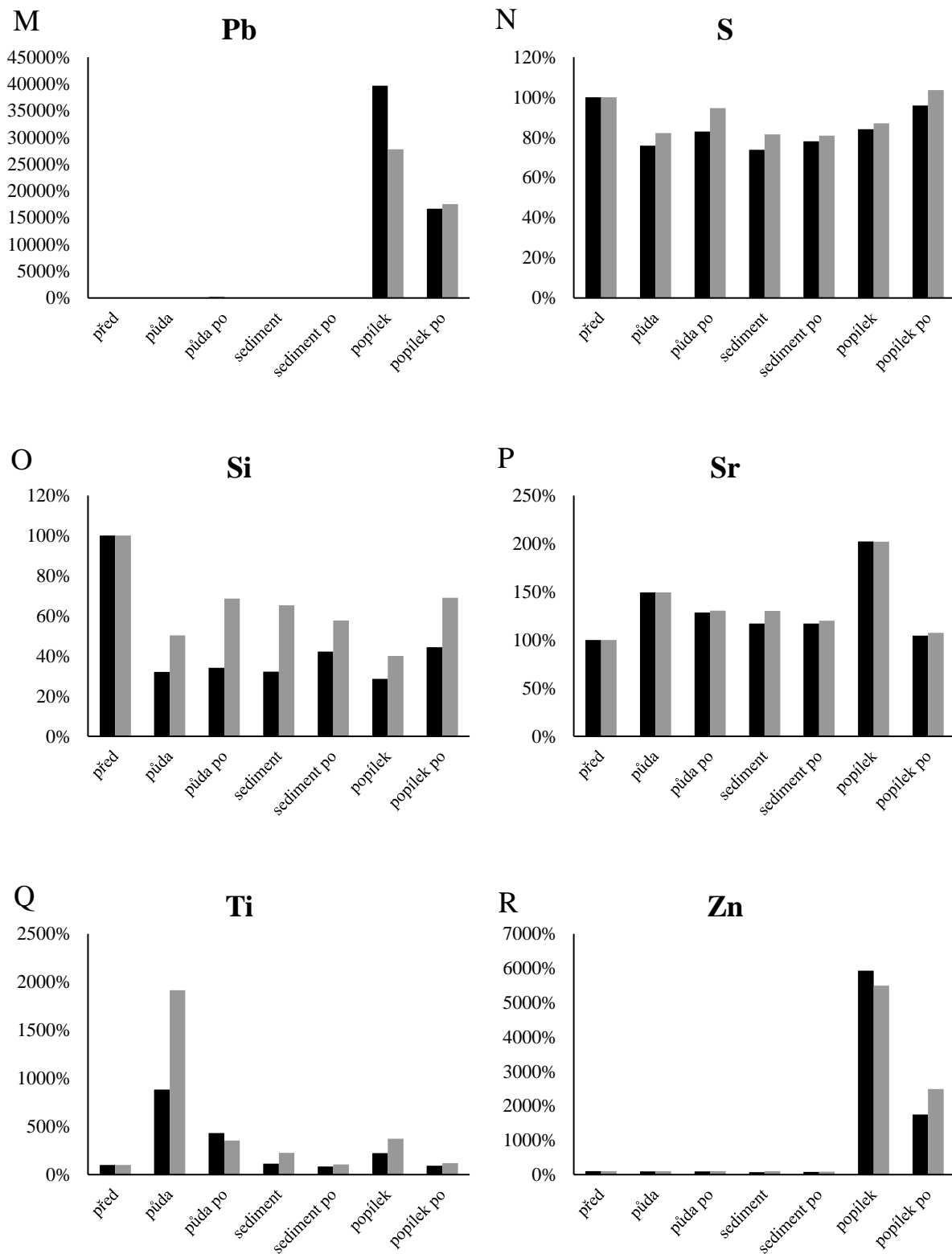
Prané žíně většinou navázaly větší množství prvků než neprané. Praním byla pravděpodobně z žíní odstraněna ochranná vrstva tuku, díky čemuž se mohly kontaminující prvky lépe na vlasy adsorbovat. Praní horkou vodou po kontaminaci většinou snížilo hladiny adsorbovaných prvků.



Graf 4 (A – F): Kontaminace pevnými látkami (neprané žíně ■, prané žíně ■), před – před kontaminací, po – po vyprání v horké vodě



Graf 5 (G – L): Kontaminace pevnými látkami (neprané žíně ■, prané žíně ■), před – před kontaminací, po – po vyprání v horké vodě (2. část)



Graf 6 (M – R): Kontaminace pevnými látkami (neprané zíně ■, prané zíně ■), před – před kontaminací, po – po vyprání v horké vodě (3. část)

Kontaminace **simulovaným potem s přidavkem prvků** vycházela ze studia literatury (Bate, 1966; Mattera, 1981; Morton a kol., 2002 a Li, 2008). Roztok simulovaného potu byl zvolen, protože může zásadně ovlivnit zabudování prvků do struktury vlasu/žíně. Jeho složení vycházelo z fyziologického složení lidského potu. K roztoku simulovaného potu byly přidány prvky As, Cd, Cu, Pb a Zn v různých koncentracích. Prvky byly vybrány na základě informace, kde se běžně mohou vyskytovat. Arsen se vyskytuje ve vzduchu v okolí metalurgických závodů nebo spaloven uhlí. Zdrojem kadmia může být kouření. Měď se běžně vyskytuje v pitné vodě, která je rozváděna měděnými trubkami a také je zde kvůli své antibakteriální funkci. Olovo je přítomno v barvách na vlasy a v prachových částicích. Zinek je obsažen ve vnitřní struktuře vlasů/žíní a je například v kosmetických přípravcích proti lupům (Bhat a kol., 1979; Afridi a kol., 2008a; Robbins, 2012).

Byly testovány 3 různé faktory, které by mohly ovlivnit adsorpci prvků na povrch žíní, a to koncentrace prvků v daném kontaminačním roztoku, pH roztoku a délka kontaminace. Byly vybrány 3 koncentrační úrovně: 0,1; 1 a 10 mg · l⁻¹. pH kontaminačního roztoku bylo upraveno na hodnoty 3; 5,5 a 8. Žíně byly kontaminovány po dobu: 1, 6 a 24 hodin. Polovina kontaminovaných žíní byla vysušena. Druhá polovina byla po kontaminaci vyprána v horké vodě (dle postupu uvedeném v kapitole 2.6.1) a vysušena. 2 vzorky kontaminovaných nepraných žíní a 2 vzorky vypraných žíní byly rozloženy a analyzovány. Ke každé sérii vzorků byly připraveny slepé mineralizační pokusy, ve kterých nebyly detekovány sledované prvky. Se stejnými výsledky dopadla také analýza samotného roztoku simulovaného potu.

Doba kontaminace, tak jak byla v této práci zvolena, pravděpodobně neovlivňuje míru kontaminace. Z výsledků je patrné, že již po hodině je v žíních ustavena rovnováha. Adsorpční proces probíhá pravděpodobně velmi rychle. Mezi dalšími zvolenými časy nebyly znatelné rozdíly, proto byla délka kontaminace v této práci zanedbána a výsledky pro všechny časy zprůměrovány. Hodnocení nebylo provedeno statisticky, ale prostým porovnáním výsledků a grafickým zpracováním.

Vliv pH (Grafy 7, 8, 9) při kontaminačním pokusu není z grafického hodnocení tolik patrný, získané výsledky pro všechny úrovně pH se jeví jako velmi podobné u arsenu, kadmia a zinku. Rozdíly jsou viditelné u olova a mědi. Množství adsorbovaného kovu je větší při nižších pH. Tento závěr není statisticky podložen.

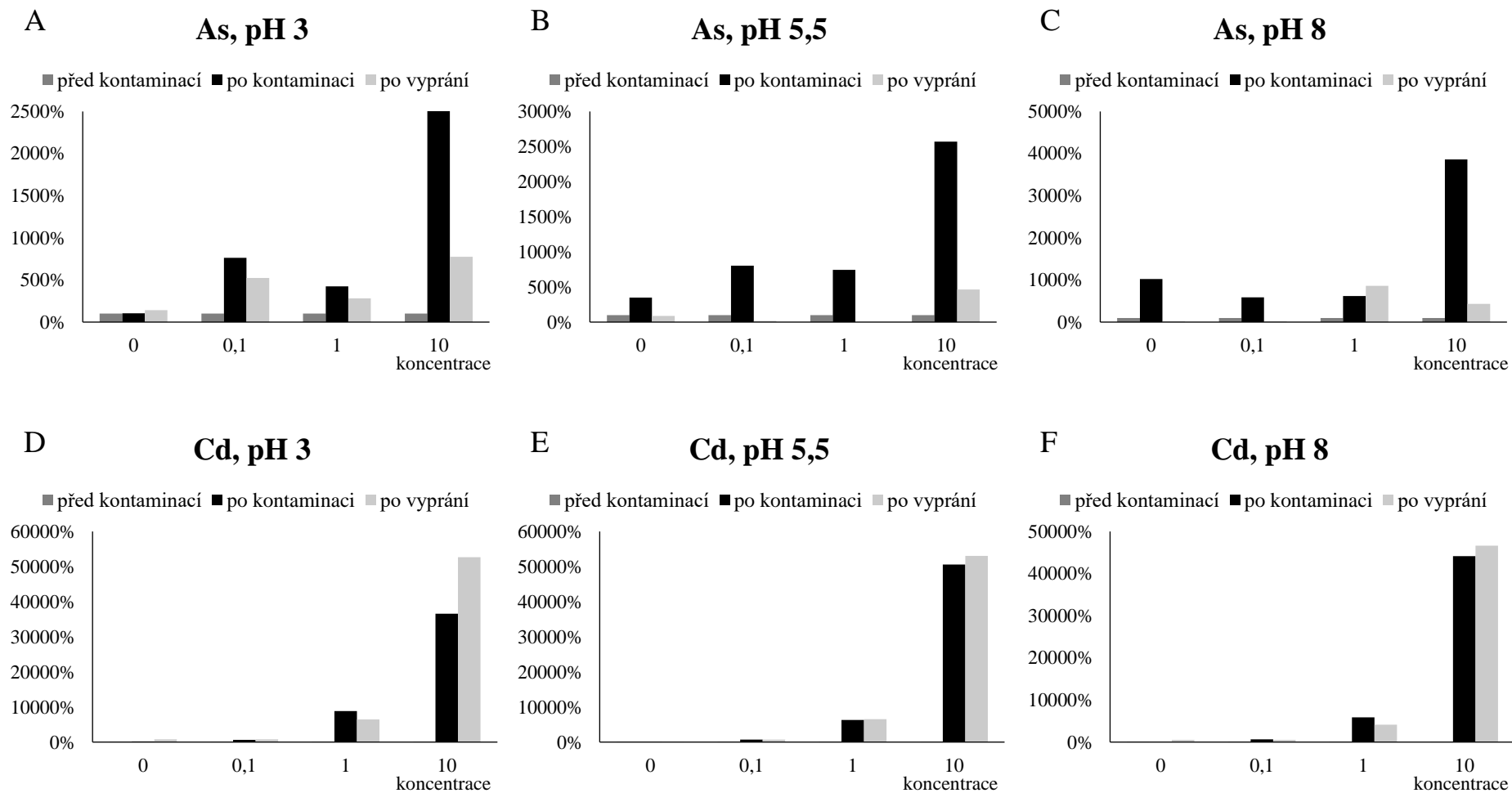
Zásadní roli v procesu kontaminace žíní simulovaným roztokem potu s přidavkem prvků hraje zcela jednoznačně **koncentrace** vybraných prvků. Z grafů je zjevné, že se zvyšující se koncentrací prvků v kontaminujícím potu se zvyšuje míra adsorpce na povrch žíní. Tento jev se objevuje u všech pěti prvků. Důležitý je i poměr mezi koncentrací v původních žíních a v umělém potu.

Zinku je obsaženo v nepraných žíních asi $140 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ a v praných asi $130 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Z grafu (Graf 9 M – O) je vidět, že při nižších koncentracích (0; 0,1 a $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) je obsah v nepraných žíních před kontaminací vyšší než po kontaminaci. Může to být způsobeno tím, že se zinek částečně vypral do kontaminačního roztoku. Při vysoké koncentraci prvků ($10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) v kontaminačním roztoku je obsah zinku po pokusu vyšší než před kontaminací asi 1,5x.

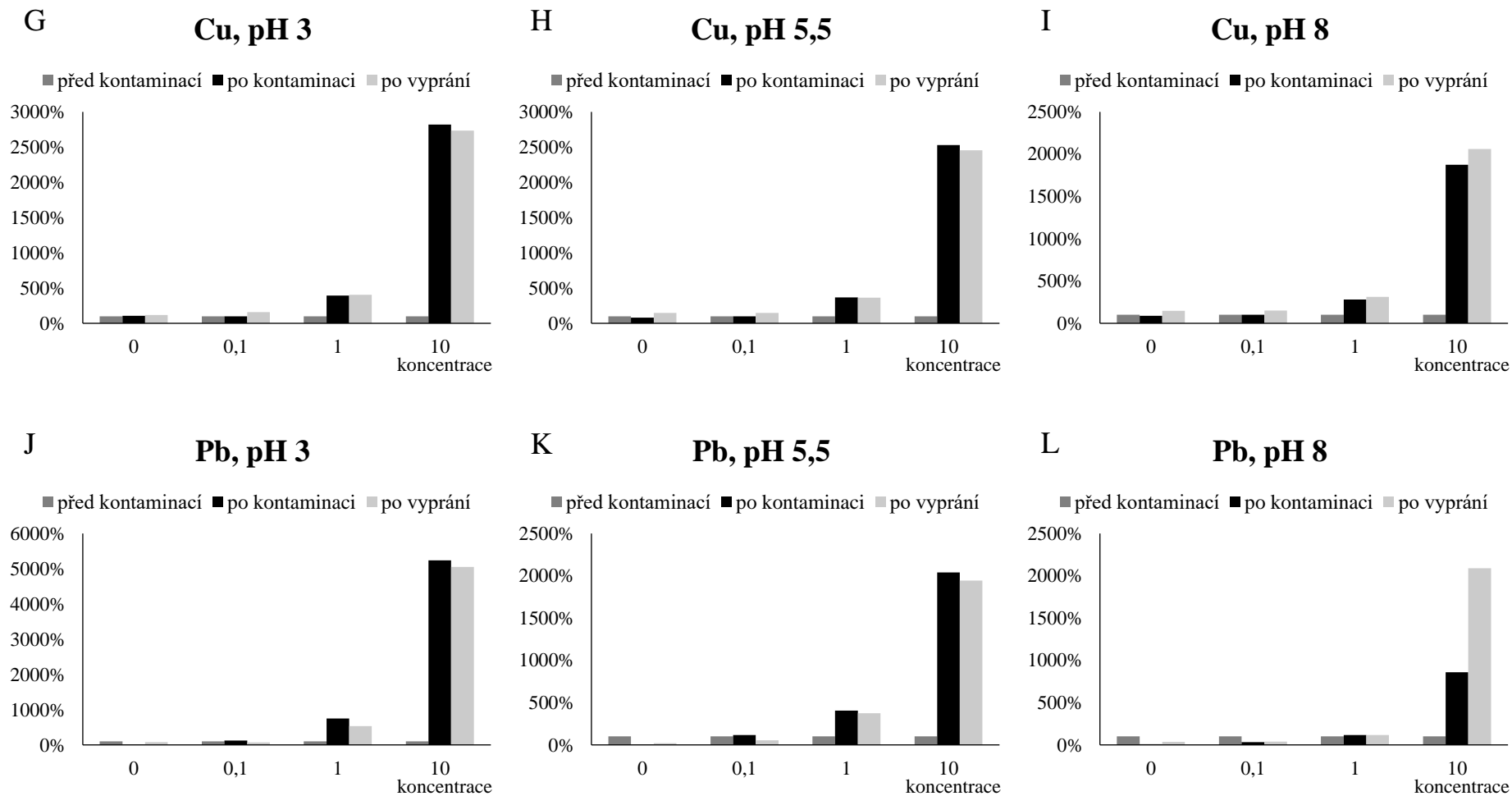
Obsah **mědi** (Graf 8 G – I) v nepraných žíních na počátku byl poměrně malý (asi $2,1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Adsorpce je viditelná až u koncentrace nad $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. U koncentrací kovu v umělém potu $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ je obsah mědi po vyprání zvýšen oproti počátku zhruba 30x. Po vyprání v horké vodě došlo k menšímu poklesu hladin mědi.

Olovo (Graf 8 J – L), **arsen** (Graf 7 A – C) a **kadmium** (Graf 7 D – F) jsou v žíních obsaženy ve stopovém množství. Oproti předchozím dvěma prvkům, které jsou pro organismus esenciální, jsou to typické toxické kovy. Je zaznamenán vliv koncentrace kovu v kontaminujícím roztoku i pH pro olovo – s klesajícím pH a zvyšující se koncentrací roste adsorbované množství olova až 60x oproti původním žíním na začátku pokusu. Podobný, zhruba 60násobný nárůst obsahu kovu je pozorován i u arsenu, u kterého je vliv pH spíše opačného charakteru. Nejvyšší množství adsorbovaného kovu v tomto pokusu bylo sledováno u kadmia, a to až 600násobné oproti koncentraci před začátkem pokusu.

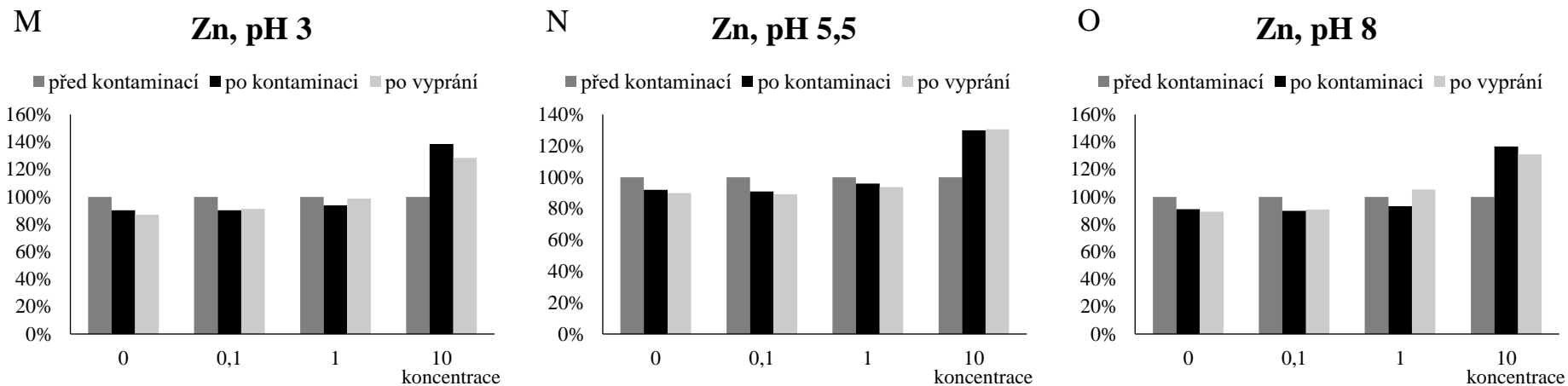
Z výsledků vyplývá, že pro kontaminaci koňských žíní roztokem simulovaného potu s přidavkem prvků je postačující doba kontaminace 1 hodina. pH při kontaminaci zdá se nehraje tak významnou roli. Nejdůležitějším parametrem je koncentrace vybraných prvků v kontaminačním roztoku.



Graf 7 (A – F): Kontaminace simulovaným potem s přidavkem prvků o různých koncentracích při různém pH



Graf 8 (G – L): Kontaminace simulovaným potem s přidavkem prvků o různých koncentracích při různém pH (2. část)



Graf 9 (M – O): Kontaminace simulovaným potem s přidavkem prvků o různých koncentracích při různém pH (3. část)

3.5 Hodnocení experimentu

Cílem diplomové práce bylo nalezení vhodného postupu praní a mikrovlnné mineralizace vzorku, který byl dále použit v práci. Dále navržení laboratorního pokusu, na základě kterého bylo možné vyhodnotit dopad externí kontaminace a účinnost pracích postupů.

Vzorek koňských žíní, který byl na pracovišti k dispozici, byl získán v roce 2015 z českobudějovického hřebčína Siglavy. Částečné obavy vzbuzovala možná nehomogenita směsného vzorku, který pocházel od různých koní, různého pohlaví, věku i barvy srsti, což jsou všechno faktory zmiňované v souvislosti s prvkovou analýzou. Variabilitu materiálu lze posoudit podle výsledků opakovaných měření. Variabilita jednotlivých vzorků je srovnatelná (viz Tabulka 16), vzorek se jeví jako vhodný pro účely této práce.

Tabulka 16: Porovnání výsledků opakovaných měření

Prvek	RSD [%]			
	Neprané žíně	Prané žíně	CRM	Standardní roztoky
Al	11,3	42,0	7,19	0,865
Ba	7,44	8,99	9,38	0,161
Ca	3,05	5,04	4,23	0,0566
Fe	3,23	30,9	8,95	0,0639
Mg	2,34	13,5	2,74	0,616
Mn	3,77	10,4	15,4	1,063
P	4,03	15,2	5,71	0,206
S	1,74	9,77	1,87	0,805
Si	15,9	20,1	9,71	0,0462
Sr	3,68	7,59	4,90	0,592
Ti	13,2	19,4	12,3	0,0922
Zn	10,1	16,9	3,09	4,98

Volba analyzovaných prvků vycházela z informací dostupných v literatuře. Prvky byly dány do souvislosti s jejich možným výskytem v prachových částicích (As, Si), v potu (Na, K) nebo souvisejí s vnitřní strukturou žíně (S, Zn). Pro účely praní byly vhodné všechny prvky kromě S, která se vyskytuje ve velkém množství ve vnitřní struktuře žíně (až 3%). Pro účely kontaminačních studií se výběr prvků také jeví jako vyhovující. Zinek a měď jsou prvky esenciální a jsou obsaženy v žíních řádově více než typicky toxické prvky (As, Cd, Pb). Z celkové škály 18 testovaných prvků by se dalo dále vybírat, zredukovat jejich počet pro zkrácení doby analýzy.

Činidla pro hodnocení účinnosti pracích postupů reprezentovala používané chemikálie a metody ve studiích. Experiment ukázal na možný mechanismus praní pomocí mechanického účinku. K lepšímu objasnění mechanismů praní by mohla přispět analýza oplachových vod a pracích činidel po jejich použití. U oplachových vod se však obvykle dostáváme na hranice detekčních limitů metody. Po vyprání v kyselině dusičné je částečně narušený povrch žíně – to by se dalo prokázat nárůstem koncentrace prvků vnitřní struktury (S, Zn) v činidle po praní. Prací postupy přispívají k odstranění povrchových nečistot spíše než látek adsorbovaných na povrchu žíně.

Kontaminační studie měla rozlišit účinek praní po kontaminaci prachovými částicemi a látky adsorbované na povrchu žíně. V optimálním případě bychom po kontaminaci a vyprání měli dostat původní obsahy kovů před začátkem pokusu. U pevných kontaminantů záleželo na původní koncentraci kovu v žíních a na jejich koncentraci v kontaminujícím materiálu. Obsahy se lišily prvek od prvku. Některé prvky byly vyprány až na původní koncentrace, některé nikoliv. Bylo zjištěno, že záleží i na velikosti částic pevného materiálu. U velmi jemného popílku patrně přispívají k zachycení na povrch žíně i elektrostatické síly více než u půdy nebo sedimentu, které jsou hrubší. V druhé části kontaminačního pokusu se jedná spíše o mechanismus zachycení kovů adsorpcí. Uplatnil se vliv poměru koncentrací v žíních i v kontaminačním roztoku. Zároveň je patrný vliv pH, kdy při nižších hodnotách je adsorpce výraznější. Ustanovení rovnováhy je nejspíše velmi rychlé, neboť při nastavených časech nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v koncentracích kovů v žíních po konečném vyprání. Horká voda není schopná v jednom pracím kroku tyto adsorbované kovy odstranit. Kontaminační studie přinesla cenné informace – prachové částice jdou odstranit praním, adsorbované prvky spíše ne. Je otázkou, zda by se lépe uplatnila prací metoda s použitím HNO_3 .

ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše podávající informace o současné prvkové analýze vlasů, koňských žíní, případně srstí jiných zvířat. V práci jsou popsány metody přípravy vzorku před analýzou, způsoby praní vzorků a jejich rozklad, možné ovlivňující faktory či kontaminace a konkrétní analytické techniky vhodné pro detekci prvků. Rešerše obsahuje také poznatky o referenčních hodnotách, spojitosti obsahu prvků ve vlasech s nemocemi i vypovídací schopnosti komerčně nabízených analýz.

Pro experimentální část byly získány vzorky koňských žíní, pro které byl navržen postup přípravy k analýze. Vzorky byly za pomoci keramických nůžek nastříhány a uchovávány v plastové láhvi. Byla optimalizována prací metoda s horkou vodou a teplotní program mikrovlnného rozkladu vzorku. Optimální délka praní činila 10 minut, kdy byla lahvička s jedním gramem žíní a 50 ml horké demineralizované vody umístěna do ultrazvuku. Následně byly žíně propláchnuty 3x demineralizovanou vodou. V žíních bylo sledováno celkem 18 prvků pomocí metod ICP-OES a ICP-MS. Byly optimalizovány pracovní podmínky ICP-OES pro stanovení prvků: Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Si, Sr, Ti a Zn a podmínky ICP-MS pro stanovení As, Cd a Pb. Jako interní standardy pro metodu ICP-MS byly použity In a Rh.

K validaci obou metod byl použit certifikovaný referenční materiál lidských vlasů (GBW 07601). Opakovatelnost analýzy referenčního materiálu se pohybovala v rozmezí od 1,9 do 29 %. Pro zjištění, zda při mineralizaci nedochází ke kontaminaci, byly připraveny slepé mineralizační pokusy, u kterých byly sledované prvky opakovaně pod detekčním limitem postupu. Pomocí kalibračních standardů byla pravidelně ověřována dlouhodobá opakovatelnost, a to během každé analýzy minimálně 3x. RSD kalibračních standardů bylo v rozmezí 0,046 – 9,1 %. Pro obě techniky byly stanoveny detekční limity postupů, které se pro ICP-OES pohybovaly od 0,250 do 500 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ a pro ICP-MS od 0,017 do 0,12 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Pro hodnocení účinnosti pracích metod byla struktura žíní pozorována pod elektronovým mikroskopem a byla provedena povrchová i prvková analýza. Pro porovnání pracích metod byla použita data z předchozí studie provedené na pracovišti (Krejčová a kol., 2015) i vlastní naměřená data. Výsledky prvkové analýzy byly shrnuty v tabulkách a porovnány pomocí grafových výstupů. Z výsledků vyplývá, že praní vzorku splnilo účel. Všechny prací postupy odstranily povrchovou kontaminaci. Analýzou povrchu žíně elektronovým

mikroskopem bylo zjištěno, že při použití kyseliny dusičné dochází k narušení struktury povrchu. Metoda praní žíní v horké vodě byla na základě výsledků všech analýz určena nejvhodnější metodou. U kontaminačních pokusů s pevnými částicemi byly horkou vodou částečně odstraněny povrchové částice. Jednorázové praní horkou vodou nebylo schopno odstranit adsorbované prvky pocházející z kontaminačního roztoku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AAS or ICP-OES—Are They Competing Techniques? GBC Scientific Equipment: ICP-OES Application Notes [online]. Illinois, USA, 2000 [cit. 2017-04-10].

AFRIDI, H. I., T. G. KAZI, G. H. KAZI, M. K. JAMALI a G. Q. SHAR. Essential trace and toxic element distributions in the scalp hair of Pakistani myocardial infarction patients and controls. *Biological Trace Element Research* [online]. 2006, **113**, 19-34 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1385/BTER:113:3.

AFRIDI, H. I., T. G. KAZI, N. KAZI, G. A. KANDHRO, J. A. BAIG, A. Q. SHAH, M. K. JAMALI a M. B. ARAIN. Evaluation of Toxic Elements in Scalp Hair Samples of Myocardial Infarction Patients at Different Stages as Related to Controls. *Biological Trace Element Research* [online]. 2010, **134**(1), 1-12 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s12011-009-8450-6. ISSN 0163-4984.

AFRIDI H. I., T. G. KAZI, M. K. JAMALI, N. G. KAZI, M. B. ARAIN, N. JALBANI a G. Q. SHAR. Analysis of heavy metals in scalp hair samples of hypersensitive patients by conventional and microwave digestion method. *Spectroscopy Letters* [online]. 2006, **39**(2), 203-214 [cit. 2016-11-02]. DOI: 10.1080/00387010500531266. ISSN 0038-7010.

AFRIDI, H. I., T. G. KAZI, N. G. KAZI, a kol. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. *Journal of Human Hypertension* [online]. 2009, **24**(1), 34-43 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1038/jhh.2009.39. ISSN 0950-9240.

AFRIDI H. I., T. G. KAZI, N. KAZI, a kol. Potassium, Calcium, Magnesium and Sodium Levels In Biological Samples of Hypertensive and Nonhypertensive Diabetes Mellitus Patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2008b, **124**(3), 206-224 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1007/s12011-008-8142-7. ISSN 0163-4984.

AFRIDI H. I., T. G. KAZI, N. KAZI, M. K. JAMALI, M. B. ARAIN, N. JALBANI, J. A. BAIG a R. A. SARFAZ. Evaluation of status of toxic metals in biological samples of diabetes mellitus patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* [online]. 2008a, **80**(2), 280-288 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1016/j.diabres.2007.12.021. ISSN 01688227.

Analýza prvků z vlasů – zdravotní program. *NZOZ biomolmed* [online]. 2017 [cit. 2017-04-19].

Analýza stopových prvků ve vlasech: laboratoř Biomol-MED. *Komplexní zdraví* [online]. 2017 [cit. 2017-04-19].

ASANO, K., K. SUZUKI, M. CHIBA, K. SERA, T. MATSUMOTO, R. ASANO a T. SAKAI. Correlation Between 25 Element Contents in Mane Hair in Riding Horses and Atrioventricular Block. *Biological Trace Element Research* [online]. 2005a, **108**(1-3), 127-136 [cit. 2017-02-06]. DOI: 10.1385/BTER:108:1-3:127. ISSN 0163-4984.

ASANO, K., K. SUZUKI, M. CHIBA, K. SERA, T. MATSUMOTO, R. ASANO a T. SAKAI. Influence of the Coat Color on the Trace Elemental Status Measured by Particle-Induced X-ray Emission in Horse Hair. *Biological Trace Element Research* [online]. 2005b, **103**(2), 169-176 [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.1385/BTER:103:2:169. ISSN 0163-4984.

ASANO, R., 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* [online]. 2002, **64**(7), 607-610 [cit. 2016-11-28]. DOI: 10.1292/jvms.64.607. ISSN 09167250.

AYDIN, I. Comparison of dry, wet and microwave digestion procedures for the determination of chemical elements in wool samples in Turkey using ICP-OES technique. *Microchemical Journal* [online]. 2008, **90**(1), 82-87 [cit. 2017-02-12]. DOI: 10.1016/j.microc.2008.03.011. ISSN 0026265x.

BARRETT, S. Commercial Hair Analysis. *JAMA* [online]. 1985, **254**(8), 1041-5 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1001/jama.1985.03360080053028. ISSN 0098-7484.

BATE, L. C. Adsorption and elution of trace elements on human hair. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1966, **17**(7), 417-423. DOI: 10.1016/0020-708X(66)90068-8. ISSN 0020708x.

BENDA KOVSKÁ, L. *O-TOF-ICP-MS analýza prvků vzácných zemin v řasách a vodách*. Pardubice, 2013. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Anna Krejčová, PhD.

BENDERLI CIHAN, Y., S. SÖZEN a S. ÖZTÜRK YILDIRIM. Trace Elements and Heavy Metals in Hair of Stage III Breast Cancer Patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **144**(1-3), 360-379 [cit. 2016-11-02]. DOI: 10.1007/s12011-011-9104-z. ISSN 0163-4984.

BHAT, G. R., E. R. LUKENBACH, R. R. KENNEDY a R. M. PARREIRA. The green hair problem: a preliminary investigation. *Journal of the Society of Cosmetic Chemist* [online]. 1979, **30**, 1-8 [cit. 2016-11-16].

BORELLA, P., A. BARGELLINI, E. CASELGRANDI a L. PICCININI. Observations on the Use of Plasma, Hair and Tissue to Evaluate Trace Element Status in Cancer. *Journal of Trace Elements in Medical Biology*[online]. 1997, **11**, 162-165 [cit. 2016-11-02].

BORELLA, P., S. ROVESTI, E. CASELGRANDI a A. BARGELLINI. Quality control in hair analysis: A systematic study on washing procedures for trace element determinations. *Mikrochimica Acta* [online]. 1996, **123**(1-4), 271-280 [cit. 2016-02-22]. DOI: 10.1007/BF01244400. ISSN 0026-3672.

CARNEIRO, M. F. H., D. GROTTTO, B. L. BATISTA, C. R. RHODEN a F. BARBOSA. Background Values for Essential and Toxic Elements in Children's Nails and Correlation with Hair Levels. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **144**(1-3), 339-350 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1007/s12011-011-9102-1. ISSN 0163-4984.

COOPER, G. A. A., R. KRONSTRAND a P. KINTZ. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Science International* [online]. 2012, **218**(1-3), 20-24 [cit. 2016-11-18]. DOI: 10.1016/j.forsciint.2011.10.024. ISSN 03790738.

CZERNY, B., K. KRUPKA, M. OŻAROWSKI a A. SEREMAK-MROZIKIEWICZ. Screening of Trace Elements in Hair of the Female Population with Different Types of Cancers in Wielkopolska Region of Poland. *The Scientific World Journal* [online]. 2014, **2014**, 1-15 [cit. 2016-11-06]. DOI: 10.1155/2014/953181. ISSN 2356-6140.

ČERNOHORSKÝ, T. a P. JANDERA. *Atomová spektroskopie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997, 218 s. ISBN 80-7194-114-X.

ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1997, 655 s. ISBN 80-7169-140-2.

DE PALMA, G., S. CATALANI, A. FRANCO, M. BRIGHENTI a P. APOSTOLI. Lack of Correlation Between Metallic Elements Analyzed in Hair by ICP-MS and Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. 2012, **42**(3), 342-353 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s10803-011-1245-6. ISSN 0162-3257.

DŁUGASZEK, M. a K. KOPCZYŃSKI. Correlations Between Elements in the Fur of Wild Animals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2014, **93**(1), 25-30 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1007/s00128-014-1260-3. ISSN 0007-4861.

DŁUGASZEK, M., M. SZOPA, J. RZESZOTARSKI a P. KARBOWIAK. Magnesium, calcium and trace elements distribution in serum, erythrocytes, and hair of patients with chronic renal failure. *Magnesium Research* [online]. 2008, **21**(2), 109-117 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1684/mrh.2008.0135.

DONGARRÀ, G., M. LOMBARDO, E. TAMBURRO, D. VARRICA, F. CIBELLA a G. CUTTITTA. Concentration and reference interval of trace elements in human hair from students living in Palermo, Sicily (Italy). *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2011, **32**(1), 27-34 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1016/j.etap.2011.03.003. ISSN 13826689.

DRASCH, G. a G. ROIDER. Assessment of hair mineral analysis commercially offered in Germany. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2002, **16**(1), 27-31 [cit. 2017-02-27]. DOI: 10.1016/S0946-672X(02)80005-0. ISSN 0946672x.

FRISCH, M. a B. S. SCHWARTZ. The pitfalls of hair analysis for toxicants in clinical practice: three case reports. *Environmental Health Perspectives*. 2002, **110**(4), 433-436.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J., F. J. SÁNCHEZ-MUNIZ, S. RÓDENAS, M. I. SEVILLANO, M. T. LARREA MARÍN a S. BASTIDA. Differences in metal and metalloid content in the hair of normo- and hypertensive postmenopausal women. *Hypertension Research* [online]. 2010, **33**(3), 219-224 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1038/hr.2009.221. ISSN 0916-9636.

GUNSTHEIMER, G., U. GUNSTHEIMER a M. ANKE. The red fox as a bioindicator of mercury exposure. Proceedings of the XXII congress of the international union of game biologists (IUGB) [online]. PENSOFT, Sofia, 1996, 439-443 [cit. 2017-01-26].

HAMBIDGE, K. M. Hair analyses: worthless for vitamins, limited for minerals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1982, **36**(5), 943-949.

HASHMI, G. M. M. a M. H. SHAH. Comparative evaluation of trace elements in the scalp hair of arthritis patients and healthy donors. *Toxicological & Environmental Chemistry* [online]. 2011, **93**(10), 2123-2134 [cit. 2016-12-12]. DOI: 10.1080/02772248.2011.626417. ISSN 0277-2248.

HAWKINS, D. P. a K. V. RAGNARSDÓTTIR. The Cu, Mn and Zn concentration of sheep wool: Influence of washing procedures, age and colour of matrix. *Science of The Total Environment* [online]. 2009, **407**(13), 4140-4148 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.02.020. ISSN 00489697.

HINDMARSH, J. T. a J. SAVORY. The Death of Napoleon, Cancer or Arsenic? *Clinical Chemistry* [online]. 2008, **54**(12), 2092-2093 [cit. 2017-03-26]. DOI: 10.1373/clinchem.2008.117358. ISSN 0009-9147.

HOCH, D. a M. SCHMOCK. *Všechno o vlasech*. 1. čes. vyd. Praha: Synesthesie, 1994, 139 s.

HOLMES, A. S., M. F. BLAXILL a B. E. HALEY. Reduced Levels of Mercury in First Baby Haircuts of Autistic Children. *International Journal of Toxicology* [online]. 2003, **22**(4), 277-285 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1080/10915810305120. ISSN 1091-5818.

CHANDOLA, L. C. a A. R. LORDELLO. Elemental analysis of horse hair by optical emission spectroscopy. *Microchemical Journal* [online]. 1983, **28**(1), 87-90 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1016/0026-265X(83)90032-2. ISSN 0026265x.

CHO, S. Y., O. D. AWH, Y. J. CHUNG a Y. S. CHUNG. Trace element exposure in man by instrumental neutron activation analysis of hair. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* [online]. 1997, **217**(1), 107-109 [cit. 2016-11-02].

CHOJNACKA, K., A. ZIELIŃSKA, H. GÓRECKA, Z. DOBRZAŃSKI a H. GÓRECKI. Reference values for hair minerals of Polish students. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2010, **29**(3), 314-319 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/j.etap.2010.03.010. ISSN 13826689.

CHYLA, M. A. a W. ZYRNICKI. Determination of Metal Concentrations in Animal Hair by the ICP Method. *Biological Trace Element Research* [online]. 2000, **75**(1-3), 187-194 [cit. 2016-11-19]. DOI: 10.1385/BTER:75:1-3:187. ISSN 0163-4984.

Jednotné pracovní postupy Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského: Extrakce půd zředěnou kyselinou dusičnou. Brno: ÚKZÚZ, 1996, 30360.1.

JONES, R. L. Zinc, Iron, and Sodium in Hair of Deer from Areas of Contrasting Soil Productivity. *Biological Trace Element Research* [online]. 2002, **86**(3), 217-226 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1385/BTER:86:3:217. ISSN 0163-4984.

JOO, N.-S., S.-M. KIM, Y.-S. JUNG a K.-M. KIM. Hair Iron and Other Minerals' Level in Breast Cancer Patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2009, **129**(1-3), 28-35 [cit. 2016-11-02]. DOI: 10.1007/s12011-008-8281-x. ISSN 0163-4984.

KARASZEWSKI, B., G. KOZERA, A. DOROSZ, J. ŁUKASIAK, S. SZCZYRBA, W. ŁYSIAK-SZYDŁOWSKA a W. M. NYKA. High magnesium or potassium hair accumulation is not associated with ischemic stroke risk reduction: A pilot study. *Clinical Neurology and Neurosurgery* [online]. 2007, **109**(8), 676-679 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1016/j.clineuro.2007.05.018. ISSN 03038467.

KAZI, T. G., H. I. AFRIDI, N. KAZI, M. K. JAMALI, M. B. ARAIN, N. Jalbani a G. A. KANDHRO. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2008a, **122**(1), 1-18 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1007/s12011-007-8062-y. ISSN 0163-4984.

KAZI, T. G., H. I. AFRIDI, N. KAZI, a kol. Distribution of zinc, copper and iron in biological samples of Pakistani myocardial infarction (1st, 2nd and 3rd heart attack) patients and controls. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2008b, **389**(1-2), 114-119 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1016/j.cca.2007.12.004. ISSN 00098981.

KAZI, T. G., N. JALBANI, N. KAZI, a kol. Estimation of Toxic Metals in Scalp Hair Samples of Chronic Kidney Patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2009, **127**(1), 16-27 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s12011-008-8222-8. ISSN 0163-4984.

KEMPSON, I. M. a E. LOMBI. Hair analysis as a biomonitor for toxicology, disease and health status. *Chemical Society Reviews* [online]. 2011, **40**(7), 3915- [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1039/c1cs15021a. ISSN 0306-0012.

KEMPSON, I. M. a W. M. SKINNER. A Comparison of Washing Methods for Hair Mineral Analysis: Internal Versus External Effects. *Biological Trace Element Research* [online]. 2012, **150**(1-3), 10-14 [cit. 2016-10-12]. DOI: 10.1007/s12011-012-9456-z. ISSN 0163-4984.

KHAN, S., T. G. KAZI, J. A. BAIG, H. I. AFRIDI a N. F. KOLACHI. Separation/Preconcentration Methods for the Determination of Aluminum in Dialysate Solution and Scalp Hair Samples of Kidney Failure Patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **144**(1-3), 205-216 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s12011-011-9070-5. ISSN 0163-4984.

KILIC, E., R. SARAYMEN, A. DEMIROGLU a O. ENGIN. Chromium and manganese levels in the scalp hair of normal and patients with breast cancer. *Biological Trace Element Research* [online]. 2004, **102**, 19-25 [cit. 2016-11-02].

KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.

KOLACHI, N. F., T. G. KAZI, H. I. AFRIDI, N. G. KAZI a S. KHAN. Investigation of essential trace and toxic elements in biological samples (blood, serum and scalp hair) of liver cirrhotic/cancer female patients before and after mineral supplementation. *Clinical Nutrition* [online]. 2012, **31**(6), 967-973 [cit. 2016-11-06]. DOI: 10.1016/j.clnu.2012.04.015. ISSN 02615614.

KREJČOVÁ, A., L. BENDA KOVSKÁ, J. NÁVESNÍK a T. ČERNOHORSKÝ. *The role of cleaning procedures in analysis of hair*. Bordeaux, Francie: Euroanalysis XVIII, 2015.

KUČERA, M. *Je analýza vlasů spolehlivá?* [online]. 2006, s. 1-2 [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: http://www.drkucera.eu/upload_doc/je_analyza_vlasu.pdf

LANG, J. M. a C. C. LUCAS. The analysis of hair keratin. 1. Application of microbiological techniques to hydrolysates of human hair. *Biochemical Journal* [online]. 1952, **52**(1), 84-87 [cit. 2016-11-15]. DOI: 10.1042/bj0520084. ISSN 0264-6021.

- LECH, T. Lead, Copper, Zinc, and Magnesium Levels in Hair of Children and Young People with Some Disorders of the Osteomuscular Articular System. *Biological Trace Element Research* [online]. 2002, **89**(2), 111-126 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1385/BTER:89:2:111. ISSN 0163-4984.
- LEROY, R. F. Effect of washing on trace element content of human hair. *Journal of Orthomolecular Medicine*. 1986, **1**(2), 120-125.
- LI, Y., C. CHEN, B. LI, J. WANG, Y. GAO, Y. ZHAO a Z. CHAI. Scalp hair as a biomarker in environmental and occupational mercury exposed populations: Suitable or not? *Environmental Research* [online]. 2008, **107**(1), 39-44 [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.1016/j.envres.2007.07.003. ISSN 00139351.
- LIN, Ch.-J., M.-H. WU, Y.-M. HSUEH, S.S.-M. SUN a A.-L. CHENG. Tissue distribution of arsenic species in rabbits after single and multiple parenteral administration of arsenic trioxide: tissue accumulation and the reversibility after washout are tissue-selective. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2005, **55**(2), 170-178 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1007/s00280-004-0872-4. ISSN 0344-5704.
- LUBKOWSKA, A. a W. SOBIERAJ. Concentrations of magnesium, calcium, iron, selenium, zinc and copper in the hair of autistic children. *Trace Elements and Electrolytes* [online]. 2009, **26**(2), 72-77 [cit. 2016-12-11].
- MATTERA, V. D., V. A. ARBIGE, S. A. TOMELLINI, D. A. ERBE, M. M. DOXTADER a R. KEN FORCÉ. Evaluation of wash solutions as a preliminary step for copper and zinc determinations in hair. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1981, **124**(2), 409-414 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)93589-5. ISSN 00032670.
- Metodický pokyn odboru odpadů Ministerstva životního prostředí k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. Praha: Věstník Ministerstva životního prostředí, 2002, XII, číslo 12.
- MIERZECKI, A., D. STRECKER a K. RADOMSKA. A Pilot Study on Zinc Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **143**(2), 854-862 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s12011-010-8952-2. ISSN 0163-4984.

MIKULEWICZ, M., K. CHOJNACKA, T. GEDRANGE a H. GÓRECKI. Reference values of elements in human hair: A systematic review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2013, **36**(3), 1077-1086 [cit. 2016-11-06]. DOI: 10.1016/j.etap.2013.09.012. ISSN 13826689.

MORTON, J., V. A. CAROLAN a P. H. E. GARDINER. Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2002, **455**(1), 23-34. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)01578-1. ISSN 00032670.

NIEMCZYKOVÁ, K. *Prvková analýza koňských žíní*. Pardubice, 2011. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Anna Krejčová, PhD.

OCHI, A., E. ISHIMURA, Y. TSUJIMOTO, a kol. Trace Elements in the Hair of Hemodialysis Patients. *Biological Trace Element Research* [online]. 2011, **143**(2), 825-834 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s12011-010-8948-y. ISSN 0163-4984.

ORLÍK, Jaroslav. *Tajemství vlasů: jak na tom jsme?* Havířov: Info Press, 2010. ISBN 80-903746-3-8.

ORTAÇ, E., O. OZKAYA, R. SARAYMEN, a kol. Low hair selenium and plasma glutathione peroxidase in children with chronic renal failure. *Pediatric Nephrology* [online]. 2006, **21**(11), 1739-1745 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s00467-006-0245-9. ISSN 0931-041x.

PARK, H.-S., K.-O. SHIN a J.-S. KIM. Assessment of reference values for hair minerals of Korean preschool children. *Biological Trace Element Research* [online]. 2007, **116**(2), 119-130 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1007/BF02685925. ISSN 0163-4984. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02685925>

PASHA, Q., S. A. MALIK, N. SHAHEEN a M. H. SHAH. Investigation of trace metals in the blood plasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2010, **411**(7-8), 531-539 [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1016/j.cca.2010.01.010. ISSN 00098981.

PÁTKOVÁ, A. *Optická emisní a hmotnostní spektrometrie v prvkové analýze koňských žíní*. Pardubice, 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Anna Krejčová, PhD.

PROCHÁZKA, P. Problematika vlasové analýzy ve forenzní toxikologii. *KONTAKT – časopis pro ošetrovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci*. 2006, **8**(2), 366-369. ISSN 1212-4117.

RASHED, M. N. a M. E. SOLTAN. Animal Hair as Biological Indicator for Heavy Metal Pollution in Urban and Rural Areas. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2005, **110**(1-3), 41-53 [cit. 2016-12-02]. DOI: 10.1007/s10661-005-6288-8. ISSN 0167-6369.

ROBBINS, C. R. Chemical Composition of Different Hair Types. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, s. 105 [cit. 2016-11-14]. DOI: 10.1007/978-3-642-25611-0_2. ISBN 978-3-642-25610-3.

RÓDENAS, S., F. J. SÁNCHEZ-MUNIZ, M. I. SEVILLANO, T. LARREA MARÍN a M. J. GONZÁLEZ-MUÑOZ. Blood pressure of omnivorous and semi-vegetarian postmenopausal women and their relationship with dietary and hair concentrations of essential and toxic metals. *Nutrición Hospitalaria* [online]. 2011, **26**(4), 874-883 [cit. 2016-11-06]. DOI: 10.1590/S0212-16112011000400030. ISSN 0212-1611.

SALMELA, S., E. VUORI a J. O. KILPIÖ. The effect of washing procedures on trace element content of human hair. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1981, **125**, 131-137 [cit. 2017-04-13]. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)85057-1. ISSN 00032670.

SEIDEL, S., R. KREUTZER, D. SMITH, S. MCNEEL a D. GILLISS. Assessment of Commercial Laboratories Performing Hair Mineral Analysis. *JAMA* [online]. 2001, **285**(1), 67-72 [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1001/jama.285.1.67. ISSN 0098-7484.

SEN, J. a A. B. D. CHAUDHURI. Brief communication: Choice of washing method of hair samples for trace element analysis in environmental studies. *American Journal of Physical Anthropology* [online]. 2001, **115**(3), 289-291 [cit. 2016-11-13]. DOI: 10.1002/ajpa.1083. ISSN 0002-9483.

SENOFONTE, O., N. VIOLANTE a S. CAROLI. Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2000, **14**(1), 6-13 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1016/S0946-672X(00)80017-6. ISSN 0946672x.

SMART, K. E., M. KILBURN, M. SCHROEDER, B. G. H. MARTIN, C. HAWES, J. M. MARSH a C. R. M. GROVENOR. Copper and calcium uptake in colored hair. *International Journal of Cosmetic Science*[online]. 2010, **32**(2), 161-162 [cit. 2016-11-16]. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2010.00549_3.x. ISSN 01425463.

SOBAŃSKA, M. A. Wild boar hair (*Sus scrofa*) as a non-invasive indicator of mercury pollution. *Science of The Total Environment* [online]. 2005, **339**(1-3), 81-88 [cit. 2017-01-21]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.07.018. ISSN 00489697.

SREENIVASA RAO, K., T. BALAJI, T. PRASADA RAO, Y. BABU a G. R. K. NAIDU. Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2002, **57**(8), 1333-1338 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1016/S0584-8547(02)00045-9. ISSN 05848547.

SUZANA, S., B. G. CHAM, G. AHMAD ROHI, R. MOHD RIZAL, M. N. FAIRULNIZAL, H. NORMAH, A. FATIMAH. Relationship between selenium and breast cancer: a case-control study in the Klang Valley. *Singapore Med J* [online]. 2009, **50**(3), 265-269 [cit. 2016-11-02].

SUZANA, S., H. NORMAH, R. NOR FADILAH, G. AHMAD ROHI, I. AMIN, B. G. CHAM, R. MOHD RIZAL a M. N. FAIRULNIZAL. Antioxidants Intake And Status, And Oxidative Stress In Relation To Breast Cancer Risks: A Case-Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online]. 2008, **9**(2), 343-349 [cit. 2016-11-02].

SZYNKOWSKA, M. I., A. PAWLACZYK, E. WOJCIECHOWSKA, S. SYPNIEWSKI a T. PARYJCZAK. Human Hair as a Biomarker in Assessing Exposure to Toxic Metals. *Polish Journal of Environmental Studies* [online]. 2009, **18**(6), 1151-1161 [cit. 2017-04-22].

SZYNKOWSKA, M. I., M. MARCINEK, A. PAWLACZYK a J. ALBINSKA. Human hair analysis in relation to similar environmental and occupational exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, **40**(2), 402-408 [cit. 2017-01-20]. DOI: 10.1016/j.etap.2015.07.005. ISSN 13826689.

ŠTORK, J. a kol. *Dermatovenerologie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2013, xv, 502 s. ISBN 978-80-7262-898-8.

TAN, Ch., H. CHEN a Ch. XIA. The Prediction of Cardiovascular Disease Based on Trace Element Contents in Hair and a Classifier of Boosting Decision Stumps. *Biological Trace Element Research* [online]. 2009, **129**(1-3), 9-19 [cit. 2016-12-11]. DOI: 10.1007/s12011-008-8279-4. ISSN 0163-4984.

TRIDICO, S. R., M. M. HOUCK, K. P. KIRKBRIDE, M. E. SMITH a B. C. YATES. Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls. *Forensic Science International* [online]. 2014, **238**, 101-107 [cit. 2016-01-03]. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.02.023. ISSN 03790738.

URL 1: http://www.biokap.sk/_img/vlas.jpg [cit. 2017-01-20]

URL 2: http://www.bcdclinic.cz/content/files/images/obsah/transplantace_vlasu/rust_vlasu.jpg [cit. 2017-01-20]

URL 3: <http://www.traceelements.com/images/samplecollection.jpg> [cit. 2017-04-19]

VANAELST, B., I. HUYBRECHTS, N. MICHELIS, et al. Mineral Concentrations in Hair of Belgian Elementary School Girls: Reference Values and Relationship with Food Consumption Frequencies. *Biological Trace Element Research* [online]. 2012, **150**(1-3), 56-67 [cit. 2017-03-31]. DOI: 10.1007/s12011-012-9495-5. ISSN 0163-4984.

WANG, C. T., C. Y. CHOU a W. T. CHANG. Study on the content of trace elements in the hair of female osteoarthritis patients. *Trace Elements and Electrolytes* [online]. 2009, **26**(1), 39-44 [cit. 2017-12-11]. ISSN 0946-2104.

WENNIG, R. Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International* [online]. 2000, **107**(1-3), 5-12 [cit. 2017-01-20]. DOI 10.1016/S0379-0738(99)00146-2. ISSN 03790738.

WOŁOWIEC, P., I. MICHALAK, K. CHOJNACKA a M. MIKULEWICZ. Hair analysis in health assessment. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2013, **419**, 139-171 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.001. ISSN 00098981.

WREN, C. D. Mammals as biological monitors of environmental metal levels. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 1986, **6**(2), 127-144 [cit. 2017-01-26]. DOI: 10.1007/BF00395625. ISSN 0167-6369.

YASUDA, H., K. YOSHIDA, M. SEGAWA, R. TOKUDA, T. TSUTSUI, Y. YASUDA a S. MAGARA. Metallomics study using hair mineral analysis and multiple logistic regression analysis: relationship between cancer and minerals. *Environmental Health and Preventive Medicine* [online]. 2009, **14**(5), 261-266 [cit. 2016-11-02]. DOI: 10.1007/s12199-009-0092-y. ISSN 1342-078x.

ZELENKOVÁ, J. *O – TOF ICP MS analýza gadolinia v řasách a povrchových a odpadních vodách*. Pardubice, 2012. Diplomová práce. Vedoucí práce doc. Ing. Anna Krejčová, PhD.

PŘÍLOHY

Příloha 1: Koncentrace v nepraných žíních a v žíních praných různými pracími metodami ..	100
Příloha 2: Koncentrace naměřené v nepraných žíních a v žíních praných v horké vodě	102
Příloha 3: Kontaminace žíní pevnými kontaminanty	103

Příloha 1: Koncentrace v nepraných žíních a v žíních praných různými pracími metodami (data z předchozí studie, Krejčová a kol., 2015)

Vzorek	Praní	Al	Ba	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Si	Sr	Ti	Zn
1	Neprané	682	25,3	4627	3,36	544	1420	905	101	35,2	848	31900	775	15,7	44,7	128
2	Neprané	682	25,9	4815	3,22	541	1400	909	100	38,0	854	30100	758	16,3	43,7	132
\bar{c}	Neprané	682	25,6	4721	3,29	542	1410	907	100	36,6	851	31000	766	16,0	44,2	130
RSD	Neprané	0,00969	1,16	1,986	2,16	0,314	0,838	0,173	0,240	3,86	0,344	2,83	1,10	1,64	1,09	1,76
1	Horká voda	225	19,8	4345	0,650	259	<DL	853	101	<DL	773	31200	460	14,3	14,1	122
2	Horká voda	238	21,3	4424	<DL	258	<DL	857	100	<DL	792	31100	492	13,5	15,4	123
\bar{c}	Horká voda	232	20,6	4384	0,650	258	-	855	101	-	782	31200	476	13,9	14,7	122
RSD	Horká voda	2,686	3,52	0,8951	-	0,323	-	0,258	0,227	-	1,25	0,0448	3,43	2,90	4,32	0,254
1	Studená voda	266	23,9	4455	<DL	328	<DL	914	106	<DL	834	33600	504	13,4	13,8	127
2	Studená voda	281	25,6	4522	<DL	326	<DL	925	95,0	<DL	858	33600	547	14,3	15,0	127
\bar{c}	Studená voda	273	24,7	4488	-	327	-	920	100	-	846	33600	526	13,9	14,4	127
RSD	Studená voda	2,69	3,52	0,7495	-	0,323	-	0,604	5,27	-	1,40	0,0448	4,08	3,27	4,32	0,254
1	EDTA	372	27,7	4574	<DL	346	164	774	97,4	33,9	780	30600	700	12,0	24,4	117
2	EDTA	367	26,1	4526	<DL	344	160	771	99,8	31,4	790	31300	666	11,5	26,6	110
\bar{c}	EDTA	370	26,9	4550	-	345	162	772	98,6	32,7	785	31000	683	11,8	25,5	113
RSD	EDTA	0,708	2,97	0,5279	-	0,303	1,22	0,192	1,23	3,70	0,671	1,15	2,50	2,33	4,30	2,77
1	Triton X-100	304	26,8	4708	2,01	253	<DL	750	90,9	<DL	735	31100	556	13,9	20,7	117
2	Triton X-100	322	24,7	4548	2,73	261	<DL	738	97,9	<DL	724	30500	508	13,2	22,2	116
\bar{c}	Triton X-100	313	25,8	4628	2,37	257	-	744	94,4	-	730	30800	532	13,6	21,5	116
RSD	Triton X-100	2,92	4,07	1,729	15,2	1,60	-	0,833	3,70	-	0,743	0,998	4,56	2,49	3,39	0,629

1	Aceton	363	28,2	4610	1,06	285	921	765	91,4	21,6	772	29300	540	13,6	14,3	115
2	Aceton	344	25,1	4506	<DL	270	883	746	90,0	17,1	809	28700	497	11,8	19,3	122
\bar{c}	Aceton	354	26,6	4558	1,06	277	902	756	90,7	19,4	791	29000	519	12,7	16,8	119
RSD	Aceton	2,60	5,78	1,146	-	2,71	2,10	1,27	0,737	11,6	2,32	0,965	4,15	6,93	14,6	2,72
1	HNO ₃	270	24,2	3984	1,86	267	<DL	773	87,0	<DL	623	30900	505	13,8	20,1	96
2	HNO ₃	255	24,4	4043	2,92	243	<DL	749	83,0	<DL	615	34700	578	13,5	17,4	91
\bar{c}	HNO ₃	262	24,3	4013	2,39	255	-	761	85,0	-	619	32800	541	13,7	18,8	94
RSD	HNO ₃	2,72	0,332	0,7386	22,2	4,60	-	1,55	2,37	-	0,574	5,82	6,73	1,23	7,22	2,60

\bar{c} – průměrná koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$], RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Příloha 2: Koncentrace naměřené v nepraných žíních a v žíních praných v horké vodě

Vzorek	Praní	Al	As	Ba	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Pb	S	Si	Sr	Ti	Zn
1	N	617	0,0942	29,5	5050	0,180	1,57	507	1410	1075	117	32,3	960	5,40	32400	613	18,5	36,8	130
2	N	556	0,0899	34,3	5170	0,171	1,30	507	1450	1109	114	33,4	965	<DL	33600	912	18,5	35,0	132
3	N	573	0,129	28,2	4940	0,161	2,23	507	1410	1050	111	31,5	935	<DL	33400	897	17,6	30,3	127
4	N	546	0,121	27,4	4790	0,171	2,08	483	1390	1023	106	29,6	862	7,09	33300	992	17,3	33,8	130
5	N	625	0,0952	27,8	4910	0,155	4,41	539	1400	1056	108	43,1	887	6,44	34800	752	17,1	33,2	142
6	N	708	<DL	27,9	4830	<DL	2,07	516	1410	1054	107	26,4	944	<DL	34000	677	17,4	37,1	177
7	N	681	0,154	25,9	4610	0,0899	3,09	516	1340	1015	102	22,8	856	1,03	33000	873	16,3	38,6	139
8	N	718	0,468	27,3	4810	0,169	1,33	540	1390	1044	106	26,2	894	8,23	33300	710	17,1	42,2	136
9	N	669	0,162	28,1	4930	0,160	1,29	515	1350	1055	109	29,5	930	<DL	33400	682	17,7	36,3	131
10	N	782	0,166	28,3	4770	0,144	2,02	535	1410	1048	105	30,3	920	1,03	33300	960	17,0	48,7	131
\bar{c}	N	647	0,164	28,5	4880	0,156	2,14	516	1390	1053	109	30,5	915	4,87	33400	807	17,4	37,2	138
RSD	N	11,3	67,4	7,44	3,05	16,2	43,1	3,23	2,19	2,344	3,77	16,9	4,03	67,0	1,74	15,9	3,68	13,2	10,1
1	HV	321	0,0200	30,1	5050	0,107	1,32	333	<DL	1199	135	8,24	1082	<DL	41400	684	18,5	13,5	190
2	HV	225	0,00	22,1	4310	0,0716	0,61	222	<DL	794,6	95,6	5,69	680,6	<DL	30200	550	14,6	12,7	118
3	HV	207	0,0275	24,3	4440	0,118	0,61	219	<DL	851,2	102	6,57	703,5	<DL	30900	549	15,4	<DL	117
4	HV	160	0,0350	23,2	4300	0,0311	<DL	175	<DL	818,0	97,6	<DL	713,5	<DL	31600	473	15,1	<DL	119
5	HV	364	0,0492	24,9	4450	0,109	0,99	324	<DL	842,9	104	5,76	715,4	<DL	30800	366	15,4	22,4	122
6	HV	327	0,00302	23,8	4290	0,121	0,65	293	<DL	821,0	101	6,05	705,4	<DL	30300	490	14,4	19,3	114
7	HV	332	0,00394	24,1	4360	0,0278	1,38	276	<DL	820,0	101	5,24	710,6	<DL	31200	489	14,8	18,3	123
8	HV	88,8	0,0206	22,6	4550	0,124	0,54	135	<DL	814,0	101	12,55	731,3	<DL	32100	494	15,7	<DL	120
9	HV	311	0,0112	23,3	4320	0,039	0,63	284	<DL	810,4	101	5,06	694,6	<DL	31200	464	14,3	18,9	124
10	HV	70,7	0,0530	22,5	4250	0,187	1,25	113	<DL	790,1	99,1	<DL	707,8	<DL	32300	305	14,7	<DL	119
\bar{c}	HV	241	0,0224	24,1	4430	0,0934	0,886	238	-	856,1	104	6,90	744,5	-	32200	486	15,3	17,5	127
RSD	HV	42,0	76,2	8,99	5,04	49,0	37,2	30,9	-	13,51	10,4	33,8	15,21	-	9,77	20,1	7,59	19,4	16,9

N – neprané žíně, HV – žíně prané v horké vodě, \bar{c} – průměrná koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$], RSD – relativní směrodatná odchylka [%]

Příloha 3: Kontaminace žíně pevnými kontaminanty (foceno 31. 1. 2017)

Před kontaminací

Žíně po kontaminaci

Půda



Sediment



Popílek

