

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití multiprvkové a vícerozměrné statistické analýzy pro klasifikaci suchých
krmiv pro psy a kočky

Bc. Jana Venclová

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Venclová**
Osobní číslo: **C16551**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Využití multiprvkové a vícerozměrné statistické analýzy pro klasifikaci suchých krmiv pro psy a kočky**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku prvkové analýzy zvířecích krmiv vybranými metodami atomové spektrometrie. Pozornost věnujte metodám stanovení multiprvkového profilu, který následně s využitím nástrojů vícerozměrné statistické analýzy umožňuje klasifikaci či autentifikaci reálných vzorků.
2. Určete analytické charakteristiky stanovení vybraných elementů za využití optimalizovaných metod.
3. Ověřte správnost a přesnost analytického postupu stanovení vybraných elementů a aplikujte jej pro analýzu reálných vzorků.
4. S využitím vícerozměrných statistických metod určete rozdíly v zastoupení prvků mezi vzorky z jednotlivých testovaných tříd a zhodnoťte možnost použití zjištěných rozdílů pro jejich klasifikaci.
5. Kriticky zhodnoťte dosažené výsledky.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Husáková, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Tereza Šídová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2018

Jana Venclová

Chtěla bych velice poděkovat vedoucí své diplomové práce Ing. Lence Husákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, informace, ochotu a vstřícnost po celou dobu tvorby mé diplomové práce. Velké díky patří také Ing. Tereze Šídové, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, podporu a pomoc při zpracování experimentální části.

Děkuji i své rodině a příteli za jejich velkou podporu.

ANOTACE

Diplomová práce byla zaměřena na prvkovou analýzu vzorků suchých krmiv pro psy a kočky za využití metod TOF-ICP-MS a ICP-OES. Vzorky byly před vlastní analýzou mineralizovány v mikrovlnné peci. Bylo provedeno analytické stanovení vybraných prvků v suchých krmivech a byly použity nástroje vícerozměrné statistické analýzy pro klasifikaci vzorků. Pomocí certifikovaného referenčního materiálu Bovine Liver SRM[®] 1577c (National Institute of Standards & Technology, USA) byla ověřena přesnost vybraných postupů. Celkově bylo analyzováno 51 vzorků suchých krmiv a stanoveny 35 prvků (Mg, Na, K, P, Ca, Fe, Mn, Ba, Cu, Al, Zn, Hg, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U).

KLÍČOVÁ SLOVA

ICP-TOF-MS, ICP-OES, multielementární analýza, analýza suchých krmiv pro psy a kočky, mikrovlnná mineralizace.

TITLE

The use of multielement and multivariate statistical analysis for classification of dry dog and cat food

ANNOTATION

The diploma thesis was focused on multi-element analysis of dry dog and cat food using TOF-ICP-MS a ICP-OES. Samples were mineralized by microwave oven prior to analysis. The accuracy of proposed the procedure was evaluated using the standard reference material SRM[®] 1577c (National Institute of Standards and Technology, USA) and by the spiked analytical recoveries study. Multivariate statistical methods were employed for the classification of 51 commercially available samples of dry pet food and there were analyzed 35 elements (Mg, Na, K, P, Ca, Fe, Mn, Ba, Cu, Al, Zn, Hg, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U).

KEYWORDS

ICP-TOF-MS, ICP-OES, multielemental analysis, dog and cat dry food, microwave digestion, multivariate analysis.

OBSAH

1	ÚVOD.....	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Suché krmivo pro psy a kočky	12
2.1.1	Klasifikace vzorků	12
2.1.2	Složení krmiv pro psy a kočky	13
2.1.2.1	Minerální látky	17
2.1.2.2	Kontaminující prvky v krmivech.....	19
2.1.2.3	Vitaminy	20
2.1.3	Výrobní proces granulí	22
2.2	Problematika prvkové analýzy krmiv	23
2.2.1	Spektrální interference pro metodu ICP-MS a jejich řešení	23
2.2.1.1	Kolizně reakční cely	24
2.2.1.2	Matematická korekce.....	25
2.2.1.3	Spektrometry s vysokým rozlišením	26
2.2.2	Nespektrální interference pro metodu ICP-MS a jejich řešení	26
2.2.3	Spektrální a nespektrální interference pro metodu ICP-OES a jejich řešení	27
2.2.4	Příprava vzorku.....	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Použité chemikálie	31
3.2	Příprava roztoků	31
3.2.1	Příprava zásobních roztoků.....	31
3.2.2	Příprava 2 mol L ⁻¹ kyseliny dusičné.....	32
3.2.3	Kalibrační roztoky	33

3.3	Seznam analyzovaných vzorků	33
3.3.1	Certifikovaný referenční materiál	33
3.3.2	Vzorky granulí	33
3.4	Příprava vzorků k analýze	37
3.4.1	Lyofilizace	37
3.4.2	Mikrovlnná mineralizace	37
3.5	Použitá instrumentace	38
3.5.1	Mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert.....	38
3.5.2	Spektrometr pro stanovení rtuti AMA 254.....	39
3.5.3	Spektrometr ICP-oo-TOF-MS	39
3.5.4	Spektrometr ICP-OES Integra XL.....	42
3.5.5	Podvarové destilační zařízení	43
3.5.6	Lyofilizátor ScanVac CoolSafe	44
3.5.7	Ostatní laboratorní přístroje a pomůcky	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
4.1	Optimalizace lyofilizace a parametrů měření pro metodu ICP-OES a ICP-MS	45
4.1.1	Optimalizace lyofilizace	45
4.1.2	Optimalizace parametrů ICP-OES.....	45
4.1.3	Optimalizace parametrů ICP-MS.....	46
4.2	Přesnost stanovení	47
4.3	Detekční limity a meze stanovitelnosti	49

4.4	Aplikace statistické analýzy dat pro analýzu reálných vzorků suchých granulí pro psy a kočky	50
4.4.1	Exploratorní analýza dat	50
4.4.2	Diskriminační analýza	64
4.4.3	Faktorová analýza	74
4.4.4	Srovnání nalezených koncentrací s limitami danými legislativou.....	79
5	ZÁVĚR	81
6	LITERATURA	82

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAFCO	Americká asociace kontroly krmiv
AMA 254	Advanced Mercury Analyser – analyzátor rtuti
DRC	Dynamická reakční cela
CRC	Kolizně-reakční cela
CRM	Certifikovaný referenční materiál
ET-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
FEDIAF	Evropská federace výrobců krmiv pro domácí zvířata
HR-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu a vysokým rozlišením
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
IS	Interval spolehlivosti
LIBS	Spektrometrie laserem buzeného plazmatu
LOD	Detekční limit
LOQ	Mez stanovitelnosti
MWD	Mikrovlnný rozklad
oa-TOF	Průletový analyzátor s ortogonální akcelerací iontů
TMAH	Hydroxid tetramethylamonný
Q	Kvadrupólový analyzátor
XRF	Rentgenová fluorescence

1 ÚVOD

Evropskou federací FEDIAF bylo odhadováno, že v České republice žije asi 2,1 milionů psů. Na českém trhu existuje celá řada krmiv pro psy a kočky. Jedná se zejména o granule, konzervy, pamlsky a doplňky stravy [1].

Nejčastější potravou psa či kočky jsou granule. V roce 2007 došlo ke kontaminaci kanadských vzorků krmiv melaminem, který se dostal do krmiv z pšeničné mouky. Velká ohniska zasažení byla v severní Americe a Asii. V roce 2004 došlo k renálnímu selhání u domácích zvířat z důvodu kontaminace mykotoxiny v Thajsku [2, 3]. V 50. letech došlo v Japonsku k otravě koček rtuť z Minamaty [4] po konzumaci kontaminovaných mořských živočichů. Z těchto důvodů by měl být kladen větší důraz na analýzu krmiv.

Vývoj krmiv se za poslední léta značně posunul. Na trhu najdeme celou řadu dostupných výrobků od různých dodavatelů a samozřejmě každé krmivo dosahuje různých kvalit. Krmiva jsou sledována z hlediska hygienického, mikrobiologického nebo z hlediska složení, které výrobce deklaruje.

V současné době si kontrolu krmiv provádí výrobce sám. Avšak kontrolním orgánem u nás je ÚKZÚZ (Ústřední kontrolní orgán a zkušební ústav zemědělský), který však realizuje pouze náhodné kontroly krmiv. Pokud jsou objeveny nedostatky, dojde k udělení příslušné pokuty. Státní veterinární správa také kontroluje krmiva z hlediska zdravotní nezávadnosti [5].

Krmiva pro domácí zvířata nejsou ovšem tak sledována, jako potraviny určené pro lidi. Hladiny koncentrací určitých prvků v krmivech reguluje v Evropské unii směrnice Rady 2009/767/ES, 1831/2003/EC a Evropského parlamentu [6, 7].

Cílem této diplomové práce byla prvková analýza komerčně dostupných krmiv pro psy a kočky pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací indukčně vázaným plazmatem a optické emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu. Cílem byla kontrola a posouzení vzorků krmiv z hlediska prvkového složení a získání informací o možných kontaminantech. Aplikovány byly nástroje jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýzy dat za účelem charakterizace a klasifikace vzorků krmiv.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Suché krmivo pro psy a kočky

2.1.1 Klasifikace vzorků

Krmiva pro psy a kočky mohou být rozdělena dle různých kritérií. Podle věku jsou členěna na junior, adult a senior. Z hlediska plnění nutričních nároků psa dělíme krmiva na kompletní (granule) a doplňková (pamlsky nebo různé pochoutky). Doplňková krmiva se musí kombinovat s další potravou. Podle nejvíce zastoupené složky jsou rozdělena na drůbeží, hovězí, jehněčí, rybí, zvěřinové nebo jiné další zastoupené složky masa. Podle přidané složky obilovin jsou dělena na krmiva s obilovinami a bez obilovin. Krmiva mohou být také různě upravena podle použití např. pro kastrované kočky a psy, pro psy a kočky se špatným zažíváním atd. [1, 8].

Obchodníky jsou krmiva taktéž rozdělována na superprémiová, prémiová a základní. Legislativa však neuvádí, jaká kritéria musí krmivo splňovat, aby mohlo být zařazeno do uvedené kategorie [1].

Podle zbytkového obsahu vody je možno dělit krmiva pro domácí zvířata na tři typy: suchá, kterými se budu podrobněji zabývat v této diplomové práci, částečně vlhká a konzervovaná. Suchá krmiva jsou zbavována vlhkosti až na 8–10 % a vyznačují se dlouhou trvanlivostí. U polosuchých krmiv se voda pohybuje mezi 14–60 %. Tato krmiva mohou být náchylnější k mikrobiální kontaminaci. A posledním typem jsou konzervovaná krmiva, která mohou obsahovat 60–80 % vody. Kvůli vysokému obsahu vody je nutná přítomnost gelového činidla (např. škrob), aby bylo dosaženo požadované konzistence [1, 9].

Zajímavostí je, že se prodá za rok 9 miliónů tun krmiva v rámci EU, což odpovídá částce 15 miliard eur [1].

2.1.2 Složení krmiv pro psy a kočky

Je potřeba si uvědomit, že každý druh psa či kočky vyžaduje jiné složení potravy, které se může lišit v závislosti na jejich věku, míře aktivity nebo velikosti. Správně vyváženou potravou dostávají psi a kočky poměr potřebných látek. Naopak nevhodným poměrem živin může dojít např. k obezitě, trávicím problémům, problémy s klouby atd. Za vyváženou stravu se považuje správné dávkování masa, obilovin a zeleniny, aby byla splněna hladina aminokyselin, tuků, cukrů, minerálů, stopových prvků a vitamínů. Pro psy a kočky je důležitá rovnováha vápníku a fosforu pro správný růst kostí. Zdrojem energie jsou tuky a oleje. A k udržování tělesných svalů pomáhá protein. U koček je ovšem požadavek na složení potravy trochu odlišný, např. bílkovin potřebují kočky dvakrát více než psi [10, 11].

Základní stavební jednotkou bílkovin jsou aminokyseliny, které jsou nezbytné pro správné fungování organismu. Pokud by psí strava obsahovala příliš mnoho bílkovin (masa), mohlo by docházet k trávicím problémům, protože k trávení bílkovin potřebuje pes také tuky a sacharidy. Aminokyseliny mohou být do stravy přidány i ve formě vedlejších produktů živočišné výroby, jako jsou např. játra nebo vnitřnosti, ty jsou bohaté na minerály a další prospěšné látky pro psí zdraví [1]. Nedostatek bílkovin pak může způsobovat různé problémy, jako např. úbytek hmotnosti, poruchy růstu či nechut' psa k jídlu. Obsah bílkovin v krmivech se uvádí okolo 30 % pro mladé jedince, u dospělých činí tato hodnota 22–25 % [12]. Podle doporučení AAFCO je minimální obsah N-látek 180 g kg⁻¹ ve 100 % sušiny pro dospělá zvířata [13]. Jako zástupce aminokyselin můžeme jmenovat např. methionin, který zabraňuje tvorbě močových kamenů, díky snížení pH v moči [14].

Tuk je další nepostradatelnou živinou ovlivňující chuť, texturu jídla a je důležitým zdrojem energie. Samozřejmě vysoké množství tuku zvířeti škodí a může mu způsobovat průjem nebo zánět slinivky [1]. Uvádí se doporučený poměr mezi proteiny a tuky 2:1. Tuky jsou nosičem pro vitamíny A, D, E a K a jsou zdrojem pro esenciální mastné kyseliny [15]. Nedostatek tuků může způsobovat např. špatný stav kůže a srsti. Při dlouhodobějším nedostatku mají zvířata problém s udržením optimální hmotnosti [16].

Stejně jako tuky jsou pro psa zdrojem energie i sacharidy, které se do organismů dostávají z rostlinných krmiv. Nespotřebované množství sacharidů se v těle přeměňuje na tuk a volné mastné kyseliny. Pro správnou funkci organismu je potřebná glukóza, kterou si zvířata

dokáží syntetizovat sama, pokud jsou v krmivu obsaženy prekurzory glukózy v dostatečném množství [15]. Krmivo však může obsahovat i přidané cukry, které mohou způsobovat obezitu, cukrovku a jiné potíže. Pro klouby jsou prospěšné glukosaminy, protože zmírňují projevy artrózy a jsou obsaženy ve skořápkách korýšů [14].

Nutno ještě podotknout, že zvíře si nedokáže syntetizovat esenciální mastné kyseliny, esenciální aminokyseliny, některé minerální látky či vitamíny. Všechny tyto látky jsou důležité pro správné fungování mnoha metabolických procesů, tudíž je nutné, aby byly obsaženy v potravě zvířete [16].

Velmi důležitou složkou potravy je maso, jakožto zdroj bílkovin. Bohužel bývá někdy přidáváno ve velmi malém množství, což se pak může odrazit na kvalitě krmiva. Masová moučka obsahuje malé procento vody a řadí se mezi koncentrovanou výživu, ale oproti čerstvému masu je hůře stravitelná a psovi méně přirozená. Dalším důležitým zdrojem živin a vitamínů jsou ryby, které obsahují zejména vitamíny A, D, B3, omega 3 a omega 6 nenasycené mastné kyseliny [1, 17, 18]

Mezi rostlinné zdroje bílkovin se řadí např. sójové oleje, sójová mouka, kukuřičné klíčky, pšeničné klíčky atd. Zrna obilovin a mouka získaná při mletí obilovin (kukuřice, pšenice, ječmen, oves, rýže) se řadí mezi škrobové složky. Modifikovaný škrob je upravený pomocí varu nebo dalšími procesy. Zdrojem přírodních antioxidantů jsou žito, zelený oves a zelený ječmen, neboť neobsahují bílkoviny a bývají alternativou obilovin pro psy. Další často se vyskytující složkou v krmivu je kukuřice. Výhodou je bohatý zdroj sacharidů a nevýhodou je špatná stravitelnost. Jako složka krmiv se nedoporučuje pšenice, protože obsahuje lepek, zatímco pšeničné klíčky jsou bohaté na esenciální nenasycené mastné kyseliny, velké množství vitamínů, zinku a hořčíku. Na rozdíl od pšenice neobsahují škrob ani lepek. Při výrobě granulí může výsledný produkt ovlivnit kvalita vstupních surovin např. při použití plesnivé kukuřice. Plísňe produkují aflatoxiny, fumonosiny atd., které mohou být toxické pro játra [1, 17].

V kvalitnějších krmivech je obsažena např. quinoa, která je bohatá na stopové prvky (Mn, Mg, Cu) a extrakty z Juky (Yucca), jejichž použitím dochází k zajištění léčebných a detoxikačních účinků [14].

Krmiva mohou být doplněna o minerály, vitamíny, různé příchutě a barviva. Tyto doplňky se používají pro zlepšení vlastností krmiv. Jako příklady vitamínů a minerálů můžeme jmenovat např. oxid hořečnatý, cholinchlorid, vitamíny A, B12, D3, E, riboflavin, niacin, kyselinu listovou atd. Vápník, hořčík, draslík, železo, fosfor, sodík a selen se řadí mezi nepostradatelné složky v psí výživě. Doporučené minimální i maximální limity pro tyto prvky jsou dané organizací FEDIAF [1, 17]. Kyselina fosforečná slouží jako emulgátor kyselosti. Má negativní účinky na snižování hustoty kostí. Mezi sporné složky krmiva patří síran měďnatý, i když měď se řadí mezi důležité prvky. K doplnění vápníku v krmivu bývá využíván uhličitan vápenatý, který je obsažen v kostní moučce [14]. Přehledu minerálních látek a vitamínů budou věnovány následující kapitoly 2.1.2.1 a 2.1.2.3.

Různé druhy složek nacházejících se v granulích shrnuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Vybrané složky použité pro výrobu granulí [14]

Druh složky	Kvalita
Bramborová bílkovina	Nízký stupeň kvality
Bramborový škrob	Středně kvalitní složka
Brambory	Středně kvalitní složka
Brusinky	Vysoce kvalitní složka
Byliny	Nízký stupeň kvality
Čekanka	Vysoce kvalitní složka
Celuloza	Nízký stupeň kvality
Čerstvé maso	Vysoce kvalitní složka
Čerstvé ryby	Vysoce kvalitní složka
Česnek	Vysoce kvalitní složka
Chlorid draselný	Středně kvalitní složka
Chondroitin	Vysoce kvalitní složka
Čirok	Středně kvalitní složka
Cukry	Nízký stupeň kvality
DL-methionin	Středně kvalitní složka
Dřevěné uhlí (aktivní uhlí)	Vysoce kvalitní složka
Dršťky	Vysoce kvalitní složka

Tabulka 1 Pokračování

Druh složky	Kvalita
Drůbeží maso	Středně kvalitní
Drůbeží tuk	Středně kvalitní
Exktrakt z hroznových jader	Vysoce kvalitní
Juka (Yucca)	Vysoce kvalitní
Frukto-oligo-sacharid	Vysoce kvalitní
Fosforečnan vápenatý	Středně kvalitní
Glukosamin	Vysoce kvalitní
Hexametafosfát sodný	Nízký stupeň kvality
Hovězí maso	Vysoce kvalitní
Hrách	Vysoce kvalitní
Hrachová moučka	Středně kvalitní
Hrachový protein	Nízký stupeň kvality
Hydrolyzát	Nízký stupeň kvality
Hydrolyzované živočišné bílkoviny	Středně kvalitní
Játra	Vysoce kvalitní
Ječmen	Středně kvalitní
Jehněčí maso	Vysoce kvalitní
Kachní maso	Vysoce kvalitní
Mlezivo	Vysoce kvalitní
Korýši	Vysoce kvalitní
Kostní moučka	Středně kvalitní
Králičí maso	Vysoce kvalitní
Křemelina	Středně kvalitní
Krmná pšenice	Nízký stupeň kvality
Krutí maso	Vysoce kvalitní
Kukuřice	Nízký stupeň kvality
Kukuřičné klíčky	Vysoce kvalitní
Kukuřičný gluten	Nízký stupeň kvality
Kuřecí maso	Vysoce kvalitní
Kyselina fosforečná	Nízký stupeň kvality
L-karnitin	Středně kvalitní
Listová zelenina	Vysoce kvalitní
Lněné semínko	Vysoce kvalitní
Lysin	Středně kvalitní
Produkty živočišného původu	Nízký stupeň kvality
Masová moučka	Vysoce kvalitní
Mléčné výrobky	Nízký stupeň kvality
Mořské řasy	Vysoce kvalitní
Manna-oligo-sacharid	Vysoce kvalitní
Mrkev	Vysoce kvalitní
Methyl-sulfonyl-methan	Vysoce kvalitní
Nespecifikované živočišné a rostlinné tuky	Středně kvalitní
Nukleotidy	Středně kvalitní
Obiloviny	Nízký stupeň kvality
Oleje a tuky	Nízký stupeň kvality
Olivový olej	Vysoce kvalitní
Oves	Středně kvalitní
Pivovarská rýže	Nízký stupeň kvality
Pivovarské kvasnice	Vysoce kvalitní
Přírodní barviva	Středně kvalitní
Přírodní konzervační látky a antioxidanty	Vysoce kvalitní

Tabulka 1 Pokračování

Druh složky	Kvalita
Propylenglykol	Nízký stupeň kvality
Proso	Vysoce kvalitní
Pšenice	Nízký stupeň kvality
Pšeničné klíčky	Vysoce kvalitní
Psyllium	Vysoce kvalitní
Quinoa	Vysoce kvalitní
Rajčata	Vysoce kvalitní
Řepa cukrová	Středně kvalitní
Řepkový olej	Středně kvalitní
Rostlinný olej	Středně kvalitní
Rozmarýn	Vysoce kvalitní
Rybí moučka	Vysoce kvalitní
Rybí deriváty	Nízký stupeň kvality
Rýže	Středně kvalitní
Sladké brambory	Vysoce kvalitní
Slunečnicový olej	Vysoce kvalitní
Sója	Nízký stupeň kvality
Sůl (chlorid sodný)	Nízký stupeň kvality
Taurin	Vysoce kvalitní
Threonin	Středně kvalitní
Tokoferoly	Vysoce kvalitní
Uhličitan vápenatý	Středně kvalitní
Uměla barviva	Nízký stupeň kvality
Umělé konzervační látky	Nízký stupeň kvality
Vedlejší produkty rostlinného původu	Nízký stupeň kvality
Vejce	Vysoce kvalitní
Vepřové maso	Vysoce kvalitní
Vitamíny a minerály	Středně kvalitní
Vojtěška	Vysoce kvalitní
Zelenina	Středně kvalitní
Zelený ječmen	Vysoce kvalitní
Zelený oves	Vysoce kvalitní
Žen-šen	Vysoce kvalitní
Žito	Vysoce kvalitní
Zvěřina	Vysoce kvalitní

2.1.2.1 Minerální látky

Minerální látky se dostávají do krmiv hlavně z rostlinných produktů a řadí se mezi podstatnou složku potravy psa a kočky. Minerální látky vykonávají řadu funkcí, které budou upřesněny a shrnuty v následujících odstavcích. Tyto látky se mohou dělit na dvě skupiny, a to na makroprvky, které se nacházejí ve vyšších koncentracích. Do této skupiny patří např. sodík, draslík, hořčík, vápník, fosfor, chlór atd. Druhou skupinou jsou mikroprvky neboli stopové prvky jako např. mangan, železo, zinek, měď, kobalt, fluor či jód [8]. Vybrané prvky obsažené ve vzorcích zvířecích krmiv shrnuje Tabulka 2.

Tabulka 2 Vybrané prvky obsažené ve vzorcích zvířecích krmiv a jejich význam

Prvky	Zdroj	Uplatnění	Nedostatek	Nadbytek	Lit.
Vápník	Sušené vaječné skořápky	Mineralizace kostí a zubů	Měknutí kostí, osteroporóza	Křehkost kostí	[5, 18, 19]
Fosfor	Krmné kvasnice, šrot	Mineralizace kostí a zubů	Měknutí kostí i neplodnost	Křehkost kostí	[5, 19]
Draslík	Řepa a rostlinná krmiva	Kation intracelulárních tekutin, přenos vzruchů	Zřídka	-	[5, 19]
Hořčík	Pšeničné otruby, olejniny, játra i kosti	Působí proti srážlivosti krve, součástí mnoha enzymů (aktivátor)	Zřídka, zejména u štěňat stavba kostí a zubů	U koček – urologický syndrom	[5, 19]
Sodík	Řepa, šrot a mrkev	Přenos nervových vzruchů	Zřídka	-	[5, 6, 19]
Chlor	Řepa	Proces trávení	Zřídka	-	[5]
Síra	Řepa, pšeničné otruby, vejce, krmené kvasnice	Součástí aminokyselin cystinu, metioninu a cysteinu	Pomalý růst, porucha srsti	-	[5, 19]
Zinek	Obiloviny	Pro správné fungování mnoha enzymů, metabolismu, reprodukce	Vzácný	Vzácný	[5]
Měď	Vnitřnosti – ledviny, játra, srdce atd.	Napomáhá ke vstřebávání železa	Průjem, anémie či pomalý růst	Hepatitis, cirhóza	[5]
Kobalt	Ryby	Syntéza vitamínu B12, metabolismus cukrů a bílkovin	Nechutenství, anémie a špatný růst srsti	-	[5, 19]
Mangan	Ořechy, obiloviny, zelená zelenina a semena	Krvetvorba, podílí se na ukládání vápníku a fosforu v koste	Vzácné, ale poruchy růstu či reprodukce	Při tvoření hemoglobinu boj s Fe o absorpční místo, u koček neplodnost	[5, 18]
Selen	Obiloviny	Imunitní odpověď, chrání před intoxikací Hg, Cd, Pb	Rozdíl mezi toxicitou a doporuč. množství je malý, degenerace srdcové svaloviny	-	[5, 18]
Jód	Ryby	Součást hormonů štítné žlázy	Přibírání na váze především u starších psů, pelichání či slabost	U koček nechut', horečka, u ostatních zvířat poškození syntézy hormonů štítné žlázy	[5]
Železo	Ryby, játra, maso a luštěniny	Přenos kyslíku pomocí hemoglobinu, napomáhá k přesunu elektronů v cytochomech	Anémie	Nechut', ztráta hmotnosti	[5, 18]

2.1.2.2 Kontaminující prvky v krmivech

V krmivech se mohou objevovat potenciálně toxické prvky, které se mohou dostat do krmiva např. zpracováním jednotlivých surovin, použitím nekvalitních surovin či z obalového materiálu.

Nejdiskutovanějšími potenciálně toxickými prvky v krmivech jsou: Hg, Cd, Pb, Cu, As, Be, Cr, Mn, F, Al, Se a Sn [20]. Toxické jsou až od určité koncentrace, která je u každého prvku individuální.

Podle typu krmiva se mohou vyskytovat různé druhy kontaminujících látek, jako např. u rybích produktů se mohou ve větší koncentraci nacházet prvky jako jsou rtuť a arsen. Zatímco u krmiv rostlinného původu se mohou objevit prvky jako olovo a kadmium. Arsen má mnoho různých forem, ať už je to anorganický či vázaný v různých formách sloučenin. Toxicita arsenu je závislá na jeho chemické formě. Organické formy arsenu jsou netoxické a rychle se vylučují močí. Tyto formy se nejvíce vyskytují u mořských živočichů. Vysoké koncentrace způsobují poškození funkce ledvin, metabolismu hemu atd. Anorganický arsen je karcinogenní. Dalším toxickým prvkem je rtuť, která také existuje v několika formách, jako je elementární rtuť, anorganická a organická (methylrtuť). Methylrtuť je nejvíce se vyskytující sloučeninou v rybích produktech. Rtuť má nežádoucí účinky na centrální nervový systém a má bioakumulační funkci [21].

K toxickým prvkům řadíme i kadmium, které se vyznačuje kumulativními účinky. Otrava kadmiiem u domácích zvířat je však neobvyklá [22]. V životním prostředí se vyskytuje olovo, které také patří mezi toxické prvky. Váže se na červené krvinky a poté se dostává do jater a dalších orgánů [20]. V neposlední řadě bych chtěla zmínit beryllium, jehož toxická koncentrace způsobuje gastrointestinální potíže [23].

Tabulka 3 udává limity prvků dané legislativou a doporučené množství stanovené organizací FEDIAF.

Tabulka 3 Přehled prvků a jejich dovolené množství dané legislativou a doporučené množství organizací FEDIAF

Prvek	Limity dané legislativou		
	2002/32/ES [7]	1831/2003/EC [24] (mg kg ⁻¹)	Doporučení FEDIAF (mg kg ⁻¹) [25]
As	2 ^a	-	-
Pb	5 ^a	-	-
F	150 ^a	-	-
Hg	0,4 ^a	-	-
Mn	-	170	170
Cu	-	28	28
Fe	-	1420	1420
Zn	-	284	227
Se	-	0,568	0,568
Ca	-	-	25
P	-	-	16

^a max. obsah v mg kg⁻¹ v krmivu s obsahem vlhkosti 12 %

2.1.2.3 Vitaminy

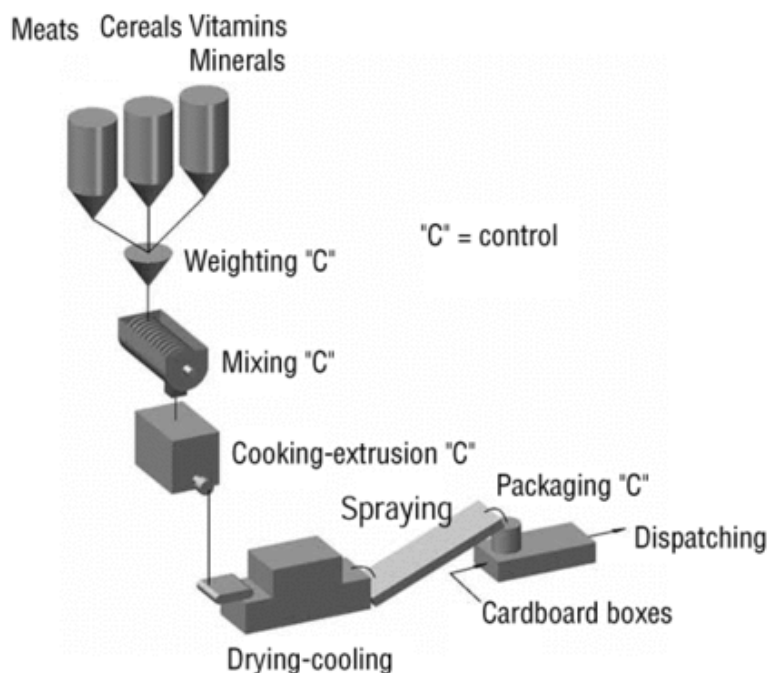
Vitaminy jsou důležité pro život, růst a zdraví [26]. Vitaminy se dělí do dvou skupin, a to na vitaminy rozpustné ve vodě (vitamin C a vitaminy sk. B) a vitaminy rozpustné v tucích (vitaminy A, D, E a K). Vzhledem k tomu, že vitaminy nejsou syntetizovány v těle zvířat je potřeba, aby byly v krmivu obsaženy. Spíše, než nedostatek se může projevit u zvířat toxicita kvůli nadměrnému přísunu, protože vitaminy rozpustné v tucích se v těle psů ukládají. Příležitostný nedostatek nemusí způsobovat ohrožení [12]. V Tabulce 4 je shrnutí vitaminů a jejich funkce [26].

Tabulka 4 Přehled vitaminů nacházejících se ve vzorcích psích krmiv a jejich význam [26]

Vitamin	Zdroj	Využití	Nedostatek
Vitamin A (retinol)	Rybí tuk, játra, mléko, mrkev, zelená zelenina	Ochrana kůže, podpora růstu kostí	Suchá srst, kožní onemocnění, záněty spojivek, špatná imunita
Vitamin D (kalciferol)	Máslo, žloutek	Růst kostí	Demineralizace kostí, osteoporóza
Vitamin E (tokoferol)	Pšeničné klíčky, kukuřice, sója	Podporuje činnost buněčných membrán a rozmnožování	Kožní projevy, poruchy metabolismu svalů
Vitamin K (menadiol)	Zelené části rostlin, hovězí játra, brambory, mrkev atd.	Srážení krve	Špatná srážlivost
Vitamin B1 (thyamin)	Pivovarské kvasnice, luštěniny, vejce, mléko atd.	Vliv na nervový systém	Svalová únava, křeče, bolesti svalů
Vitamin B2 (riboflavin)	Droždí, syrovátka, ovesné vločky, zeleniny, luštěniny	Pro správnou funkci nervové soustavy a mozku	Kožní projevy
Vitamin B6 (pyridoxin)	Kvasnice, obilné klíčky, obiloviny, sója	Regulace tělesných tekutin	Svalové křeče, poruchy krvetvorby
Vitamin B12 (kyanokobalamin)	Hovězí, drůbeží, vepřové maso, vejce, mléko atd.	Správná funkce nervového systému, krvetvorba	Slabost, apatie, chudokrevnost
Vitamin C (k. askorbová)	Mléko, zelí, květák, špenát	Celkové posílení organismu	Krvácení dásní, anémie, ztráta zubů
Vitamin PP (niacin, k.nikotinová)	Mléko, vejce, obiloviny, sója	Energetický metabolismus, tvorbu pohlavních hormonů	Záněty dutiny ústní, poruchy trávení
Vitamin B5 (k.pantothenová)	Droždí, maso, mléko atd.	Zvyšuje odolnost proti infekčním onemocněním	Nechutenství, únava, kožní poruchy
Vitamin B11 (k.listová)	Zelená zelenina, brambory, řepa atd.	Krvetvorba, protilátky, rozvoj CNS	Poruchy krvetvorby, zvracení
Vitamin H (biotin)	Žloutky, mléko, kvasnice, játra	Metabolismus aminokyselin	Vypadávání srsti
Cholin	Játra a luštěniny	Metabolismus tuků a činnost nervů	Slabost, poruchy růstu

2.1.3 Výrobní proces granulí

Výrobní proces pro výrobu granulí je vícestupňový proces, který se nazývá extruze. Extruze se vyznačuje přípravou vzorku s vynikajícími dietetickými vlastnostmi, zajištěním vysoké stravitelnosti jednotlivých složek krmiva, redukce zastoupení antinutričních látek, zamezení výskytu nežádoucích mikroorganismů v krmivu a zvýšení možnosti skladovatelnosti krmiva. Proces výroby začíná dávkováním, rozemletím, smícháním určených přísad, vařením a krájením, sušením a chlazením, aby došlo k odstranění okolo 10–15% vlhkosti a v poslední řadě pokrytím další vrstvou ochucovadla, které výrobku zvýší trvanlivost a chrání ho před vlivy vnějšího prostředí (viz Obrázek 1 výrobní postup). Tento proces využívá kombinace účinku tlaku a teploty. Díky tomu je produkt vysoce stravitelný, protože dojde k úplnému rozložení škrobu. Do suchých krmiv může být přidáván následně i tuk, což vede k výslednému složení či zvýraznění chuti [8, 27, 28].



Obrázek 1 Výrobní proces pro výrobu granulí [27]

2.2 Problematika prvkové analýzy krmiv

Pro přímou analýzu vzorků krmiv můžeme využít metody XRF [29, 30], kde její výhodou je minimální příprava vzorku. Pro přímou analýzu bývá hojně využívána i metoda LIBS, která nachází své uplatnění u analýzy vzorků masa a dalších potravin [31-38]. Spektrometrie laserem buzeného plazmatu je rychlá, umožňuje přímou detekci prvků a vyznačuje se nízkými provozními náklady. Nevýhodou ale jsou fyzikální a chemické vlastnosti vzorku, jako je např. chemické složení, homogenita a velikost částic na povrchu vzorku [31, 38]. LIBS je relativně novou technikou a značně využívanou v analýze potravin [35], ale i rentgenová fluorescence našla své uplatnění v mnoha odvětvích [30]. Rentgenová fluorescence se vyznačuje svou jednoduchostí a rychlou dobou analýzy, zatímco nevýhodou je citlivost stanovení ve srovnání s ostatními metodami, nedostupnost kalibračních standardů či validace metody [30]. Přímou analýzu krmiv umožňuje i metoda termooxidačního stanovení rtuti, ale pomocí této metody dojde ke stanovení pouze jednoho prvku [39].

Dalšími metodami, které nacházejí využití při analýze krmiv, ale jsou vhodné i pro analýzu produktů masa a či různých potravin jsou ICP-OES [40-42], FL-AAS [43] a ICP-MS [28, 44-51]. Nevýhodou metody AAS je monoelementární analýza [52], zatímco u metody ICP-OES a ICP-MS je výhoda multielementární analýzy. Výhoda ICP-MS je ultrastopová analýza, s vynikajícími mezemi detekce a širokým lineárním dynamickým rozsahem [53].

2.2.1 Spektrální interference pro metodu ICP-MS a jejich řešení

Problémem metody ICP-MS je interference matrice [28, 40-42, 44-51]. Spektrální interference se rozlišují na polyatomické [28, 44, 46, 48-50] a izobarické [44, 51]. Polyatomické interference vznikají pravděpodobně kolizními reakcemi v chladné hraniční vrstvě a neúplnou atomizací molekulárních struktur v plazmě [54, 55]. Polyatomické interference od $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ a $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$ vznikají interakcí iontů plazmového plynu se vzorkem matrice a rozpouštědla [28].

Řešením polyatomických interferencí jsou kolizně (dynamické) reakční cely [28, 44, 46, 48-51], matematické korekce [28, 48], spektrometry s vysokým rozlišením a úprava vzorku.

Úpravou vzorku se rozumí např. precipitace, modifikace matrice vzorku a mikrovlnná mineralizace, díky které dojde ke snížení uhlíku v matrici vzorku.

Řešením izobarických interferencí jsou matematické korekce [44] a volba alternativního izotopu [51]. Změnou izotopu [51] ^{114}Cd za ^{111}Cd došlo k odstranění izobarické interference ^{114}Sn v potravinách rostlinného a živočišného původu nebo dalším řešením může být odstranění izobarické interference [44] ^{114}Sn pomocí matematické korekce, díky které mohlo být stanoveno kadmium ve vzorcích krmiv pro prasata.

2.2.1.1 Kolizně reakční cely

Kolizně reakční cely jsou nyní součástí většiny Q-ICP-MS, ale je zpravidla potřeba pro každý prvek nastavit podmínky. Podle závislosti na přítomném interferujícím iontu je cela naplněna vhodným plynem, který se chová jako reakční nebo kolizní plyn. Příkladem kolizního plynu je He a reakčním plynem je H_2 , O_2 , CH_4 či NH_3 [56].

Díky kolizně reakční cele [28, 44-46, 48, 49] došlo ke stanovení izotopů ^{52}Cr , ^{56}Fe a ^{80}Se v potravinách živočišného původu, dochází také k odstranění některých iontů, které by mohly vznikat sekundárními reakcemi. Také správná volba kolizního plynu sníží interference na bázi argonu na hmotách (m/z): 52 ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$), 56 ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$) a 80 ($^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$) [45]. Potenciálně interferující polyatomické ionty mohou být oxidovány na vyšší oxidy [45]. Gerber a kol. [46] potlačili interferenci stanovení Se a Fe v různých vzorcích masa pomocí CRC, kdy jako reakční plyn byl použit methan, který umožnil potlačit Ar_2^+ a ArO^+ interference [46]. Dufailly a kol. odstranili polyatomické interference $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ v potravinách živočišného původu a to úpravou toku reakčního plynu [48] a Pick a kol. potlačili interference $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$ [49]. Spektrální interference, které byly způsobené vysokou koncentrací Mo, Zr a Ru (oxidu či hydroxidu) ve vzorcích krmiv pro prasata byly odstraněny dynamickou reakční celou [44] (DRC) a kyslíkem jako reakčním plynem, který podporuje oxidaci interferujících iontů k vyšším oxidům (MoO_2^+ , MoO_3^+ , MoO_4^+ , RuO_3^+ , RuO_4^+ , MoO_2H^+ , MoO_3H^+ , ZrO_2H^+ a ZrO_3H^+) a to vede k oddělení analytů od interferujících prvků [44]. Aktins a kol. odstranili polyatomické spektrální interference $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ a $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, které vznikají interakcí iontů plazmového plynu se vzorkem matrice a rozpouštědla ve vzorcích granulí pro psy a kočky. Došlo tak ke stanovení

izotopů ^{75}As , ^{52}Cr a ^{51}V [28]. V Tabulce 5 je shrnutí měřených izotopů a jejich interferujících iontů ve vybraných vzorcích krmiv a potravin.

Tabulka 5 Izotopy, interferující ionty a jejich řešení

Vzorek	Izotop	Interference	Řešení	Lit.
Potraviny rostl. a živ. původu	^{114}Cd	^{114}Sn	Změna izotopu za ^{111}Cd	[51]
Krmiva pro prasata	^{114}Cd a ^{111}Cd	^{114}Sn	Matematická korekce	[44]
		Např. $^{5}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{94}\text{Mo}^{16}\text{OH}^+$, $^{94}\text{Zr}^{16}\text{OH}^+$, $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{96}\text{Mo}^{18}\text{O}^+$, $^{98}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$, $^{97}\text{Mo}^{16}\text{OH}^+$	DRC	
Potraviny živ. původu	^{52}Cr , ^{56}Fe a ^{80}Se	$(^{40}\text{Ar}^{12}\text{C})$, $(^{40}\text{Ar}^{16}\text{O})$, $(^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar})$	CRC	[45]
Různé druhy masa	^{56}Fe , ^{72}Ge , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se	Ar_2^+ , ArO^+ , $^{64}\text{Zn}(\text{CH}_4)^+$	DRC	[46]
Rostlinné materiály a živočišná krmiva	^{52}Cr , ^{54}Fe , ^{60}Ni , ^{80}Se	Např. $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$, $^{36}\text{Ar}^{24}\text{Mg}$, $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$	DRC	[49]
Produkty živoč. původu	^{75}As	$[^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}]^+$	CRC	[48]
Krmivo pro domácí zvířata	^{75}As , ^{52}Cr a ^{51}V	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ a $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	DRC	[28]

2.2.1.2 Matematická korekce

Uplatňují se jak pro řešení polyatomických, tak i izobarických interferencí [54]. Např. při analýze krmiv pro prasata byla pozorována izobarická interference [44] ^{114}Sn , která bránila stanovení izotopu ^{114}Cd . Matematické korekce mají však nevýhodu v tom, že při nízkých koncentracích selhávají [48].

2.2.1.3 Spektrometry s vysokým rozlišením

Pro eliminaci spektrálních interferencí je možné použít spektrometry s vysokým rozlišením. Jejich nevýhodou je však vysoká pořizovací cena. Další nevýhodou je to, že při nastavení vysokého rozlišení se projeví ztráta citlivosti v důsledku omezené propustnosti iontů. V literatuře jsou však popsány i případy, kdy ani použití vysokého rozlišení nezajistilo úplné odstranění interference, jako např. $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ na stanovení $^{75}\text{As}^+$ ve vzorcích živočišného původu [48].

2.2.2 Nespektrální interference pro metodu ICP-MS a jejich řešení

Nespektrální interference bývají označovány jako matricové efekty a definovány jako potlačení či zesílení variace signálu indukované matricí. Na hmotnosti analytu závisí změna signálu indukovaná matricemi. Matricové efekty mohou být způsobeny štěpením kapiček ve zmlžovací komoře, kolizním rozptylem iontů analytu, posunem rovnováhy ionizace v plazmě atd. U nespektrálních interferencí problém způsobuje typicky vzorek s vysokou koncentrací solí. Dochází k ovlivňování signálu vlivem ukládání solí kolem interface [54, 57]. Nespektrální interference se nejčastěji odstraňují standardním přidavkem nebo porovnávacím prvkem [49, 58]. Nejčastěji používaným porovnávacím prvkem ve výše uvedených praktických aplikacích byl ^{115}In [45, 48] a ^{103}Rh [44, 46, 47].

2.2.3 Spektrální a nespektrální interference pro metodu ICP-OES a jejich řešení

Spektrální interference vznikají hlavně v důsledku překryvu spektrálních čar analytu spektrálními čarami prvků o vyšších koncentracích. Mezi spektrální interference se dále řadí např. skutečný překryv dvou či více čar, nerozlišitelnost čar v důsledku nízké rozlišovací schopnosti spektrometru, rozptyl světla atd. Nejčastější příčinou nespektrálních interferencí u metody ICP-OES jsou především interference snadno ionizovatelných prvků. Nespektrální interference závisejí na koncentraci interferentu, která se poté odvíjí od matrice vzorku, průtoku a složení plynů, příkonu do plazmatu atd. Eliminaci těchto interferencí jsou kalibrační roztoky vzorků nebo porovnávací prvek [59, 60].

2.2.4 Příprava vzorku

Vzorky pro metodu ICP-MS či ICP-OES jsou zpravidla nutné v kapalném stavu. Nejčastější metodou pro rozklad vzorků je mikrovlnná mineralizace. Rozklad je chemický proces, kde dochází k uvolnění analytu z různých chemických forem či vazeb v důsledku chemických reakcí. Výhodou mikrovlnného rozkladu je minimalizace možnosti kontaminace z vnějšího prostředí, doba rozkladu, účinnost rozkladu či menší spotřeba rozkladných činidel oproti ostatním metodám rozkladu [61]. K rozkladu se využívá oxidačních účinků koncentrovaných kyselin (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 atd.) a přidavek dalšího oxidačního činidla (např. H_2O_2 nebo KI). Volba činidel hraje důležitou roli z důvodu tvorby polyatomických iontů. Pro minimalizaci polyatomických iontů se volí nejčastěji činidla HNO_3 a H_2O_2 , protože při použití HClO_4 může docházet k interferenci s As^+ a vzniká AsCl^+ , díky tomu se pak projeví interference při stanovení As. Nejčastější použitá rozkladná činidla v praktických aplikacích byly směsi koncentrované kyseliny dusičné (65%) a peroxidu vodíku (30%) [28, 40, 41, 43, 45-51] či s kombinací HF [44]. Zředěná kyselina dusičná je hojně používána pro vzorky s vysokým obsahem uhlíku [40].

Nunes a kol. [42] použili alkalickou solubilizaci vzorků masa pomocí hydroxidu tetramethylamonného. Výhodou byla minimální manipulace se vzorkem a malé množství činidla. Nevýhodou bylo, že při použití TMAH došlo ke vzniku zakalených roztoků a to pak vedlo k nestabilitě a matricovým účinkům v plazmě [42]. Oliviera a kol. [62] aplikovali kyselinu mravenčí jako alternativní činidlo pro solubilizaci různých matric. Použití kyseliny mravenčí se vyznačuje minimální spotřebou činidla. Kyselina mravenčí se hojně používá v extrakčních postupech pro speciální analýzu [62].

Dalšími možnými rozklady jsou rozklady na suché cestě, otevřené rozklady na mokré cestě a také různé specifické druhy rozkladů, jako např. UV, hydrolytický či fotolytický [61]. Avšak konvekční způsoby přípravy vzorků se považují za časově náročné, vyžadují velké množství reakčních činidel, což zvyšuje náklady na analýzu a může docházet ke kontaminacím vzorků [62].

Výsledky experimentálních dat dříve publikovaných přístupů analýzy byly analyticky zhodnoceny [28, 40-42, 44-51]. V Tabulce 6 jsou uvedeny příklady analýzy krmiv, masa a dalších produktů, které byly analyzovány pomocí vybraných metod atomové spektrometrie.

Tabulka 6 Shrnutí praktických aplikací analýzy krmiv pro domácí zvířata, potravin a různých druhů masa

Vzorek	Navážka (mg)	Příprava	Instrumentace	Analyt	LOD (mg kg ⁻¹)	Porovnávací prvek	Lit.
Krmivo pro psy a kočky	^b	Lyofilizace, homogenizace	DMA 80 - spektrometr pro stanovení rtuťi	Hg	1.10 ⁻³	^b	[39]
Krmivo pro prasata	250±5	MWD (4 ml HNO ₃ , 1ml H ₂ O ₂ , 0,5 ml HF)	DRC-ICP-MS	Cd	0,3.10 ⁻³	Rh	[44]
Maso, mastn.výrobky, rybí produkty, mléčné produkty	300-700	MWD (3 ml 65 % HNO ₃)	CRC-ICP-MS	Cr, Fe, Se	0,008 (Cr)–0,03 (Fe)	Y, Ga, In	[45]
Krmivo pro psy a kočky	1000	Sušení při 105 °C, MWD (6 ml 65% HNO ₃ , 2 ml 30 % H ₂ O ₂)	FL-AAS	Fe, Cu, Mn, Ni, Pb, Cd, Cr	^b	^b	[43]
Krmivo pro psy	100-400	Lyofilizace, 2 ml 20% TMAH	LC-ICP-MS	I ₂	^b	^b	[63]
Krmivo pro psy a kočky	250	MWD (HNO ₃ , H ₂ O ₂)	ICP-OES	Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Ba, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Sr, Zn	26 (Ca)–0,02 (Ba)	^b	[40]
Krmivo pro psy a kočky	1000	MWD (10 ml HNO ₃)	DRC-ICP-MS ICP-OES	As, Be, Cd, Co, Cr., Cs, Cu, Fe, Hg, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Th, Tl, U, V	^b	^b	[28]

Tabulka 6 Pokračování

Vzorek	Navážka (mg)	Příprava	Instrumentace	Analyt	LOD (mg kg ⁻¹)	Porovnávací prvek	Lit.
Různé druhy masa	1000	MWD (8 ml 65% HNO ₃ , 2 ml 30% H ₂ O ₂)	ICP-MS, DRC-ICP-MS	Pb, Zn, Fe, Cd, Mn, Se, Mo, Cu	^b	Rh, Lu	[46]
Maso, krmiva	300 (maso) 250 (krmivo)	MWD (5 ml 65% HNO ₃ , 2 ml 33% H ₂ O ₂)	ICP-AES, ICP-MS	Fe, Zn, Cu, Se	12 (Fe)–0,08 (Se) ^a 9 (Fe)–0,07 (Se) ^a	Rh	[47]
Potraviny živoč. původu	300-700	MWD (3 ml 65% HNO ₃)	CRC-ICP-MS	As	^b	Y, In	[48]
Rostlinné materiály a živoč. krmiva	500	MWD (5 ml 69% HNO ₃ , 2 ml 30% H ₂ O ₂)	DRC-ICP-MS	Se, Ni, Fe, As, Cr	0,031 (As)–0,16 (Se) ^a	^b	[49]
Maso, mléko, sýr	^b	Homogenizace, MWD (HNO ₃ , H ₂ O ₂)	DRC-ICP-MS	Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Fe, Hg, Se, Zn	^b	^b	[50]
Maso a játra	1000	Solubilizace, 1250 µl TMAH	ICP-OES	Fe, Mg, Mn, P, Zn	0,08 (Mn)–0,7 (Fe) µg g ⁻¹	^b	[42]
Maso, ryby a jejich produkty	500	MWD (4 ml 65% HNO ₃ , 2 ml 30% H ₂ O ₂)	ICP-OES	Zn	0,002	^b	[41]
Potraviny rostl. a živočišného původu	200-600	MWD (3 ml 67% HNO ₃)	ICP-MS	Li, Al, V, Mn, Co, Ni, Cu, Ga, Ge, As, Sr, Sn, Sb, Mo, Ag, Te, Ba, Hg, Pb	^b	^b	[51]

^a µg L⁻¹, ^b Neuvedeno

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- *Jednoprvkové standardy:* U, Au, Hf, Cs, Th, Bi, Pb, Tl, Hg, Pt, Re, W, Ta, Ba, Te, Sb, Sn, Cd, Ag, Pd, Ru, Mo, Zr, Sr, Rh, Rb, Se, As, Ge, Ga, Cu, Zn, Co, Ni, Mn, Cr, V, Ti, P, Mg, K, Ca, Na, Fe, Al, B, Be a Li o koncentraci $1 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ nebo $10 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ (Analytika spol., s.r.o, ČR nebo SCP Science Ltd. Kanada)
- *Komerčně připravený standard prvků pro ICP-MS:* Pr, Nd, La, Ce koncentrace 100 mg L^{-1} a Yb, Y, Tm, Tb, Sm, Sc, Lu, Ho, Gd, Eu, Er, Dy koncentrace 20 mg L^{-1} (SCP Science Ltd. Kanada)
- Peroxid vodíku 30% (m/m), TraceSelect (Fluka spol., s. r. o., Švýcarsko); Kyselina dusičná 65% (m/m), p.p. (Penta spol., s.r.o., ČR); NaCl, TraceSelect (Fluka); KCl, TraceSelect (Fluka)

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní multiprvkový roztok „A“ obsahoval 10 mg L^{-1} Hf, Cs, Th, Bi, Pb, Tl, Hg, Pt, Re, W, Ta, Ba, Te, Sb, Sn, Cd, Ag, Pd, Ru, Mo, Zr, Sr, Rb, Se, As, Ge, Ga, Cu, Co, Ni, Mn, Cr, V, Ti, Al, Be, B a Li. Byl připraven roztok o koncentraci $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ředěním zásobního multiprvkového roztoku, takto připravený roztok byl použit pro přípravu kalibrace. Dále byla přidána podvarově přečištěná koncentrovaná HNO_3 v poměru 1:100 za účelem stabilizace iontů.

Zásobní multiprvkový roztok „B“ obsahoval 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ U, Pr, Nd, La, Ce („B1“) a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Yb, Y, Tm, Tb, Sm, Sc, Lu, Ho, Gd, Eu, Er, Dy („B2“). Ředěním byl připraven roztok o koncentraci 50 + 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ „B1“ a „B2“, který byl použit pro přípravu kalibrace. Do 50 mL odměrných baněk bylo přidáno 0,5 mL koncentrované HNO_3 přečištěné podvarovou destilací pro stabilizaci iontů.

Zásobní roztok porovnávacího prvku Rh o koncentraci 10 mg L^{-1} byl postupně ředěn na 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Do všech kalibračních roztoků, modelových roztoků, slepých vzorků a vzorků měřených ICP-MS bylo přidáno Rh na výslednou koncentraci 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pro stabilizaci iontů byla přidána podvarově přečištěná koncentrovaná HNO_3 v poměru 1:100.

Zásobní roztok „A“ pro měření matričních prvků na ICP-OES obsahoval 2 g L^{-1} K, 200 mg L^{-1} Zn a Mg, 50 mg L^{-1} Al, Mn, Fe, Cu a 10 mg L^{-1} Ba. Z důvodu stabilizace iontů bylo přidáno do 50 mL odměrných baněk 0,5 mL koncentrované HNO_3 přečištěné podvarovou destilací.

Zásobní roztok „B“ pro měření matričních prvků na ICP-OES obsahoval 50 mg L^{-1} P, Ca a Na. Za účelem stabilizace iontů byla přidána podvarově přečištěná koncentrovaná HNO_3 , a to v poměru 1:100.

3.2.2 Příprava 2 mol L^{-1} kyseliny dusičné

Byl připraven roztok 2 mol L^{-1} z koncentrované HNO_3 přečištěné podvarovou destilací. Takto připravený roztok byl využit pro loužení chemického nádobí po dobu 24 hodin.

3.2.3 Kalibrační roztoky

- *Kalibrace pro ICP-*oa*-TOF-MS*

Z multiprvkových standardů „A“ ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) a „B“ ($50 + 10 \mu\text{g L}^{-1}$) byly připraveny roztoky kalibrační řady. Prvky multiprvkového standardu A měly koncentraci 0, 1, 2, 5, 10, 20 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ a pro prvky multiprvkového standardu B byly koncentrace v kalibrační řadě: 0; 0,1+0,02; 0,2+0,04; 0,5+0,1; 1+0,2; 2+0,4 a $5+1 \mu\text{g L}^{-1}$.

- *Kalibrace pro ICP-OES*

Pro analýzu vzorků suchých krmiv pro psy a kočky byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku „A“ a „B“ tak, aby výsledná koncentrace analyzovaných matričních prvků byla následující: 0–200 mg L^{-1} K; 0–20 mg L^{-1} Mg a Zn; 0–5 mg L^{-1} Al, Cu, Mn a Fe; 0–1 mg L^{-1} Ba a 0–10 mg L^{-1} Ca, Na a P.

3.3 Seznam analyzovaných vzorků

3.3.1 Certifikovaný referenční materiál

SRM[®] 3290 Dry Cat Food (National Institute of Standards & Technology, USA) je nyní jediný komerčně dostupný referenční materiál a nebyl použit z důvodu vysoké ceny. Byl použit referenční materiál Bovine Liver SRM[®] 1577c (National Institute of Standards & Technology, USA).

3.3.2 Vzorky granulí

Vzorky granulí pro psy a kočky zahrnovaly různé komerčně dostupné produkty na našem trhu. Jednalo se o značky jak místních výrobců granulí, tak mezinárodních společností. Seznam analyzovaných vzorků shrnuje Tabulka 7.

Tabulka 7 Vzorky suchých granulí pro psy a kočky

Číslo vzorku	Značka	Typ	Výrobce/Distributor
1	Pro Plan®	Sterillized Original Chicken with rice for adult neutered/spayed dogs	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
2	Friskies®	Active	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
3	Chappi®	Hovězí & Drůbeží 100% complete	Mars® Czech s.r.o.
4	Carnis	Granule s drůbežím a zeleninou	(vyrobena pro Mountfield v EU)
5	Nutrican	Senior & Light	Canvit s.r.o. (ČR)
6	Nutrican	Adult All breed	Canvit s.r.o. (ČR)
7	Nutrican	Adult Large Breed	Canvit s.r.o. (ČR)
8	Frolic®	S hovězím	Mars® Czech s.r.o.
9	Acana	Puppy Large Breed	Champion Pet Foods (Kanada)
10	Topstein	Fish Crunchies for Dogs	Superprémiová krmiva pro Psy - Topsteinpetfoods.cz (ČR)
11	Topstein	Farm Fresh Chicken & Turkey Active/Puppy Grain free	Superprémiová krmiva pro Psy - Topsteinpetfoods.cz (ČR)
12	Topstein	Farm Fresh Chicken Sensitive Grain Free	Superprémiová krmiva pro Psy - Topsteinpetfoods.cz (ČR)
13	Hill's™	Science Plan™ Canine Adult Advanced Fitness™ (Medium with Chicken, Adult 1–6)	Hill's Pet Nutrition™ Inc. (USA)
14	Friskies®	S lososem a přídánou zeleninou	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
15	Concept for life	Kitten 2–12 měsíců	Matina GmbH (Německo)
16	Royal Canin®	Mother & Babycat	Royal Canin® (USA)
17	Taste of the Wild®	High Prairie Puppy® Formula with Roasted Bison & Roasted Venison	Diamon Pet Foods (USA)
19	k-9	K-9 selection HI-PERFORMANCE formula	Candy, spol. s.r.o.
20	Royal Canin®	Maxi Adult	Royal Canin® (USA)

Tabulka 7 Pokračování

Číslo vzorku	Značka	Typ	Výrobce/Distributor
21	Josera	Festival Adult (Ryba a rýže)	Josera GmbH & Co. KG (Německo)
22	Sam's Field	Fresh Chicken & Potatoe Adult Medium	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
23	Pro Plan®	Adult Original	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
24	Hill's™	Prescription Diet™ j/d™ Canine Mobility	Hill's Pet Nutrition™ Inc. (USA)
25	Brit	Brit Care Puppy Lamb & Rice	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
26	Brit	Brit Care Salmon Salmon & Potato, All breed, Adult	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
27	Brit	Brit Care Grain-Free Salmon & Potato, Junior Large Breed	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
28	Arden Grange	puppy / junior (rich in fresh chicken)	Leander International Pet Foods Ltd. (UK) / NATURPET, s. r. o. (ČR)
29	Purina® Darling		Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
30	Bozita	Original XL	Lantmännen Doggy AB (Švédsko)
31	Grand Vital	Care Snack Training + Ginseng (Doplňkové krmivo pro psy)	A L M I K A s.r.o. (ČR)
32	Sam's Field	Chicken&Potato Adult Large	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
33	Barking Heads®	"puppy days"	Pet Food Ltd. (UK)
34	Perfecto Cat	Gourmet Selection Krocketten Snack mit Inulin (Kroketový snack z atlantického lososa pro kočky)	Futternapf Tiernahrung Vertriebs GmbH (Německo)
35	Sam's Field	Lamb & Potato Light&Senior	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
36	Sam's Field	Salmon & Potato Adult	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
37	GranataPet	Leckerlies Kaninchen Waldbeeren	Altina (Fushsenthaler & Diedrich GbR) (Německo)
38	Fitmin	Maintenance	Dibaq a.s.
40	Arden Grange	Adult Fresh salmon&rice	Leander International Pet Foods Ltd. (UK) / NATURPET, s. r. o. (ČR)

Tabulka 7 Pokračování

Číslo vzorku	Značka	Typ	Výrobce/Distributor
41	Fish4 dogs	Finest Ocean white fish adult	Fish4 dogs Ltd. (UK)
42	Royal Canin®	INDOOR ²⁷	Royal Canin® (USA)
45	Royal Canin®	Adult Mini	Royal Canin® (USA)
46	Brit	Brit Care Adult Medium breed Lamb & Rice	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
47	Annamaet	Lean	Annamaet Petfoods Inc. (USA)
48	Royal Canin®	Medium Adult	Royal Canin® (USA)
49	Brit	Brit Premium Puppies	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
52	Crockex Wellness	Kachna maxi ADULT MINI DUCK RICE LOW GRAIN	Mister Pet srl (Italy) / Pure 4U s.r.o. (ČR)
57	Taste of the Wild®	Canyon River Feline® Formula with Trout & Smoked Salmon	Diamon Pet Foods (USA)
58	Kasiks	Wild Pacific Ocean Fish Meal Formula	FirstMate/KASIKS Pet Foods (Canada)
59	Kitekat	S hovězím masem a zeleninou	Mars® Czech s.r.o.
60	Gemon cat	Light sterilized turkey	Monge & C. Spa (Italy)
63	Almo nature	Holistic Losos s rýží Adult	Almo Nature Swiss GmbH

3.4 Příprava vzorků k analýze

3.4.1 Lyofilizace

Vzorky psích a kočičích granulí byly nejdříve rozdrceny a homogenizovány v hmoždíři a poté bylo naváženo přibližně 1 g vzorku, který byl zamražen po dobu 24 hodin na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve sterilních skleněných nádobách. Teplotní program lyofilizace byl následující: I. tlak 0 kPa po dobu 1 hodiny; II. tlak 0,1 kPa po dobu 20 hodin; III. tlak 0 kPa po dobu 4 hodin. Druhý krok byl optimalizován pro 3 doby (12, 24 a 48 hodin). Optimální doba lyofilizace byla 24 hodin.

3.4.2 Mikrovlnná mineralizace

Dále byly lyofilizované vzorky suchých krmiv v množství 400 (± 10) mg naváženy do 100 mL rozkladných teflonových nádob, bylo přidáno 6 mL HNO_3 (65%, m/m), 2 mL H_2O_2 (30%, m/m). Nádoby byly uzavřeny a vloženy do mikrovlnné pece a rozklad byl proveden podle teplotního programu (Tabulka 8), který byl optimalizován. Získaný čirý mineralizát byl převeden do 25 mL odměrné baničky a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Pro analýzu pomocí metody ICP-MS bylo k těmto připraveným roztokům přidáno Rh na výslednou koncentraci $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Vzorky bylo nutno 10x naředit pro stanovení Sr metodou ICP-MS. Slepé pokusy byly připraveny stejným postupem jako reálné vzorky a obsahují mineralizační činidla a redestilovanou vodu.

Tabulka 8 Teplotní program pro MWD

	1. krok	2. krok	3. krok	4. krok	5. krok
Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	160	190	230	50	50
Tlak (bar)	35	35	35	35	40
Doba držení (min)	5	5	20	10	0
Doba nárůstu (min)	5	2	3	1	0
Výkon (%)	70	80	90	0	0

3.5 Použitá instrumentace

3.5.1 Mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert

Přístroj Speedwave Xpert (Obrázek 2) [64] je vyrobený firmou Berghof (Německo) a pracuje v uzavřeném systému s fokusovaným mikrovlnným polem. Tento přístroj se vyznačuje vysokým výkonem 2000 W, tlakem až 150 barů a teplotou dosahující k 300 °C. Je vhodný i pro velmi složité matrice, jako např. kovy, slitiny, minerály, vzorky se zvýšeným obsahem tuku atd. Uvnitř mikrovlnného zařízení se nachází karusel s osmi nádobami, které jsou vyrobeny z polytetrafluoretylenu. Nádoby jsou poté vloženy do teflonového obalu s keramickým pouzdem. Přístroj je možné ovládat i prostřednictvím mobilního zařízení. Celý průběh rozkladu lze pozorovat na moderní dotykové obrazovce, kde můžeme vidět např. snímání teplot pomocí bezkontaktního infračerveného teploměru umístěného ve vnitřní rozkladné nádobě [64, 65].



Obrázek 2 Mikrovlnné rozkladné zařízení Speedwave Xpert [64]

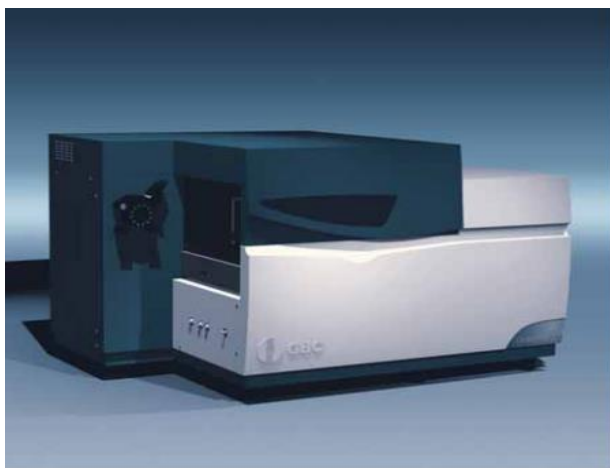
3.5.2 Spektrometr pro stanovení rtuti AMA 254

Přístroj AMA 254 (Advanced Mercury Analyser) vyrobený společností Altec, ČR je jednoúčelovým spektrometrem pro stanovení rtuti se sériovým uspořádáním měřících kyvet. Stanovení rtuti v kapalných nebo pevných vzorcích je možné bez předchozí úpravy vzorku, tím se může zabránit případné kontaminaci či ztrátám rtuti. Uvnitř přístroje dochází ke generování par kovové rtuti. Dojde zde k zachycení jejich par, zkoncentrování na zlatém amalgátoru a následné detekci. Termickým rozkladem vzorku uvnitř systému dochází k vysušení vzorku a k pyrolýze. Vzniklé produkty jsou unášeny proudem kyslíku do amalgamátoru, kde dochází k zachycení rtuti. Rychlým ohřevem amalgamátoru se odstraní zbývající produkty rozkladu pomocí kyslíku a zároveň se uvolní páry rtuti. Detekce je založena na měření absorbance uvolněných par při vlnové délce 253,65 nm. Výhodou této metody je vysoká citlivost a nezávislost na matrici vzorku [66]. Před každým měřením byla ověřena kontrola čistoty analyzátoru. Pomocí analýzy kontrolního standardu byla provedena funkčnost spektrometru a poté kontrola platnosti kalibrace. Za zásobního roztoku $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ byl připraven standard o koncentraci $0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$. Nadávkováním $100 \mu\text{l}$ standardního roztoku byla provedena tři měření. Naměřené hodnoty byly vždy v rozmezí do 10 % správné hodnoty, následně bylo přistoupeno k vlastní analýze suchých krmiv pro domácí zvířata. Každý vzorek byl změřen minimálně třikrát. Bylo naváženo přibližně 100 mg vzorku na dávkovací lodičku. Získané hodnoty vzorku v $\mu\text{g kg}^{-1}$ byly zaznamenávány.

3.5.3 Spektrometr ICP-oa-TOF-MS

Multielementární analýza byla provedena pomocí ICP-MS spektrometru GBC OptiMass 8000 [67] (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie), který je uvedený na Obrázku 8. Tento hmotnostní spektrometr se skládá ze systému vnášení vzorků, ICP zdroje, interface a hmotnostního spektrometru. Vzorek je nasáván perislatickou pumpou a zmlžován koncentrickým zmlžovačem. Velké kapky aerosolu jsou odstraněny pomocí dvouplášťové mlžné komory, která je ochlazena na $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Z vysokoteplotního plazmatu do spektrometru dochází přes interface k extrahování iontů. Tříkónusový systém snižuje tlak pomocí kombinace rotační pumpy a tří výkonných turbomolekulárních pump, protože plazma funguje za atmosférického tlaku, zatímco hmotnostní spektrometr za velmi nízkého tlaku.

K ortogonálnímu akceleratoru jsou fokusovány ionty z interface. Brána „Smart Gate“ má funkci vyřezávání nežádoucích izotopů z analyzovaného spektra a nachází se v první fokusační zóně spektrometru. Díky vyřezávání iontů ze spektra dojde ke snížení pozadí hmotnostního spektra a tím prodloužení doby životnosti detektoru. Ionty prolétají průletovou zónou, jsou iontovým reflektorem otočeny a dopadají na detektor [67]. Parametry nastavení přístroje jsou uvedeny v Tabulce 9 a parametry nastavení SmartGate pro analýzu psích a kočičích granulí jsou uvedeny v Tabulce 10.



Obrázek 3 Spektrometr ICP-*oa*-TOF-MS GBC OptiMass 8000 [67]

*Tabulka 9 Podmínky nastavení ICP-*oa*-TOF-MS spektrometru GBC OptiMass 8000*

ICP Source		
Rf power	1250 W	
Plasma gas flowrate	11,00 L min ⁻¹	
Auxiliary gas flowrate	0,80 L min ⁻¹	
Nebuliser gas flow rate	0,99 L min ⁻¹	
Mass Spectrometer		
Ion optics	Skimmer	-950 V
	Extraction	-1 200 V
	Z1 gain	-561 V
	Y mean	-400 V
	Y deflection	-1 V
	Z lens mean	-890 V
	Z lens deflection	-40 V
	Lens body	-128 V
Pulse shaping	Fill	-32 V
	Fill bias	1 V
	Fill grid	-0,6 V
	Pushout plate	560 V
	Pushout grid	-460 V
	Blanker	200 V
	Blanker spectral frequency	33 kHz
	Reflection	610 V
Detection	Multiplier gain	2800 V
	Ion threshold	5,78 mV
	Integration Windows	Auto
	Measurement mode	Pulse counting/analog

Tabulka 10A Nastavení parametrů brány „Smart Gate“ pro analýzu granulí pro řaděné vzorky

Rozsah m/z	Interferující ionty
11,5 – 49,5	$^{12}\text{C}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{24-26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{32-34}\text{S}$, $^{35-37}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
53,5 – 57,5	$^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{ArO}^+$, ^{56}Fe
63,5 – 68,2	$^{64}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$
79,4 – 81,7	$^{40}\text{Ar}_2^+$

Tabulka 10B Nastavení parametrů brány „Smart Gate“ pro analýzu granulí pro neřaděné vzorky

Rozsah m/z	Interferující ionty
9,7 – 49,5	$^{12}\text{C}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{24-26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
53,4 – 57,1	$^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{ArO}^+$, ^{56}Fe
62,5 – 68,2	$^{63}\text{Cu}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$
79,4 – 88,2	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{85}\text{Rb}^+$, $^{88}\text{Sr}^+$

3.5.4 Spektrometr ICP-OES Integra XL

Matriční prvky byly stanoveny pomocí ICP-OES spektrometru GBC Integra XL 2 (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) [68]. Přístroj se skládá z monochromátoru Czerny Turner, generátoru vysokofrekvenčního plazmatu a dvou fotonásobičů. Peristaltická pumpa, skleněná cyklonická mlžná komora a zmlžovač V-groove jsou součástí systému vnášení vzorku [68]. Nastavení parametrů optického emisního spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu se nachází v Tabulce 11.

Tabulka 11 Podmínky nastavení ICP-OES spektrometru GBC Integra XL 2

Rf frequency	40,68 MHz
Rf power	1100 W
View height	6 mm
Gas	Argon 99,999%
Plasma gas	11 L min ⁻¹
Auxilliary gas	0,6 L min ⁻¹
Nebulizer gas	0,6 L min ⁻¹
Photomultiplier voltage	600 V
Read	On-peak, 1 s
Background correction	Fixed point
Number of replicates	3
View	Radial
Emission lines:	Ca (422,673 and 317,933 nm); Ba (455,403 and 493,409 nm); Al (308,215 and 396,152 nm); P (213,618 and 214,914 nm); Na (588,995 and 589,592 nm); K (769,896 nm); Mg (279,553 and 285,213 nm); Fe (259,94 and 238,204 nm); Mn (257,61 and 259,373 nm); Zn (213,586 and 202,548 nm); Cu (324,754 and 327,396 nm); C (247,856 nm).

3.5.5 Podvarové destilační zařízení

Pro přípravu přečištěné HNO₃ bylo použito podvarové destilační zařízení BSB 939IR (Berghof GmbH, Německo, Obrázek 4) [69]. Podvarové zařízení se může využít i pro destilaci H₂O₂, HCl či HF. Zařízení se skládá z IR-lampy (díky které je ohřev bezkontaktní), PTFE nádoby s odpařovací komorou a s chladičem z PFA. Díky bezkontaktnímu ohřevu a styku kondenzátu pouze s PFA nedochází ke kontaminacím a kyselina tak může být využívána i pro ultrastopové analýzy [69].



Obrázek 4 Destilační podvarové zařízení BSB 939IR

3.5.6 Lyofilizátor ScanVac CoolSafe

ScanVac CoolSafe lyofilizátor je vyrobený firmou LaboGene ApS (Dánsko) [70]. Vzorek je nejprve zmrazen v hluboko mrazícím boxu na teplotu -15 až -80 °C za atmosférického tlaku. Krystalky ledu začnou sublimovat postupným snižováním tlaku nad vzorkem. Páry jsou odváděny do kondenzátoru ledu. Postupným zvyšováním teploty nad 0 °C při nízkém tlaku dochází k odstranění zbytkové vlhkosti. Jakmile je odstraněna zbytková vlhkost, dojde k pozvolnému vyrovnávání tlaků pomocí vakuového ventilu. Kapacita kondenzoru činí během 24 hodin 2,5 kg, celkový objem dosahuje 4 L a pracovní teplota je -110 °C [70].

3.5.7 Ostatní laboratorní přístroje a pomůcky

Laboratorní nádobí SIMAX (ČR), pipeta Distriman (Gilson, USA), sada automatických pipet (Biohit, Finsko), elektronické váhy KERN 870 (Německo), redestilovaná voda ze zařízení Milli-Q® Reference (Merc Millipore, Německo), MS Office 2010 (Microsoft corporation, USA), QC-Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, s.r.o., ČR), Statistica 12 (StaSoft, USA), Origin 8 (OriginLab corporation, USA).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace lyofilizace a parametrů měření pro metodu ICP-OES a ICP-MS

4.1.1 Optimalizace lyofilizace

Vlhkost ze vzorku byla odstraněna pomocí lyofilizace (kapitola 3.5.6.). Optimalizace doby lyofilizace byla provedena na 15 vzorcích suchých krmiv, a to na základě rozdílů v sušině vzorku (m/m, %). Byly testovány tři doby procesu lyofilizace 12, 24 a 48 hodin. Na hladině významnosti 0,05 pomocí Studentova testu nebyly shledány významné rozdíly mezi dobami lyofilizace 12 a 48 hodin ($p = 0,067$). Nakonec byla z důvodu zajištění robustnosti metody zvolena jako optimální doba lyofilizace 24 hodin. V prvotních vzorcích nebyl podíl vody vyšší než 5 %.

4.1.2 Optimalizace parametrů ICP-OES

Z důvodu odhalení možných spektrálních interferencí byly vzorky drůbežích, jehněčích, hovězích a rybích granulí analyzovány vždy na dvou vlnových délkách. Použité vlnové délky jsou uvedeny v Tabulce 11. Vlnová délka draslíku byla zvolena pouze 769,896 nm, jelikož ostatní vlnové délky nevykazovaly dostatečné citlivosti. Nepřítomnost spektrálních interferencí byla dokázána pomocí výsledků analýzy CRM a také díky párovému *t*-testu (hladina významnosti 0,05) bylo zjištěno, že koncentrační rozdíly daného prvku měřených na dvou vlnových délkách nebyly významné.

Pro 11 analyzovaných prvků a dvě vlnové délky trvala doba analýzy jednoho vzorku zhruba 30 minut, proto byla dále použita pouze jedna vlnová délka, která byla zvolena s ohledem na její citlivost a díky tomu byla doba analýzy zkrácena na polovinu. Na zvolených vlnových délkách byly srovnány směrnice standardního přídatku a kalibrace s maticí se směrnici vodné kalibrace (Tabulka 12) k odhalení možného vlivu nespektrálních interferencí. Pro analýzu pomocí metody ICP-OES bylo využito vodné kalibrace bez porovnávacího prvku, protože nebyly nalezeny významné rozdíly mezi diferencemi směrnice.

Tabulka 12 Porovnání směrnice získanými metodou standardního přídatku (SP) a kalibrací s maticí (KM) se směrnici vodné kalibrace (VK) pro vybrané prvky metodou ICP-OES

Analyt	λ (nm)	Směrnice VK	Δ KM/VK ^b	Δ SP/VK ^b
Al	308,215	10948	1,80	5,77
Zn	213,856	114762	5,55	0,96
Ba	455,403	1976790	5,93	-0,68
Mn	257,61	483190	3,74	-1,60
K	769,896	891	5,23	-3,90
Fe	259,94	389492	0,79	-2,00
Mg	279,553	121719	2,88	3,94
Cu	324,754	107275	1,80	-4,47
Na ^a	588,995	73800	3,33	-3,15
P ^a	213,618	5129	3,57	-4,17
Ca ^a	422,673	72585	-0,45	-2,82

^a Pro vzorky 100x naředěné

^b Diference směrnice

4.1.3 Optimalizace parametrů ICP-MS

Nastavení základních parametrů přístroje ICP-MS bylo optimalizováno již dříve [71]. Pozornost byla věnována na nastavení brány „SmartGate“. Bylo nejprve proměřeno hmotnostní spektrum neředěného roztoku vzorku v rozsahu 6-238 m/z. Signály, u kterých byla odezva větší než 10^7 countů, odpovídaly prvkům Fe, Cu, Zn a Sr. Z důvodu ochrany detektoru byly tyto prvky odstraněny (tabulka 10A, kapitola 3.5.3) a pomocí tohoto nastavení byly měřeny prvky U, Th, Er, Ho, Dy, Gd, Eu, Nd, Pr, Ce, Cs, Sb, Mo, Se, As, Ga, Co, Ni, Cr, V a Li v neředěných mineralizovaných vzorcích.

Pro roztoky, které byly naředěny 10x, byla brána „SmartGate“ (10B, kapitola 3.5.3) nastavena stejným postupem. Zde bylo nutné odstranit prvky Fe a Zn ze spektra a byly naměřeny opět

tyto prvky: U, Th, Er, Ho, Dy, Gd, Eu, Nd, Pr, Ce, Cs, Sb, Mo, Se, As, Ga, Co, Ni, Cr, V a Li a navíc Sr a Rb.

4.2 Přesnost stanovení

SRM[®] 3290 Dry Cat Food (National Institute of Standards & Technology, USA) je nyní jediný komerčně dostupný referenční materiál a nebyl použit z důvodu vysoké ceny. A také zde bylo certifikováno pouze 10 analytů z námi analyzovaných 35. Pro ověření správnosti postupu byl použit referenční materiál SRM[®] 1577c Bovine Liver (National Institute of Standards & Technology, USA). V analyzovaném CRM byla nalezena dobrá shoda mezi naměřenými a deklarovanými hodnotami (Tabulka 13). Pro analýzu ICP-MS i ICP-OES byly dále vzorky obohaceny multiprvkovým standardem. Hodnoty analytických návratnosti se pohybovaly v rozmezí 86–115 %. Shodnost metody vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka tří nezávislých stanovení vzorků během jednoho dne dosahovala hodnoty lepší než 10 %.

Tabulka 13 Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v certifikovaném referenčním materiálu SRM[®] 1577c Bovine Liver

ICP- <i>oa</i> -TOF-MS	Koncentrace ^a (μg kg ⁻¹)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Nalezeno	Deklarováno		
⁷ Li ⁺	12,8 ± 0,5	12 ^d	104	2,03
⁵² Cr ⁺	55,4 ± 0,8	53 ± 14	105	0,73
⁵⁸ Ni ⁺	45,8 ± 10,2	44,5 ± 9,2	103	11
⁵⁹ Co ⁺	0,296 ± 0,006 ^e	0,300 ± 0,018 ^e	99	1
⁷⁵ As ⁺	20,0 ± 2,4	19,6 ± 1,6	102	6
⁷⁸ Se ⁺	1,994 ± 0,068 ^e	2,031 ± 0,045 ^e	98	2,76
⁸⁵ Rb ⁺	33,8 ± 0,7 ^e	35,3 ± 1,1 ^e	96	1,1
⁸⁸ Sr ⁺	99,3 ± 3,2	95,3 ± 4,2	104	1,63
⁹⁸ Mo ⁺	3,3 ± 0,16 ^e	3,3 ± 0,13 ^e	100	2,45
¹²¹ Sb ⁺	3,304 ± 0,28	3,13 ± 0,31	106	4,31
¹³³ Cs ⁺	20,4 ± 0,88	21,7 ± 1,4	94	2,15
Termooxidační metoda	Koncentrace ^a (μg kg ⁻¹)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Nalezeno	Deklarováno		
Hg	4,9 ± 0,42	5,36 ± 0,17	92	7,06
ICP-OES	Koncentrace ^a (μg kg ⁻¹)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Nalezeno	Deklarováno		
Na	0,2024 ± 0,0029 ^f	0,2033 ± 0,0064 ^f	100	1,5
P	1,175 ± 0,0085 ^f	1,175 ± 0,027 ^f	100	1
Ca	126 ± 12	131 ± 10	96	5,3
K	1,026 ± 0,076 ^f	1,023 ± 0,064 ^f	100	3,7
Mg	626 ± 12	620 ± 42	101	1
Fe	198 ± 1	198 ± 0,65	100	0,3
Mn	10,9 ± 0,13	10,46 ± 0,47	104	1,3
Zn	180 ± 5,6	181,1 ± 1	99	1,55
Cu	276,6 ± 4,43	275,2 ± 4,6	101	1
Na	0,2024 ± 0,0029 ^f	0,2033 ± 0,0064 ^f	100	1,5
P	1,175 ± 0,0085 ^f	1,175 ± 0,027 ^f	100	1

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

^d Indikovaná hodnota, ^e mg kg⁻¹, ^f %.

4.3 Detekční limity a meze stanovitelnosti

Hodnoty detekčních limitů (3σ) a meze stanovitelnosti (10σ) jsou uvedeny v Tabulce 14. Pro metodu ICP-MS byla doba akvizice 5 sekund. Standardy a blanky u metody ICP-MS byly analyzovány v deseti replikách, zatímco u ICP-OES pak ve třech replikách. Bylo dosaženo dostatečných detekčních limitů ke stanovení analyzovaných elementů v reálných vzorcích.

Tabulka 14 Limity detekce a meze stanovitelnosti techniky a metody

ICP-oa-TOF-MS					
Analyt	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Analyt	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
⁷ Li ⁺	4,2	1,3	¹³³ Cs ⁺	0,0825	0,025
⁵¹ V ⁺	8,3	2,5	¹⁴⁰ Ce ⁺	0,145	0,044
⁵² Cr ⁺	27	8,2	¹⁴¹ Pr ⁺	0,0515	0,0156
⁵⁸ Ni ⁺	5,61	1,7	¹⁴⁶ Nd ⁺	0,041	0,012
⁵⁹ Co ⁺	0,469	0,142	¹⁵¹ Eu ⁺	0,0231	0,007
⁷⁵ As ⁺	9,03	2,7	¹⁵⁷ Gd ⁺	0,0198	0,006
⁷⁸ Se ⁺	1,69	0,514	¹⁶¹ Dy ⁺	0,132	0,04
⁸⁵ Rb ⁺	1,41	0,428	¹⁶⁵ Ho ⁺	0,0759	0,023
⁸⁸ Sr ⁺	1,6	0,47	¹⁶⁶ Er ⁺	0,0232	0,007
⁹⁸ Mo ⁺	0,469	0,142	²³² Th ⁺	0,112	0,034
¹²¹ Sb ⁺	1,39	0,421	²³⁸ U ⁺	0,0957	0,029

ICP-OES					
Analyt	LOQ (mg kg^{-1})	LOD (mg kg^{-1})	Analyt	LOQ (mg kg^{-1})	LOD (mg kg^{-1})
K	18,5	5,6	Cu	0,578	0,175
Mg	0,516	0,156	Al	1,53	0,463
Fe	1,35	0,410	Na	4,95	1,5
Mn	0,571	0,173	P	3,47	1,05
Ba	0,167	0,0506	Ca	0,627	0,190
Zn	0,957	0,290			

Při výpočtu LOD, LOQ byla zohledněna navážka (400 mg) a ředění vzorku.

4.4 Aplikace statistické analýzy dat pro analýzu reálných vzorků suchých granulí pro psy a kočky

4.4.1 Exploratorní analýza dat

Pro ověření základních předpokladů a odhalení zvláštností v datech byla použita exploratorní analýza dat. Byla provedena matematická transformace dat [72], která vede ke stabilizaci rozptylu a zesymetričtění rozdělení, protože exploratorní analýzou bylo zjištěno, že se některé rozdělení ze studovaných výběrů liší od rozdělení normálního. V Tabulce 15 jsou uvedeny základní statistické charakteristiky analyzovaných dat pro jednotlivé proměnné a také údaje týkající se počtu odlehlých bodů nalezených v každém z výběrů. Počty odlehlých bodů indikují vzorky, které se liší v koncentracích daného analytu ve srovnání s ostatními vzorky., tudíž není možné případnou asymetrii v datech eliminovat pomocí odstranění odlehlých bodů. Mohlo by dojít ke ztrátám cenných informací v datech a následné chybné interpretace výsledků.

Tabulka 15 Statistické charakteristiky stanovení obsahu Hg, Na, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Ba, Zn, Cu, Al, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U (mg kg^{-1}) ve vzorcích suchých krmiv pro psy a kočky ($n = 51$)

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. odch.	Šikmosť	Špičato st	p^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
Hg	0,006	0,0041	0,0086	0,0033	0,003	0,004	$6,6 \cdot 10^{-5}$	0,0081	2,601	9,9	$2,0 \cdot 10^{-4}$	0,0033	0,0026	0,004	5
Na	3621	3049	4194	3247	2856	3691	$4,1 \cdot 10^6$	2036	3,1	17	$6,5 \cdot 10^{-5}$	3467	2931	4003	1
P	9783	9082	10484	9686	9003	10385	$6,2 \cdot 10^6$	2494	0,669	7,4	0,134	9655	8809	10500	2
Ca	13776	12400	15153	1330	12055	14624	$2,4 \cdot 10^7$	4893	1,3	7,7	0,012	13686	11897	15475	1
K	6476	5890	7063	6056	5574	6602	$4,3 \cdot 10^7$	2084	0,803	3,0	0,077	6154	5485	6823	0
Mg	1151	1062	1242	1063	1002	1136	$1,0 \cdot 10^5$	321	1,2	3,7	0,015	1075	984	1166	0
Fe	258	224	292	230	205	259	14288	119	1,02	3,3	0,032	215	177	254	0
Mn	45	40	51	44	38	49	385	20	0,413	3,1	0,376	47	39,7	54	0
Ba	6,6	4,8	8,5	4,7	4	5,5	44	6,7	3,1	14	$5,7 \cdot 10^{-5}$	4,8	3,7	6	4
Zn	159	141	177	153	136	172	4262	65	0,603	4	0,176	162	143	181	0
Cu	16	14,3	18,1	16	14	17	46	6,8	0,703	4	0,117	16	14	17	1
Al	138	94	183	93	79	110	25120	158	3,7	19	$1,6 \cdot 10^{-5}$	86	66	107	3
Li	0,185	0,115	0,254	0,111	0,096	0,129	0,0614	0,247	3,6	17	$1,7 \cdot 10^{-5}$	0,112	0,091	0,132	5
V	0,484	0,352	0,616	0,306	266	0,357	0,220	0,469	2,4	9	$3,9 \cdot 10^{-4}$	0,305	0,239	0,371	3
Cr	1,04	0,884	1,2	0,922	0,8	1,1	0,305	0,552	1,02	3,7	0,032	0,909	0,717	1,1	0
Ni	2,6	2,2	2,9	2,3	2,0	2,6	1,5	1,2	1,2	4,3	0,017	2,2	1,9	2,6	0
Co	0,238	0,199	0,276	0,199	0,175	0,228	0,0182	0,135	1,6	5,6	0,0042	0,191	0,156	0,225	1
Ga	0,406	0,316	0,495	0,311	0,271	0,36	0,1	0,317	2,5	9,3	$2,3 \cdot 10^{-4}$	0,331	0,28	0,381	4

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05 data nevykazují normální rozložení. OB odlehlý bod; IS interval spolehlivosti

Tabulka 15 Pokračování

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr r^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. odch.	Šikmost	Špičato st	p^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
As	0,197	0,135	0,258	0,098	0,082	0,119	0,048	0,218	1,7	5	0.0026	0,107	0,075	0,14	2
Se	0,678	0,552	0,803	0,544	0,466	0,638	0,199	0,446	1,3	4	0.011	0,518	0,425	0,611	1
Rb	4,6	4,1	5,3	4,2	3,8	4,7	4,6	2,1	2,0	9	9,1.10⁻⁴	4,1	3,6	4,7	1
Sr	18,8	15,1	22,6	15	13	18	177	13,3	1,3	3,7	0.0121	13	10	15	0
Mo	0,573	0,455	0,691	0,47	0,412	0,54	0,176	0,419	3,6	20	1.8.10⁻⁵	0,459	0,404	0,513	1
Sb	0,0496	0,0339	0,0653	0,032	0,027	0,039	3,1.10 ⁻³	0,056	2,8	11	1,2.10⁻⁴	0,029	0,021	0,037	5
Cs	0,0395	0,0342	0,0447	0,036	0,032	0,041	3,5.10 ⁻⁴	0,0186	2,4	13	3,5.10⁻⁴	0,038	0,035	0,04	1
Ce	0,242	0,131	0,354	0,145	0,123	0,171	0,156	0,395	5,4	34	7,1.10⁻⁷	0,146	0,105	0,187	4
Pr	0,0248	0,0164	0,033	0,0165	0,141	0,0195	9.10 ⁻⁴	0,03	4,5	26	3,1.10⁻⁶	0,017	0,012	0,0217	3
Nd	0,0604	0,0368	0,084	0,0165	0,0142	0,0195	0,007	0,084	5	31	1,3.10⁻⁶	0,041	0,0308	0,052	3
Eu	0,0043	0,0029	0,0056	0,0028	0,0024	0,0033	2,3.10 ⁻⁵	0,0048	3,8	20	1,2.10⁻⁵	0,0028	0,0019	0,004	3
Gd	0,0105	0,0069	0,0141	0,0064	0,0054	0,0077	1,7.10 ⁻⁴	0,013	3,5	18	2,2.10⁻⁵	0,0067	0,0053	0,008	6
Dy	0,0137	0,0090	0,0184	0,0075	0,0063	0,009	2,8.10 ⁻⁴	0,017	2,5	9	2,4.10⁻⁴	0,0072	0,005	0,009	4
Ho	0,0027	0,0017	0,0038	0,0013	0,0011	0,0016	1,36.10 ⁻⁵	0,0037	2,5	8,8	2,7.10⁻⁴	0,0013	0,0009	0,002	4
Er	0,0087	0,0054	0,0121	0,0042	0,0036	0,0051	1,4.10 ⁻⁴	0,012	2,5	8,5	2,6.10⁻⁴	0,0039	0,0029	0,005	6
Th	0,0603	0,0468	0,0738	0,049	0,041	0,059	0,0023	0,048	2	6,9	0.0011	0,045	0,0418	0,049	6
U	0,164	0,0312	0,297	0,086	0	0,287	0,223	0,472	4	21	5,4.10⁻⁶	0,022	0,018	0,027	8

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0.05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05 data nevykazují normální rozložení. OB odlehlý bod; IS interval spolehlivosti

Pro klasifikaci vzorků byla zvolena diskriminační analýza, jejichž základním předpokladem je platnost vícerozměrné normality, tzn. pro jednotlivé znaky normální rozdělení v rámci jednotlivých tříd. Podle srovnání hodnot aritmetického průměru a mediánu či hodnot šikmosti a špičatosti lze usoudit typ rozdělení. V Tabulce 16 jsou uvedeny popisné statistiky diskriminátorů v rámci jednotlivých tříd a výsledky kombinovaného testu normality. Předpoklad normality nebyl splněn v případě výběru koncentrace Hg, Na, Ca, Mg, Fe, Ba, Al, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U v první skupině analyzovaných vzorků a v druhé skupině pro Li, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho a Er. V Tabulce 16 jsou i obsaženy hodnoty směrodatných odchylek, které posuzují podobnost kovariančních matic jednotlivých tříd. Hodnoty korelací a kovariancí vzniklé z jednotlivých kategorií, jsou-li ignorovány smíšené proměnné jejich diskriminátorů, shrnuje Tabulka 17. Tabulka 18 obsahuje hodnoty korelace a kovariance uvnitř jednotlivých tříd. Hodnoty kovariancí a korelací jsou umístěny v pravé horní, resp. levé spodní části matice. Z Tabulky 17 je patrné, že se v datech nachází celá řada statisticky významných korelací, např. mezi koncentrací Al a Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Ca-P, As-Hg, atd.

Tabulka 16 Statistické charakteristiky stanovení obsahu Hg, Na, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Ba, Zn, Cu, Al, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U ve vzorcích (mg kg^{-1}), suchých krmiv pro kočky a psy ($n = 51$) v rámci jednotlivých tříd

Průměr	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	$5,8 \cdot 10^{-3}$	3546	9713	14055	6154	1129	240	45	6	160	16,4	109
2	$9,2 \cdot 10^{-3}$	4029	10161	12279	8208	1275	356	47	7,6	153	15,1	299
Sm. odchylka	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	$6,8 \cdot 10^{-3}$	2157	2652	5139	1803	299	106	19,7	6,9	67	7,0	74
2	0,014	1205	1416	3087	2731	424	148	20	4,9	60	5,4	333
Šikmost	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	2,2	3,2	0,712	1,2	0,664	1,157	1,1	0,638	3,3	0,714	0,743	2,3
2	2,0	-0,66	0,451	0,383	0,142	0,979	0,392	-0,896	0,777	-0,553	-0,458	1,3
Špičatost	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	7,2	16,7	6,9	7,2	2,8	3,8	3,6	3,3	13,9	4,0	3,9	9,5
2	5,3	3,1	2,3	1,4	1,5	2,2	1,5	2,7	2,4	2,6	2,5	3,2
p^a	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,02 \cdot 10^{-4}$	0,138	0,023	0,166	0,027	0,039	0,184	$8,41 \cdot 10^{-5}$	0,138	0,123	$8,5 \cdot 10^{-4}$
2	0,023	0,49	0,697	0,766	0,952	0,251	0,758	0,301	0,389	0,594	0,69	0,132

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0.05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0.05 data nevykazují normální rozložení.

Tabulka 16 Pokračování

Průměr	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	0,175	0,441	1,04	2,5	0,236	0,389	0,19	0,657	4,8	20	0,598	0,053
2	0,241	0,716	1,04	2,7	0,246	0,494	0,233	0,791	4,2	17,9	0,443	0,031
Sm. odchylka	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	0,242	0,421	0,534	1,2	0,141	0,282	0,211	0,439	2,3	13,1	0,445	0,0598
2	0,286	0,659	0,684	1,6	0,103	0,480	0,269	0,499	1,5	15,1	0,220	0,021
Šikmost	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	4,2	2,7	1,06	1,1	1,7	3,1	1,9	1,3	2,0	1,3	3,489	2,6
2	1,8	1,3	0,882	1,1	-0,244	1,1	1,1	1,4	0,265	1,04	0,943	1,99
Špičatost	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	21	11	3,8	4,3	5,6	14	5,9	4,0	8,6	3,9	18,2	9,3
2	4,8	3,4	3,01	3,5	1,7	2,3	2,4	3,7	2,1	2,8	2,5	5,6
p^a	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	0,038	0,0299	$4,8 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-3}$	0,018	$1,6 \cdot 10^{-3}$	0,014	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$
2	0,037	0,120	0,311	0,174	0,888	0,195	0,174	0,097	0,871	0,218	0,272	0,021

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0.05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0.05 data nevykazují normální rozložení.

Tabulka 16 Pokračování

Průměr	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,037	0,189	0,021	0,050	3,8.10 ⁻³	9,2.10 ⁻³	0,013	2,6.10 ⁻³	8,6.10 ⁻³	0,055	0,189
2	0,055	0,533	0,046	0,118	6,7.10 ⁻³	0,017	0,019	3,3.10 ⁻³	9,5.10 ⁻³	0,088	0,030
Sm. odchylka	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,014	0,153	0,015	0,036	3,1.10 ⁻³	8,4.10 ⁻³	0,015	3,6.10 ⁻³	0,012	0,042	0,511
2	0,032	0,929	0,068	0,194	9,8.10 ⁻³	0,026	0,026	4,5.10 ⁻³	0,013	0,071	0,019
Šikmost	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,411	2,9	2,4	2,2	2,6	2,2	2,6	2,7	2,7	2,01	3,8
2	1,9	2,03	1,9	2,0	2,1	1,9	1,7	1,9	1,7	1,3	1,2
Špičatost	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	3,1	13,5	11,0	9,8	11,1	8,0	10,3	10,2	9,3	7,4	17,6
2	5,1	5,5	5,0	5,4	5,6	5,02	4,5	4,4	4,3	3,3	3,9
p^a	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,421	1,9.10⁻⁴	6,8.10⁻⁴	1,1.10⁻³	3,4.10⁻⁴	1,1.10⁻³	3,4.10⁻⁴	2,8.10⁻⁴	3,2.10⁻⁴	1,8.10⁻³	2,54.10⁻⁵
2	0,029	0,019	0,029	0,021	0,018	0,027	0,040	0,045	0,047	0,115	0,159

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0.05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0.05 data nevykazují normální rozložení.

Tabulka 17 Celková korelace a kovariance

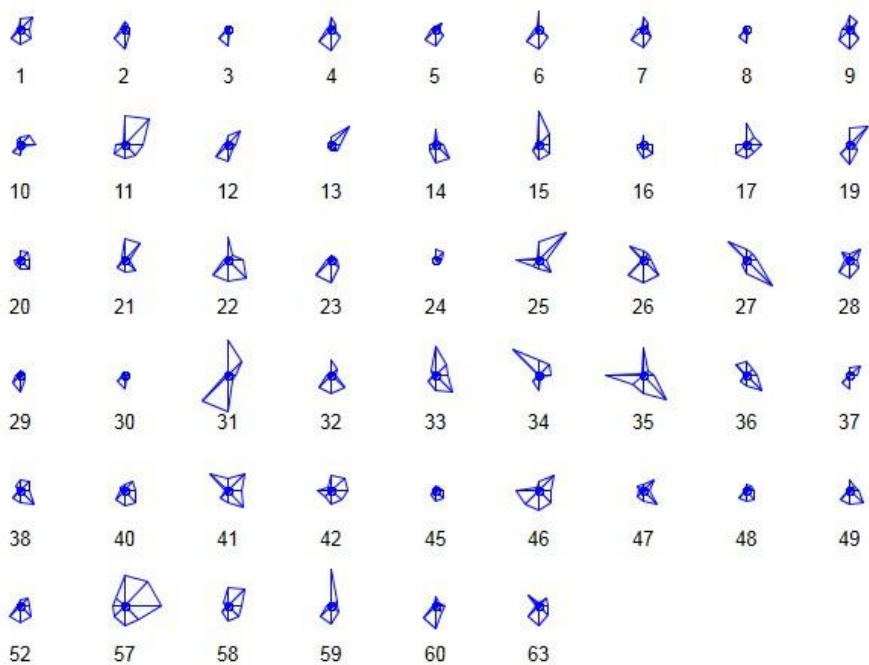
	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
Hg		1,2	-0,66	-4,5	5,81	-0,4	-0,02	-0,05	-0,01	0,08	0,01	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Na	0,07		1,4.10 ⁶	2,4.10 ⁶	-7,5.10 ⁴	-48378	-411	1,1.10 ⁴	98	-8347	-3247	-4949	-25	-32	-187	407	-23	11	-5,4	-125	-179	1849	-54	-12	-7,9	-15	-1,1	-3	0,07	-0,3	-0,9	-0,32	-1,1	-16	-64
P	-0,03	0,27		1,1.10 ⁷	-1,2.10 ⁵	9,5.10 ⁴	8,1.10 ⁴	-1332	1383	-54313	101	-2,104	-62	62	-167	1119	9,1	53	-18	-205	673	3887	-59	30	-4,7	3,7	0,7	0,42	-0,33	-1,4	-3,1	-0,64	-1,4	-23,1	151
Ca	-0,11	0,24	0,91		-3,6.10 ⁶	1,5.10 ⁵	1,4.10 ⁵	77	3433	-1,4. 10 ⁵	-1657	-4,5.10 ⁴	-20	-59	-88	2000	54	170	-104	-539	1528	5593	-337	60	-6,7	51	7	11	-0,04	-2	-5,8	-1,4	-3,9	-37,2	137
K	0,34	-0,02	-0,24	-0,36		2,2.10 ⁵	6,4.10 ⁴	-1,104	-654	2,4.10 ⁴	1226	2,1.10 ⁴	-43	168	187	-295	-1,57	-163	108	300	-617	5215	189	-48	8	34	0,77	8,6	0,39	1,7	3	0,72	2,7	10,8	165
Mg	-0,15	-0,07	0,12	0,09	0,33		1,1.10 ⁴	16	302	-3921	-89	-3302	19	-4,3	-38	5,2	-1,44	-19	-15	-25	-98	-862	8,6	-1,4	0,02	-13	-1,2	-3	-0,21	-0,55	-0,71	-0,14	-0,38	-0,34	16
Fe	-0,02	0	0,27	0,24	0,26	0,28		296	249	1072	258	7283	3,5	19	27	63	5,31	4,8	1,9	3,4	20	83	-3,9	0,07	1	16	1,4	3,5	0,17	0,4	0,36	0,07	0,2	1,52	12
Mn	-0,3	0,27	-0,03	0	-0,25	0	0,13		49	420	48	421	0,3	-0,5	-2,5	0,57	0,44	1,4	-0,67	-1,7	-2,4	-57	-1,5	0,1	0,01	0,58	0,07	0,13	0,01	0,01	0,01	0	-0,01	0,06	-2,2
Ba	-0,16	0,07	0,08	0,11	-0,05	0,14	0,31	0,38		2,4	16	323	0	-0,2	0,9	0,94	0,12	1,5	-0,26	-0,55	4,8	12	-0,2	0	0,03	0,55	0,05	0,1	0,01	0,01	0	0	0	0,04	-0,4
Zn	0,14	-0,06	-0,33	-0,43	0,17	-0,19	0,14	0,33	0,01		262	986	-1,5	4,9	3,2	-5,8	0,74	-0,4	3,8	8,1	-6,6	116	3,4	-0,3	0,22	1,7	0,2	0,43	0,03	0,08	0,09	0,02	0,06	0,24	0,69
Cu	0,27	-0,24	0,01	-0,05	0,09	-0,04	0,32	0,36	0,36	0,59		152	-0,08	0,4	0,4	0,43	0,24	0,4	0,7	1,1	0,32	32	-0,03	0,03	0,04	0,3	0,03	0,06	0	0,01	0	0	0,01	0,01	-0,15
Al	0,06	-0,02	-0,05	-0,06	0,06	-0,06	0,38	0,14	0,31	0,1	0,14		18	42	39	43	4,53	26	7,8	8,2	40	280	-0,6	-1,1	2,5	57	4,4	11	0,61	1,7	1,71	0,31	0,86	5,9	4,8
Li	0,14	-0,05	-0,1	-0,02	-0,08	0,24	0,12	0,06	0	-0,09	-0,05	0,48		0,04	0,04	0,04	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,2	0	0	0	0,05	0	0,01	0	0	0	0	0,01	0,01	
V	0,14	-0,03	0,05	-0,03	0,17	-0,03	0,34	-0,06	-0,08	0,15	0,14	0,56	0,36		0,1	0,13	0,01	0,01	0,04	0,05	0,02	1,8	0,07	0	0	0,1	0,01	0,02	0	0	0,01	0	0	0,02	0,15
Cr	0,13	-0,17	-0,12	-0,03	0,16	-0,21	0,41	-0,23	0,23	0,09	0,11	0,44	0,3	0,45		0,15	0,02	0,07	0,03	0,04	0,48	2,7	0,02	-0,01	0,01	0,11	0,01	0,02	0	0	0	0	0,01	0,1	
Ni	-0,01	0,16	0,37	0,33	-0,12	0,01	0,43	0,02	0,12	-0,07	0,05	0,22	0,13	0,23	0,22		0,01	0,13	0,02	-0,01	0,83	1,2	0,18	0,02	0	0,18	0,01	0,04	0	0	0	0	0	0,07	
Co	-0,22	-0,08	0,03	0,08	-0,01	-0,03	0,33	0,17	0,13	0,08	0,27	0,21	0,09	0,18	0,25	0,08		0	0	0	0,03	-0,4	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0,01	
Ga	-0,08	0,02	0,07	0,11	-0,25	-0,19	0,13	0,22	0,72	-0,02	0,19	0,51	0,15	0,08	0,39	0,35	0,01		0	-0,01	0,34	1,05	0,01	0	0	0,06	0	0,01	0	0	0	0	0	-0,02	
As	0,83	-0,01	-0,03	-0,1	0,24	-0,2	0,07	-0,18	0,27	0,45	0,23	0,23	0,37	0,22	0,08	-0,16	-0,03		0,06	-0,05	2,2	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	
Se	0,6	-0,14	-0,18	-0,25	0,32	-0,17	0,06	-0,19	-0,19	0,28	0,37	0,12	0,07	0,23	0,15	-0,02	0,07	-0,05	0,58		-0,11	2,2	0,04	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0,03	
Rb	-0,15	-0,04	0,13	0,15	-0,14	-0,14	0,08	-0,06	0,34	-0,05	0,02	0,12	0,02	0,02	0,41	0,32	0,11	0,5	-0,11	-0,12		5,9	0,15	-0,01	0	0,16	0,01	0,04	0	0	0	0	0	0,03	
Sr	0,76	0,07	0,12	0,09	0,19	-0,2	0,05	-0,22	0,14	0,13	0,36	0,13	0,06	0,28	0,37	0,07	-0,22	0,25	0,76	0,37	0,21		0,73	-0,19	0,06	0,57	0,03	0,12	0,01	0,02	0,01	0,04	0,97		
Mo	-0,02	-0,06	-0,06	-0,16	0,22	0,06	-0,08	-0,19	-0,08	0,13	-0,01	-0,01	0	0,36	0,08	0,34	0,02	0,07	0,03	0,22	0,17	0,13		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	
Sb	-0,16	-0,11	0,22	0,22	-0,41	-0,08	0,01	0,09	-0,01	-0,09	0,08	-0,12	-0,11	-0,12	-0,19	0,32	0,08	0,07	-0,22	-0,01	-0,08	-0,26	0,05		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cs	0,26	-0,21	-0,1	-0,07	0,21	0	0,46	0,03	0,24	0,18	0,34	0,83	0,56	0,57	0,55	0,1	0,3	0,37	0,42	0,4	0,03	0,26	-0,03	-0,18		0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ce	0,07	-0,02	0	0,03	0,04	-0,1	0,34	0,07	0,21	0,06	0,11	0,91	0,48	0,57	0,48	0,38	0,23	0,48	0,26	0,09	0,18	0,11	0,02	-0,08	0,8		0,01	0,03	0	0	0	0,01	0,01		
Pr	0,03	-0,02	0,01	0,05	0,01	-0,12	0,38	0,12	0,24	0,09	0,15	0,92	0,48	0,56	0,5	0,39	0,26	0,51	0,22	0,13	0,18	0,08	-0,01	-0,04	0,8	1		0	0	0	0	0	0	0	
Nd	0,06	-0,02	0	0,03	0,05	-0,11	0,34	0,08	0,19	0,08	0,11	0,9	0,48	0,59	0,5	0,38	0,22	0,47	0,26	0,08	0,2	0,1	0,02	-0,1	0,8	1	1		0	0	0	0	0	0	
Eu	0	0,01	-0,03	0	0,04	-0,14	0,3	0,12	0,23	0,1	0,12	0,81	0,4	0,67	0,47	0,3	0,19	0,46	0,2	0,07	0,19	0,1	0,05	-0,06	0,7	0,9	0,9	0,9		0	0	0	0	0	
Gd	0,02	-0,01	-0,04	-0,03	0,06	-0,13	0,26	0,05	0,11	0,09	0,06	0,82	0,42	0,71	0,44	0,27	0,12	0,38	0,23	0,13	0,11	0,09	0,09	-0,11	0,7	0,9	0,9	0,9	0,97		0	0	0	0	
Dy	-0,04	-0,03	-0,07	-0,07	0,09	-0,13	0,18	0,02	0,02	0,08	0	0,65	0,33	0,76	0,39	0,15	0,1	0,24	0,15	0,11	0,08	0,06	0,16	-0,09	0,5	0,7	0,7	0,7	0,89	0,93		0	0	0	
Ho	-0,07	-0,04	-0,07	-0,08	0,09	-0,12	0,15	-0,01	-0,02	0,08	-0,02	0,53	0,26	0,76	0,34	0,12	0,14	0,17	0,09	0,11	0,07	0,04	0,25	-0,06	0,5	0,6	0,6	0,6	0,82	0,86	0,98		0	0	
Er	-0,07	-0,05	-0,05	-0,07	0,11	-0,1	0,15	-0,05	-0,05	0,08	-0,03	0,46	0,23	0,79	0,36	0,11	0,14	0,12	0,08	0,11	0,07	0,06	0,31	-0,07	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,74	0,8	0,95	0,99		0
Th	-0,03	-0,17	-0,19	-0,16	0,11	-0,02	0,27	0,07	0,11	0,08	0,03	0,78	0,56	0,73	0,49	0,06	0,21	0,27	0,13	0,06	0,02	0,06	0,11	-0,19	0,7	0,8	0,8	0,8	0,82	0,85	0,83	0,78	0,74		0
U	-0,06	-0,07	0,13	0,06	0,17	0,1	0,2	-0,24	-0,13	0,02	-0,05																								

Tabulka 18 Korelace a kovariance uvnitř tříd

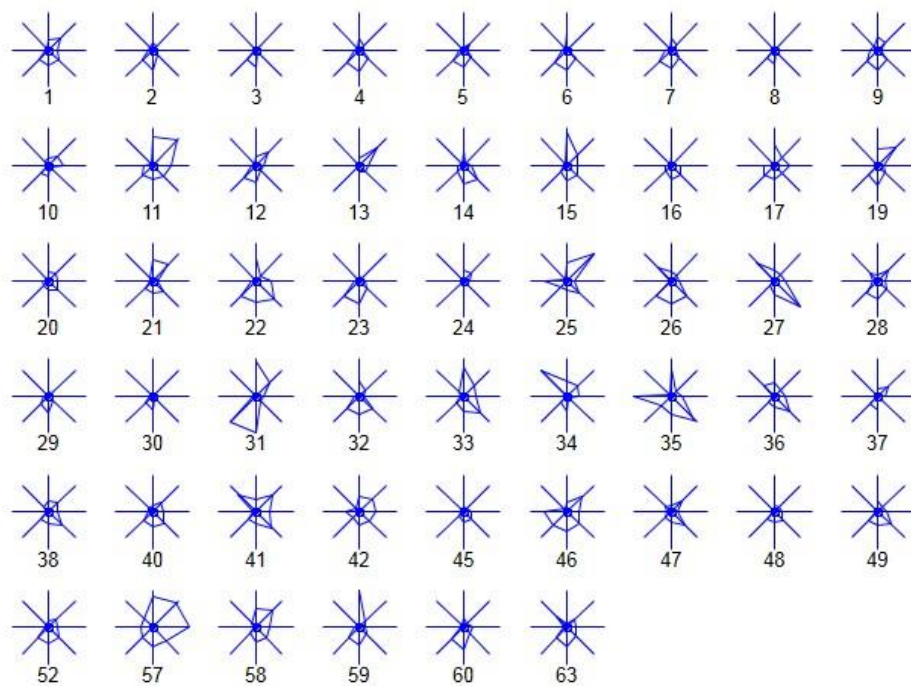
	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U			
Hg																																						
Na	0,06		1,4106	2,6.10 ⁶	-2,1.10 ⁵	-5,9.10 ⁴	-8146	1,1.10 ⁴	849	-8013	-3229	-1,8.10 ⁴	-30	-51	-190	405	-23	4	-8	-136	-144	1960	-45	-11	-9,3	-38	-2,7	-8	-0,12	-0,9	-1,3	-0,4	-1,2	-19	-55			
P	-0,04	0,26		1,1.10 ⁷	-1,4.10 ⁶	8,8.10 ⁴	7,610 ⁴	-1478	1340	-5,5.10 ⁴	182	-3,2.10 ⁴	-68	46	-170	1132	9	48	-21	-217	722	4034	-51	32	-5,9	-17	-0,8	-4	-0,51	-1,9	-3,5	-0,7	-1,4	-26	164			
Ca	-0,09	0,26	0,93		-3,2.10 ⁶	1,9.10 ⁵	1,7.10 ⁵	551	3787	-1,4.10 ⁵	-2004	1088	-4	7	-91	2083	58	199	-96	-517	1419	5440	-381	56	-2,3	136	13,2	28	0,65	-0,1	-4,5	-1,3	-3,8	-30	101			
K	0,31	-0,05	-0,28	-0,33		1,8.10 ⁵	32610	-1,1.10 ⁴	-996	2,6.10 ⁴	1613	-3,3.10 ⁴	-63	93	192	-349	-4	-196	98	269	-468	5631	236	-43	2,8	-63	-6,2	-11	-0,4	-0,5	1,4	0,5	2,5	2	213			
Mg	-0,18	-0,09	0,11	0,12	0,29		8777	-23	285	-3848	-65	-7206	18	-10	-38	2	-2	-22	-15	-28	-89	-858	12	-1	-0,4	-20	-1,7	-4	-0,27	-0,7	-0,8	-0,2	-0,4	-1	19			
Fe	-0,08	-0,04	0,27	0,32	0,15	0,24		271	236	1216	284	4385	3	15	28	62	5	3	1	1	29	103	-2	0	0,7	11	1	2	0,13	0,3	0,3	0,1	0,2	1	14			
Mn	-0,29	0,27	-0,03	0,01	-0,28	0	0,12		50	431	50	379	0	-1	-3	1	0	1	-1	-2	-2	-58	-2	0	0	0	0,1	0	0,01	0	0	0	0	0	-2			
Ba	-0,18	0,06	0,08	0,12	-0,08	0,13	0,31	0,37		4	17	299	0	0	1	1	0	2	0	-1	5	13	0	0	0	1	0	0	0,01	0	0	0	0	0	0			
Zn	0,15	-0,06	-0,33	-0,44	0,2	-0,18	0,16	0,33	0,01		267	1205	-1	5	3	-6	1	0	4	8	-7	117	3	0	0,2	2	0,2	1	0,03	0,1	0,1	0	0,1	0	1			
Cu	0,28	-0,23	0,01	-0,06	0,12	-0,03	0,37	0,37	0,36	0,59		190	0	0	0	0	0	0	1	1	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Al	-0,01	-0,06	-0,09	0	-0,12	-0,16	0,27	0,13	0,31	0,13	0,19		17	35	40	39	4	23	7	5	56	315	3	-1	2	49	3,8	10	0,55	1,5	1,6	0,3	0,9	5	9			
Li	0,13	-0,06	-0,11	0	-0,13	0,23	0,09	0,05	-0,01	-0,09	-0,04	0,49		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
V	0,11	-0,05	0,04	0	0,1	-0,07	0,29	-0,07	-0,09	0,17	0,15	0,53	0,34		0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Cr	0,13	-0,17	-0,12	-0,03	0,18	-0,21	0,44	-0,23	0,23	0,09	0,11	0,49	0,31	0,46		0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ni	-0,01	0,16	0,36	0,34	-0,14	0	0,44	0,02	0,11	-0,07	0,06	0,22	0,13	0,23	0,22		0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Co	-0,23	-0,08	0,03	0,09	-0,02	-0,04	0,34	0,16	0,13	0,09	0,27	0,22	0,08	0,18	0,25	0,08		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ga	-0,1	0,01	0,06	0,13	-0,31	-0,21	0,09	0,22	0,72	-0,01	0,2	0,51	0,14	0,05	0,39	0,34	0		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
As	0,83	-0,02	-0,04	-0,09	0,23	-0,22	0,05	-0,16	-0,18	0,27	0,46	0,22	0,22	0,36	0,22	0,07	-0,16	-0,04		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Se	0,59	-0,15	-0,19	-0,24	0,31	-0,2	0,03	-0,2	-0,2	0,28	0,38	0,07	0,06	0,21	0,16	-0,02	0,07	-0,06	0,57		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Rb	-0,14	-0,03	0,13	0,13	-0,11	-0,13	0,12	-0,05	0,35	-0,05	0,02	0,18	0,03	0,04	0,41	0,32	0,11	0,52	-0,11	-0,11		6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Sr	0,78	0,07	0,12	0,08	0,21	-0,2	0,07	-0,22	0,14	0,13	0,36	0,16	0,07	0,3	0,37	0,07	-0,22	0,25	0,77	0,38	0,21		1	0	0,1	1	0	0	0,01	0	0	0	0	0	1			
Mo	0	-0,05	-0,05	-0,19	0,29	0,09	-0,03	-0,18	-0,07	0,12	-0,02	0,06	0,02	0,41	0,08	0,35	0,02	0,09	0,05	0,23	0,16	0,13		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Sb	-0,14	-0,1	0,23	0,2	-0,39	-0,05	0,07	0,1	0	-0,1	0,08	-0,07	-0,1	-0,09	-0,2	0,33	0,09	0,09	-0,21	0	-0,1	-0,26	0,03		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Cs	0,22	-0,26	-0,13	-0,03	0,08	-0,06	0,37	0,02	0,23	0,21	0,4	0,91	0,57	0,54	0,59	0,09	0,31	0,35	0,42	0,39	0,07	0,29	0,02	-0,14		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ce	0,02	-0,05	-0,02	0,07	-0,08	-0,17	0,25	0,07	0,2	0,08	0,15	0,91	0,48	0,54	0,51	0,38	0,23	0,47	0,25	0,06	0,23	0,12	0,07	-0,04	0,79		0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Pr	-0,01	-0,05	-0,01	0,09	-0,11	-0,19	0,3	0,12	0,23	0,11	0,18	0,91	0,48	0,53	0,53	0,39	0,26	0,5	0,2	0,1	0,22	0,09	0,04	0,01	0,81	0,98		0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Nd	0,01	-0,05	-0,02	0,07	-0,07	-0,17	0,27	0,07	0,18	0,1	0,14	0,9	0,48	0,56	0,53	0,38	0,22	0,46	0,25	0,05	0,24	0,12	0,07	-0,06	0,78	0,99	0,98		0	0	0	0	0	0	0	0		
Eu	-0,03	-0,01	-0,04	0,03	-0,04	-0,18	0,24	0,12	0,22	0,11	0,14	0,81	0,39	0,65	0,49	0,3	0,19	0,45	0,19	0,05	0,21	0,11	0,08	-0,03	0,71	0,9	0,9	0,92		0	0	0	0	0	0	0		
Gd	-0,01	-0,03	-0,06	0	-0,02	-0,18	0,19	0,04	0,09	0,1	0,08	0,82	0,41	0,7	0,46	0,27	0,12	0,37	0,21	0,11	0,14	0,1	0,13	-0,08	0,7	0,89	0,89	0,91	0,97		0	0	0	0	0	0		
Dy	-0,06	-0,04	-0,08	-0,05	0,04	-0,16	0,15	0,02	0,01	0,09	0,01	0,06	0,32	0,75	0,39	0,14	0,1	0,23	0,14	0,09	0,09	0,07	0,18	-0,07	0,54	0,69	0,71	0,73	0,89	0,94		0	0	0	0			
Ho	-0,08	-0,05	-0,07	-0,07	0,07	-0,13	0,13	-0,01	-0,02	0,09	-0,01	0,55	0,26	0,77	0,34	0,11	0,14	0,16	0,09	0,1	0,07	0,04	0,26	-0,05	0,46	0,58	0,6	0,62	0,82	0,87	0,98		0	0	0	0		
Er	-0,08	-0,05	-0,05	-0,06	0,11	-0,11	0,15	-0,05	-0,05	0,08	-0,03	0,5	0,23	0,81	0,36	0,1	0,13	0,11	0,08	0,11	0,07	0,07	0,32	-0,07	0,41	0,51	0,53	0,56	0,76	0,82	0,95	0,99		0	0	0		
Th	-0,07	-0,2	-0,22	-0,13	0,02	-0,07	0,2	0,06	0,1	0,09	0,05	0,77	0,56	0,71	0,51	0,05	0,21	0,25	0,12	0,03	0,05	0,07	0,15	-0,16	0,72	0,73	0,75	0,76	0,82	0,84	0,83	0,79	0,76		0	0		
U	-0,04	-0,06	0,14	0,04	0,23	0,13	0,27	-0,24	-0,12	0,02	-0,06	0,13	0,09	0,74	0,37	0,13	0,14	-0,11	0,05	0,14	0,02	0,15	0,56	-0,07	0,16	0,09	0,1	0,12	0,21	0,3	0,47	0,56	0,67	0,39		0		

Z ikonových grafů zobrazených na Obrázku 5 je možné rozlišit skupiny objektů.

5A



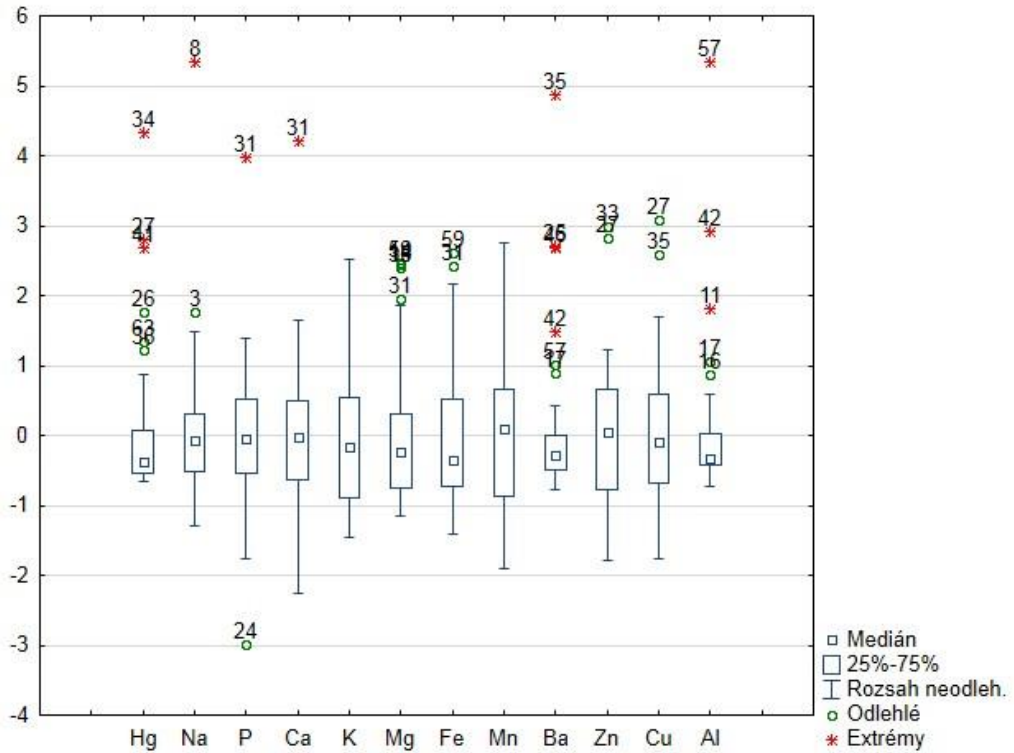
5B



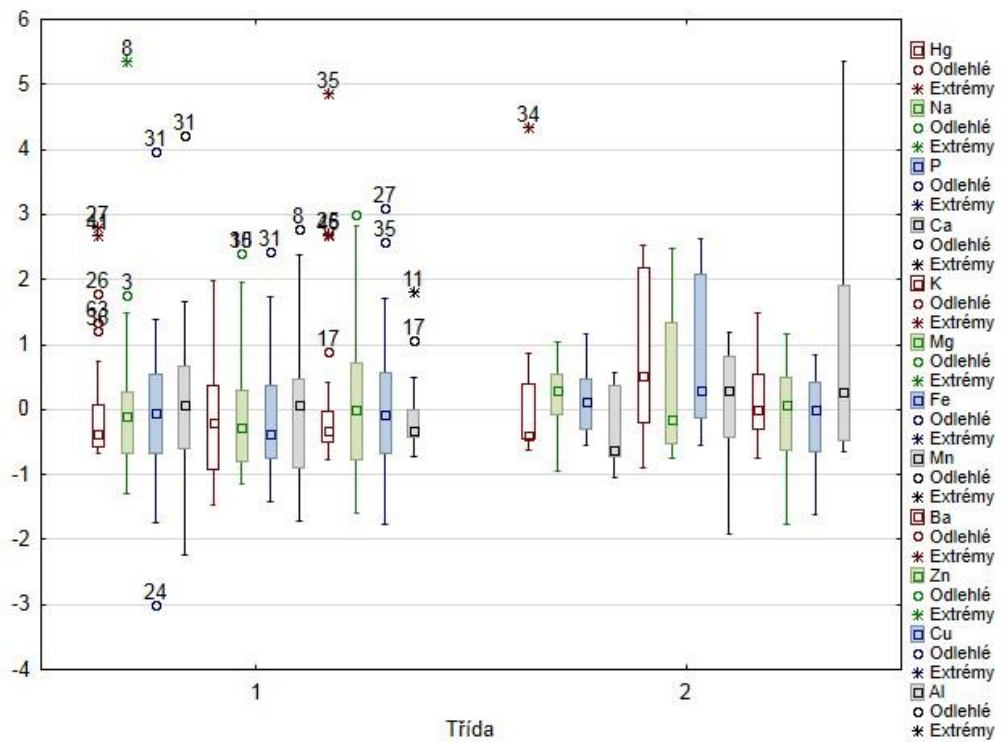
Obrázek 5 Symbolové grafy A Hvězdy, B Sluníčka

Krabicový diagram na obrázcích 6A, 7A a 8A zobrazuje hodnoty minima, maxima, mediánu, prvního a třetího kvartilu, extrémů a odlehlých hodnot pro jednotlivé prvky po rozdělení do jednotlivých tříd pomocí diskriminační analýzy (obrázek 6B, 7B, 8B), o které bude dále diskutováno v kapitole 4.4.2. Z obrázků krabicových grafů je patrné, že prvky Al, Li, V, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Ho, Er, Dy, Th a U ve vzorku č. 57 se vyznačují vysokými hodnotami koncentrací. Taktéž u vzorku 11 byly naměřené extrémní hodnoty koncentrací u analytů Li, Al, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Ho, Er, Dy, Th a U. U čtyřech vzorků granulí (č. 4, 5, 22 a 32) byly nalezeny vyšší hodnoty koncentrace Sb, jednalo se o granule s kuřecím masem a zeleninou nebo s bramborami. U vzorků rybích granulí (č. 27 a 34) byly naměřeny vyšší koncentrace Hg. U. Hodnoty matričních prvků byly nejvyšší u vzorku č. 8, který vybočoval koncentrací Na, vzorek č. 3 koncentrací Ca a P či vzorek č. 26 koncentrací Ba.

6A

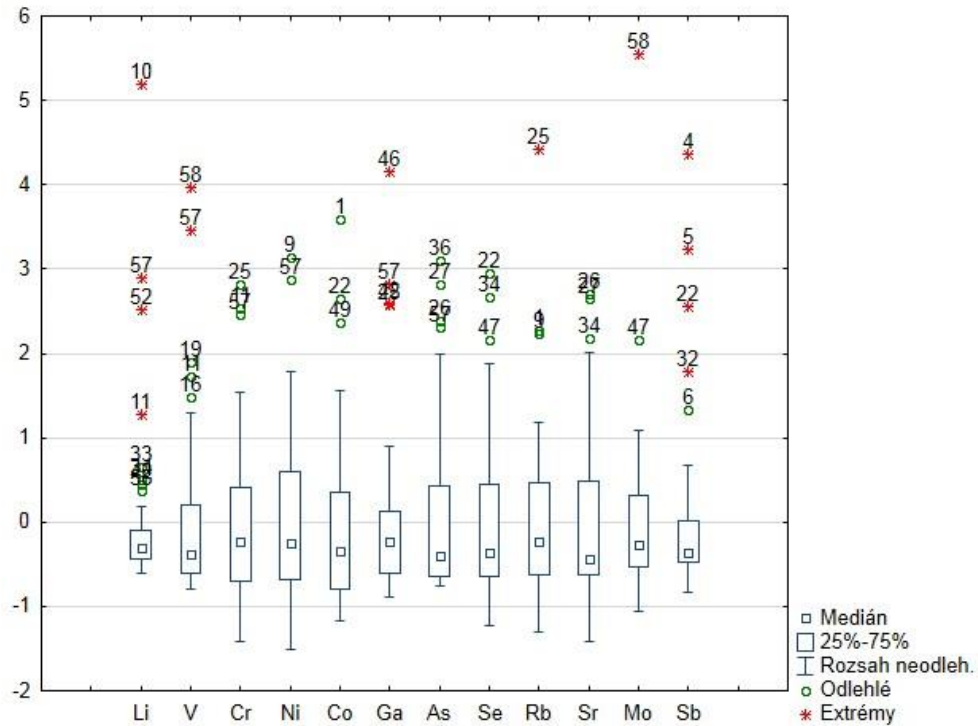


6B

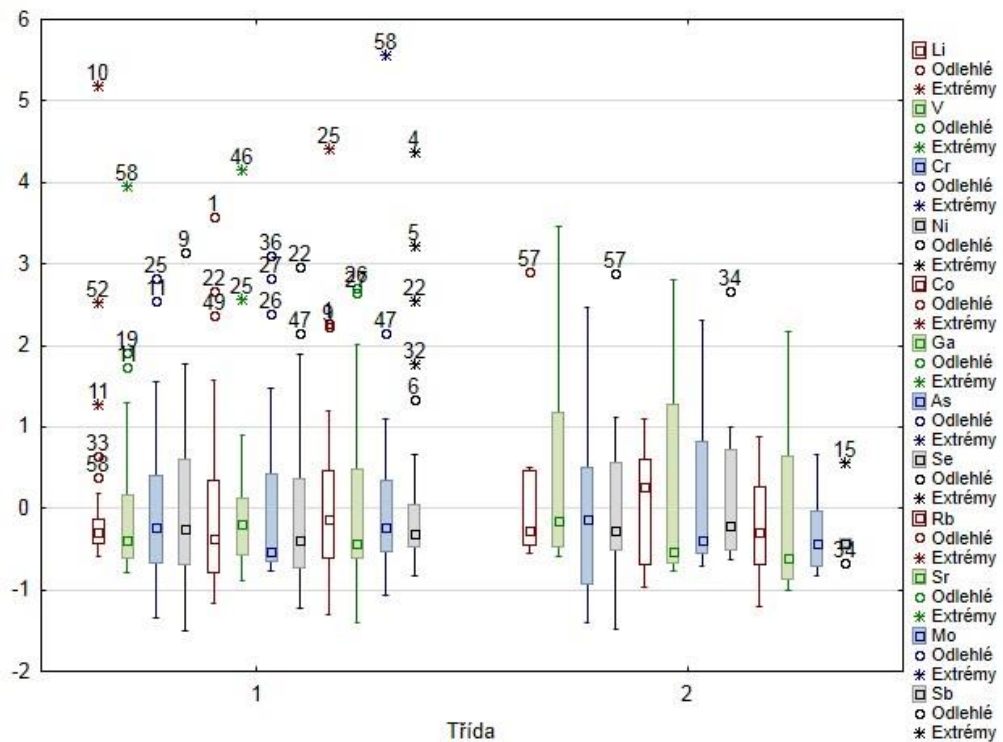


Obrázek 6 Krabicový diagram koncentrací prvků Hg, Na, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Ba, Zn, Cu a Al pro naměřená data (6A) a po rozdělení do jednotlivých tříd (6B)

7A

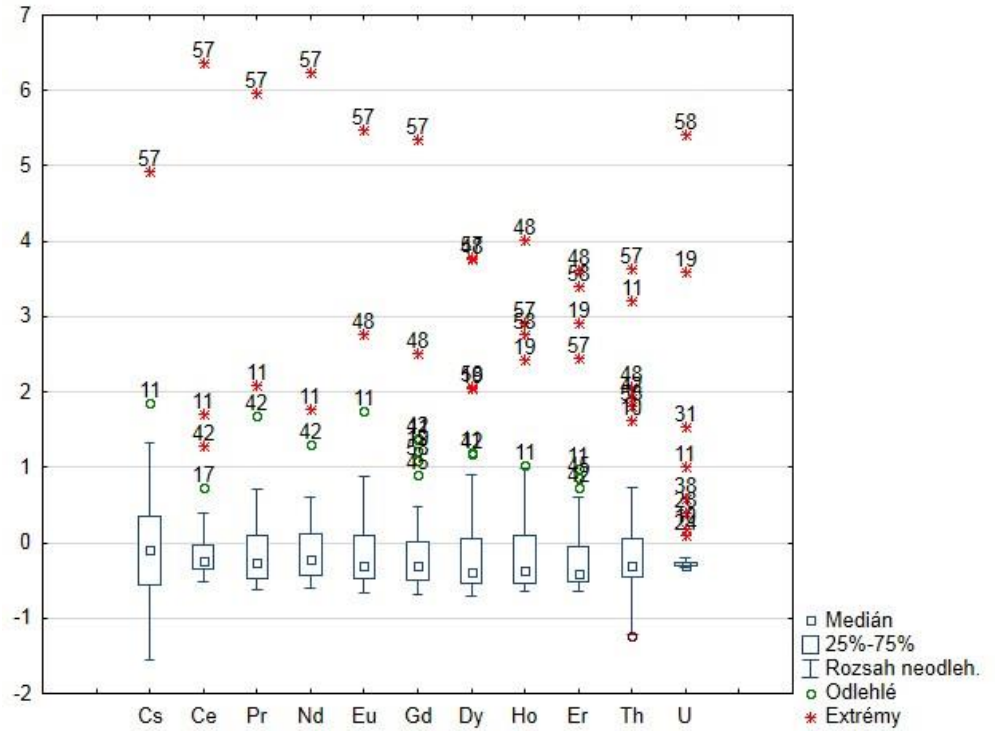


7B

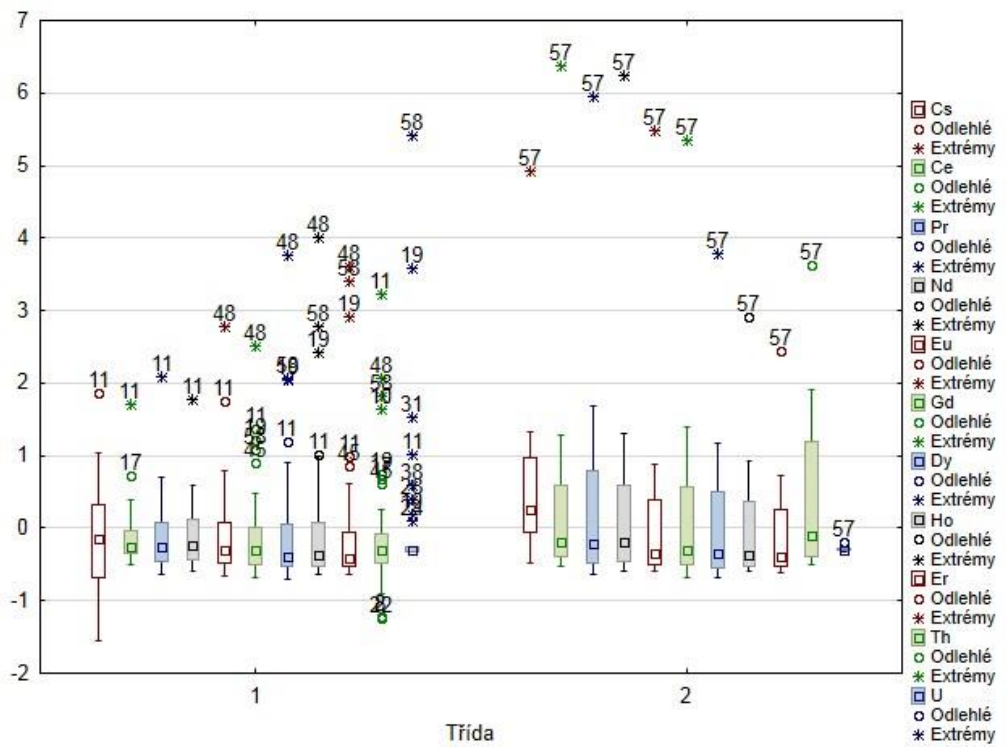


Obrázek 7 Krabicový diagram koncentrací prvků Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, a Sb pro naměřená data (7A) a po rozdělení do jednotlivých tříd (7B)

8A



8B



Obrázek 8 Krabicový diagram koncentrací prvků Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U pro naměřená data (8A) a po rozdělení do jednotlivých tříd (8B)

4.4.2 Diskriminační analýza

Aplikace diskriminační analýzy je široká a je hojně využívána v praxi, např. ke geografickému ověření různých zemědělských produktů, posouzení falšování potravin na základě chemického složení atd. [73, 74]. Diskriminační analýza se zabývá klasifikací rozdílů mezi dvěma nebo více skupinami objektů, které jsou charakterizovány více znaky – diskriminátory. Řadí se mezi klasifikační metody vícerozměrné statistické analýzy. Klasifikační metody se zabývají hledáním vzájemných vazeb a struktur v objektech. Diskriminační analýza se může dále dělit na analýzu, kde cílem je klasifikace objektů do skupin nebo analýzu vysvětlující rozdíly mezi předem určenými skupinami objektů. Porovnávají se diskriminátory každého objektu se znaky ostatních objektů, kde pak dochází ke klasifikaci vzorků na základě podobnosti či rozdílu. Zkoumá vztah mezi skupinou p nezávislých znaků (diskriminátory), a kvalitativní závisle proměnnou (výstupem). Výstupem může být binární proměnná y , která nabývá hodnot 0, pokud je objekt v první třídě a tudíž hodnotu 1 pro případ, že objekt se nachází v druhé třídě. Třídy jsou značně rozdílné [75].

Pomocí diskriminační analýzy byla provedena kroková analýza dopředná. Jak již bylo zmíněno z důvodu nesplnění podmínky vícerozměrné normality bylo nutno provést transformaci dat pomocí Box-Coxovi transformace. Díky tomu byly objeveny znaky s dostatečnou diskriminační silou. Znaky, které nebyly pro klasifikační analýzu významné, byly vyřazeny, a to pomocí několika kritérií: kritéria F , Wilkova kritéria λ a pomocí míry redundance (nadbytečnosti znaku) neboli tolerance $1-R^2$. Nejlepším znakům pro klasifikaci odpovídají nejvyšší hodnoty tolerance a nejnižší hodnoty Wilkova kritéria λ (které nabývají hodnot od 0 do 1, značící nevýznamnou diskriminační sílu) a kritéria F . Pro klasifikaci byly tedy určeny jako nejlepší znaky: Fe, Cr, Cs, Cu, Hg, Ba, Ca a P (viz Tabulka 19). Také pro kanonickou korelační analýzu byly použity tyto znaky. V Tabulce 20 jsou uvedeny výsledky diskriminační funkční analýzy s postupným vypouštěním znaků.

Tabulka 19 Výsledky diskriminační funkční analýzy po první analýze

	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vyj ((3,2))	p-hodn.	Toler.	1-toler. (R²)
Fe	0,388568	0,898923	4,38524	0,042800	0,447564	0,552436
K	0,349446	0,999561	0,01712	0,896577	0,704285	0,295715
Cr	0,413399	0,844927	7,15781	0,010853	0,426423	0,573577
Cs	0,430363	0,811622	9,05192	0,004580	0,400880	0,599120
Cu	0,557403	0,626642	23,23650	0,000022	0,337794	0,662206
Hg	0,416744	0,838145	7,53130	0,009118	0,530464	0,469536
Ba	0,432148	0,808271	9,25118	0,004195	0,524003	0,475997
Ca	0,527261	0,662466	19,87098	0,000068	0,072441	0,927559
P	0,493491	0,707799	16,10041	0,000264	0,088542	0,911458
Mo	0,374083	0,933730	2,76794	0,104186	0,624814	0,375186
Co	0,362630	0,963220	1,48921	0,229667	0,643811	0,356189

Tabulka 20 Výsledky diskriminační funkční analýzy po druhém opakování dokumentující diskriminátory zvolené pro tvorbu modelu

	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vyj ((3,11))	p-hodn.	Toler.	1-toler. (R²)
Fe	0,462612	0,829133	8,65531	0,005288	0,489334	0,510666
Cr	0,480283	0,798627	10,59025	0,002249	0,449240	0,550760
Cs	0,527587	0,727021	15,77000	0,000275	0,429725	0,570275
Cu	0,585463	0,655151	22,10732	0,000028	0,392372	0,607628
Hg	0,427365	0,897515	4,79589	0,034133	0,691051	0,308949
Ca	0,564823	0,679092	19,84734	0,000061	0,105124	0,894876
P	0,510939	0,750709	13,94713	0,000560	0,111607	0,888393
Ba	0,445659	0,860673	6,79900	0,012574	0,617621	0,382379

V Tabulce 21 jsou uvedeny odhady parametrů klasifikační funkce pro zařazování objektů do obou tříd. Pro každou třídu byly vyčísleny dvě diskriminační funkce. Rozdělení vzorků do jednotlivých tříd se nachází v Tabulce 22. Žádný ze vzorků nebyl chybně zařazen, tudíž klasifikace proběhla na 100 %. Veličina p (apriorní pravděpodobnost) značí předpoklad, že objekt bude zařazen do dané třídy.

Tabulka 21 Odhady parametrů klasifikační funkce pro jednotlivé třídy

	Třída 1 (p=0,84314)	Třída 2 (p=0,15686)
Fe	126,985	138,345
Cr	-1,979	-7,439
Cs	-88,455	-76,788
Cu	2,764	0,493
Hg	-0,067	0,207
Ca	0,447	0,287
P	-0,047	-0,035
Ba	-10,735	-5,642
Abs. člen	-386,325	-382,437

Tabulka 22 Klasifikační matice: řádky představují pozorované klasifikace a sloupce předpovězené klasifikace

	% (správných)	Třída 1 (p= 0,84314)	Třída 2 (p=0,15686)
Třída 1	100	43	0
Třída 2	100	0	8
Celkem	100	43	8

Vyčíslením diskriminační funkce došlo ke snížení počtu o jednotku, než je počet tříd. Statistickou významnost kořenů při jejich postupném odstraňování prověřuje test Chí-kvadrát (Tabulka 23). Hodnoty v Tabulce 24 určují statistickou významnost pouze u prvního kořenu. Korelace mezi znaky a diskriminační funkcí jsou uvedeny v Tabulce 25. V Tabulce 26 se nachází pro jednotlivé třídy průměry kanonických proměnných.

Tabulka 23 Test chí-kvadrát po odstranění postupných kořenů

Kořeny odstraněny	Vlastní (číslo)	Kan. (R)	Wilk. (Lambda)	Chi-kv.	SV	p-hodn.
0	1,607109	0,785133	0,383567	43,12089	8	0,000001

* parametr statisticky významný

Tabulka 24 Standardizované koeficienty pro kanonické proměnné

	Fe	Cr	Cs	Cu	Hg	Ca	P	Ba	Vlastní	Kum. podíl
Kořen1	0,75263	-0,85274	1,01514	-1,19405	0,49049	-2,22534	1,90355	0,60494	1,60711	1,000

Tabulka 25 Faktorová strukturní matice

	Fe	Cr	Cs	Cu	Hg	Ca	P	Ba
Kořen1	0,279613	-0,038188	0,277060	-0,046154	0,076844	-0,093226	0,057468	0,109236

Tabulka 26 Průměry kanonických proměnných

	Třída 1	Třída 2
Kořen1	-0,535977	2,880878

V Tabulce 27 jsou uvedeny výsledky klasifikace objektů. První sloupec uvádí skutečnou třídu, druhý sloupec první možnost klasifikace a další sloupec pak další možnosti klasifikace. Z Tabulky 27 je zřejmé, že všechny objekty testovacího souboru byly zařazeny správně do jednotlivých tříd.

Tabulka 27 Klasifikace případů

Případ	Klasifikace případů		
	Pozorovaná (Klasif.)	1 (p=.84314)	2 (p=.15686)
1	Třída 1	Třída 1	Třída 2
2	Třída 1	Třída 1	Třída 2
3	Třída 1	Třída 1	Třída 2
4	Třída 1	Třída 1	Třída 2
5	Třída 1	Třída 1	Třída 2
6	Třída 1	Třída 1	Třída 2
7	Třída 1	Třída 1	Třída 2
8	Třída 1	Třída 1	Třída 2
9	Třída 1	Třída 1	Třída 2
10	Třída 1	Třída 1	Třída 2
11	Třída 1	Třída 1	Třída 2
12	Třída 1	Třída 1	Třída 2
13	Třída 1	Třída 1	Třída 2
14	Třída 2	Třída 2	Třída 1
15	Třída 2	Třída 2	Třída 1
16	Třída 2	Třída 2	Třída 1
17	Třída 1	Třída 1	Třída 2
19	Třída 1	Třída 1	Třída 2
20	Třída 1	Třída 1	Třída 2
21	Třída 1	Třída 1	Třída 2
22	Třída 1	Třída 1	Třída 2
23	Třída 1	Třída 1	Třída 2
24	Třída 1	Třída 1	Třída 2
25	Třída 1	Třída 1	Třída 2
26	Třída 1	Třída 1	Třída 2
27	Třída 1	Třída 1	Třída 2
28	Třída 1	Třída 1	Třída 2
29	Třída 1	Třída 1	Třída 2
30	Třída 1	Třída 1	Třída 2
31	Třída 1	Třída 1	Třída 2
32	Třída 1	Třída 1	Třída 2
33	Třída 1	Třída 1	Třída 2
34	Třída 2	Třída 2	Třída 1
35	Třída 1	Třída 1	Třída 2
36	Třída 1	Třída 1	Třída 2
37	Třída 1	Třída 1	Třída 2
38	Třída 1	Třída 1	Třída 2
40	Třída 1	Třída 1	Třída 2

Tabulka 27 Pokračování

Případ	Klasifikace případů		
	Pozorovaná (Klasif.)	1 (p=.84314)	2 (p=.15686)
41	Třída 1	Třída 1	Třída 2
42	Třída 2	Třída 2	Třída 1
45	Třída 1	Třída 1	Třída 2
46	Třída 1	Třída 1	Třída 2
47	Třída 1	Třída 1	Třída 2
48	Třída 1	Třída 1	Třída 2
49	Třída 1	Třída 1	Třída 2
52	Třída 1	Třída 1	Třída 2
57	Třída 2	Třída 2	Třída 1
58	Třída 1	Třída 1	Třída 2
59	Třída 2	Třída 2	Třída 1
60	Třída 2	Třída 2	Třída 1
63	Třída 1	Třída 1	Třída 2

Nesprávná klasifikace je označena *

Zařazení objektů do tříd určují hodnoty aposteriorních pravděpodobností, které jsou uvedeny v Tabulce 28. Nejvyšší hodnota této pravděpodobnosti určuje příslušnost objektů do dané třídy. Všechny objekty testovacího souboru byly přiřazeny správně do jednotlivých tříd (Tabulka 28). Pomocí hodnot Mahalanobisových vzdáleností (míra vzdálenosti ve vícerozměrném prostoru) je také možné klasifikovat objekty do příslušných tříd, tyto hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 29.

Tabulka 28 Aposteriorní pravděpodobnosti

Číslo vzorku	Pozorovaná (Klasif.)	Třída 1 (p= 0,84314)	Třída 2 (p= 0,15686)
1	Třída 1	0,999976	0,000024
2	Třída 1	0,994286	0,005714
3	Třída 1	0,999813	0,000187
4	Třída 1	0,998603	0,001397
5	Třída 1	0,999998	0,000002
6	Třída 1	0,982544	0,017456
7	Třída 1	0,999768	0,000232
8	Třída 1	0,999957	0,000043
9	Třída 1	0,998041	0,001959
10	Třída 1	0,976777	0,023223
11	Třída 1	0,996415	0,003585
12	Třída 1	0,999764	0,000236
13	Třída 1	0,999963	0,000037
14	Třída 2	0,002156	0,997844
15	Třída 2	0,058317	0,941683
16	Třída 2	0,007012	0,992988
17	Třída 1	0,590328	0,409672
19	Třída 1	0,999913	0,000087
20	Třída 1	0,999587	0,000413
21	Třída 1	0,999973	0,000027
22	Třída 1	0,999615	0,000385
23	Třída 1	0,999980	0,000020
24	Třída 1	0,999712	0,000288
25	Třída 1	0,999960	0,000040
26	Třída 1	0,999996	0,000004
27	Třída 1	0,996962	0,003038
28	Třída 1	0,999861	0,000139
29	Třída 1	0,996219	0,003781
30	Třída 1	0,983566	0,016434
31	Třída 1	0,988335	0,011665
32	Třída 1	0,999998	0,000002
33	Třída 1	0,664764	0,335236

Nesprávná klasifikace je označena *

Tabulka 28 Pokračování

Číslo vzorku	Pozorovaná (Klasif.)	Třída 1 (p= 0,84314)	Třída 2 (p= 0,15686)
34	Třída 2	0,000491	0,999509
35	Třída 1	0,723240	0,276760
36	Třída 1	0,996810	0,003190
37	Třída 1	0,972051	0,027949
38	Třída 1	0,999978	0,000022
40	Třída 1	0,999435	0,000565
41	Třída 1	0,999968	0,000032
42	Třída 2	0,036913	0,963087
45	Třída 1	0,965255	0,034745
46	Třída 1	0,999653	0,000347
47	Třída 1	0,999990	0,000010
48	Třída 1	0,999991	0,000009
49	Třída 1	0,999993	0,000007
52	Třída 1	0,999985	0,000015
57	Třída 2	0,001835	0,998165
58	Třída 1	0,540119	0,459881
59	Třída 2	0,336337	0,663663
60	Třída 2	0,180353	0,819647
63	Třída 1	0,997841	0,002159

Nesprávná klasifikace je označena *

Tabulka 29 Mahalanobisovy vzdálenosti

Případ Mahalanobisovy vzdálenosti			
	Pozorovaná (Klasif.)	Třída 1 (p=.84314)	Třída 2 (p=.15686)
1	Třída 1	1,53485	19,41618
2	Třída 1	6,06053	13,01516
3	Třída 1	7,41441	21,21956
4	Třída 1	3,04117	12,82219
5	Třída 1	4,35293	26,79612
6	Třída 1	11,99540	16,69278
7	Třída 1	1,98490	15,36040
8	Třída 1	9,93254	26,66036
9	Třída 1	6,14746	15,25037
10	Třída 1	13,73295	17,84763
11	Třída 1	6,92195	14,81342
12	Třída 1	3,41832	16,76034
14	Třída 2	22,01695	6,37905
15	Třída 2	11,75401	2,82695
16	Třída 2	21,35146	8,08170
17	Třída 1	10,50505	7,87218
19	Třída 1	13,70493	29,04149
20	Třída 1	4,41164	16,63094
21	Třída 1	5,78842	23,45365
22	Třída 1	9,93032	22,29075
23	Třída 1	7,30714	25,61788
24	Třída 1	15,44858	28,38806
25	Třída 1	13,76011	30,67276
26	Třída 1	12,47296	34,22874
27	Třída 1	17,54160	25,76502
28	Třída 1	4,02169	18,42239
29	Třída 1	5,49696	13,28132
30	Třída 1	6,78293	11,60307
31	Třída 1	23,14067	28,65596
32	Třída 1	5,64550	28,89178
33	Třída 1	7,44512	5,45079
34	Třída 2	31,01639	12,41428
35	Třída 1	12,87169	11,42935
36	Třída 1	7,48163	15,60740

Tabulka 29 Pokračování

Případ	Mahalanobisovy vzdálenosti		
	Pozorovaná (Klasif.)	Třída 1 (p=.84314)	Třída 2 (p=.15686)
37	Třída 1	7,03068	10,76519
38	Třída 1	3,22103	21,33375
40	Třída 1	2,69570	14,28900
41	Třída 1	6,06708	23,42902
42	Třída 2	14,26269	4,37599
45	Třída 1	4,26785	7,55307
46	Třída 1	7,08361	19,65129
47	Třída 1	4,49243	24,15163
48	Třída 1	5,59882	25,46528
49	Třída 1	5,40053	25,74539
52	Třída 1	2,35440	21,25632
57	Třída 2	24,73287	8,77146
58	Třída 1	7,85407	4,81220
59	Třída 2	14,04087	9,31803
60	Třída 2	9,68612	3,29468
63	Třída 1	5,50927	14,41742

Nesprávná klasifikace je označena *

Z celkového počtu 35 znaků, které odpovídaly koncentracím stopových, nutričních prvků a kontaminantů byly nalezeny proměnné, které umožnily klasifikovat vzorky granulí pro domácí zvířata pomocí diskriminační analýzy do 2 kategorií, a to z hlediska rozdělení na kočky a psy. Byla nalezena funkce, pomocí které je možné klasifikovat objekty do dané kategorie. Objekty byly zařazeny do tříd se 100% úspěšností.

4.4.3 Faktorová analýza

Faktorová analýza slouží k prozkoumání vnitřních souvislostí, korelací a odhalení základní struktury zdrojové matice dat. Ve faktorové analýze dochází k redukci počtu původních proměnných. Odkrývá vnitřní strukturu vazby mezi znaky nebo mezi objekty. Dochází tak k rozdělení znaků na základě podobnosti do shluků. Dochází k identifikaci faktorů a poté je ke všem faktorům přidělen obsahový, často fyzikální význam, díky němu je faktorem vysvětlený každý původní znak. Výsledkem faktorové analýzy může být graf faktorových vah (=zátěží) nebo graf faktorového skóre. Díky transformaci dat neboli redukci n-rozměrného prostoru do roviny dojde vysvětlení určitého procenta dat [72, 76].

Pomocí faktorové analýzy byly odhaleny struktury vztahů mezi proměnnými na reálných vzorcích. Vlastní čísla matice jsou uvedena v Tabulce 30 a sloužily jako rozlišovací kritérium při výběru faktorů. Hodnoty v Tabulce 30 byly použity pro analýzu po standardizaci dat. Faktorovou analýzou bylo určeno 16 proměnných jako nejvýznamnějších z hlediska objasnění variability v datech. Došlo tak k objasnění téměř 80% variability v datech pro dva faktory a pro tři faktory až 90%.

Tabulka 30 Vlastní čísla matice a související statistiky po rotaci Varimax vypočtená programem Statistica 12

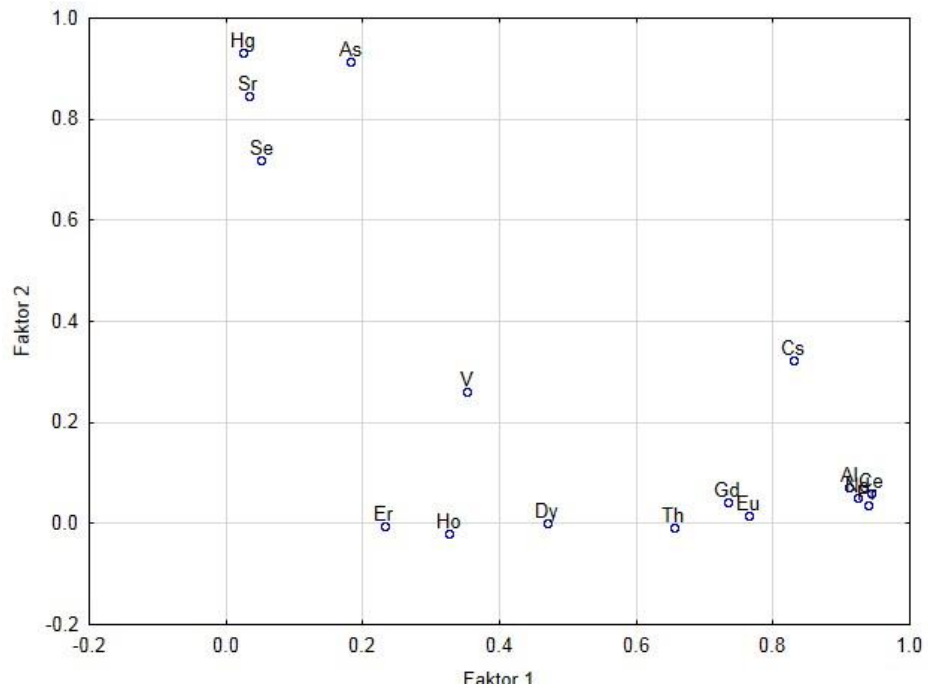
Index	Vlastní číslo	Individuální %	Kumulativní %
1	9,510083	59,43802	59,43802
2	3,021990	18,88744	78,32545
3	1,552608	9,70380	88,02926

Hodnoty faktorových vah pro jednotlivé faktory vyjadřující korelační strukturu jednotlivých původních proměnných s dotyčnými faktory jsou uvedeny v Tabulce 31. Z tabulky vyplývá, že Faktor 1 je nejvíce ovlivněn proměnnými Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu a Gd, Faktor 2 pak proměnnými Hg, As, Se a Sr a Faktor 3 nejvíce těmito proměnnými V, Dy, Ho a Er. Grafy faktorových vah na Obrázku 9 zobrazují uvedené závislosti.

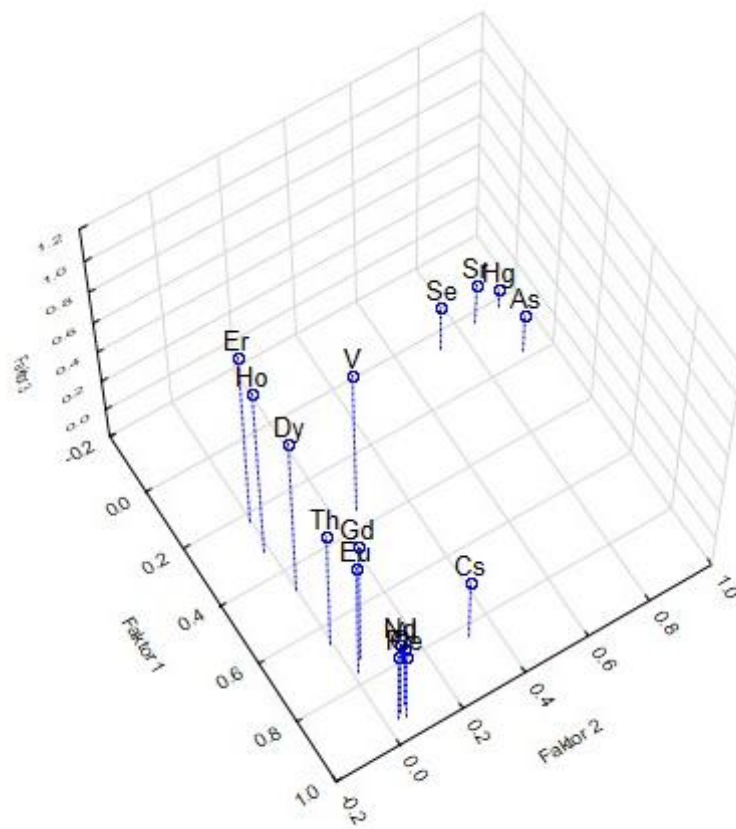
Tabulka 31 Faktorové váhy po rotaci Varimax

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Hg	0,024443	0,932638	-0,079572
As	0,182527	0,914631	0,060864
Se	0,051811	0,720220	0,091508
Sr	0,032650	0,847493	0,060765
Al	0,911116	0,070993	0,255046
V	0,352531	0,262174	0,760777
Cs	0,829504	0,324166	0,207532
Ce	0,942748	0,059481	0,280941
Pr	0,938114	0,037017	0,302961
Nd	0,924243	0,052483	0,333038
Eu	0,763512	0,016075	0,592170
Gd	0,733218	0,042967	0,652730
Dy	0,469505	0,000397	0,866349
Ho	0,325856	-0,019726	0,934930
Er	0,231049	-0,004613	0,966425
Th	0,655235	-0,006874	0,627046
Výkl.roz	6,233102	3,132409	4,719170
Prp.celk	0,389569	0,195776	0,294948

9A



9B



Obrázek 9 2D (9A) a 3D (9B) graf faktorových zátěží pro 51 objektů a 16 proměnných koncentrace Al, V, Cs, Ce, Pr, DNd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th, Hg, As, Se, Sr po standardizaci dat

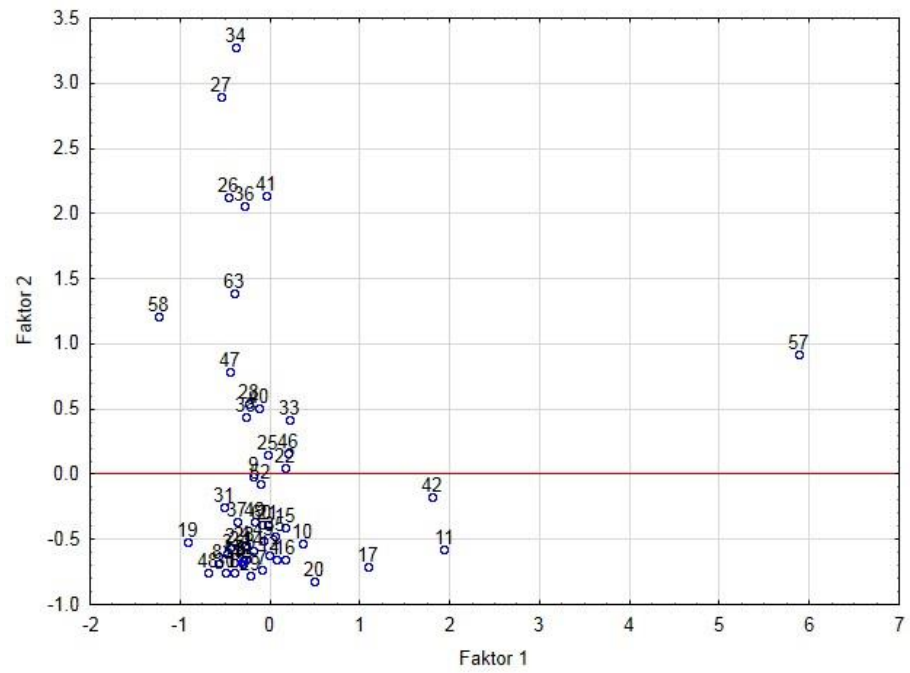
Tabulka 32 Příspěvky daného faktoru do komunality po rotaci Varimax

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Hg	0,000597	0,870412	0,876744
As	0,033316	0,869865	0,873570
Se	0,002684	0,521401	0,529774
Sr	0,001066	0,719311	0,723004
Al	0,830132	0,835172	0,900220
V	0,124278	0,193013	0,771795
Cs	0,688078	0,793161	0,836231
Ce	0,888774	0,892312	0,971240
Pr	0,880058	0,881428	0,973214
Nd	0,854225	0,856980	0,967894
Eu	0,582951	0,583209	0,933875
Gd	0,537609	0,539456	0,965512
Dy	0,220435	0,220435	0,970995
Ho	0,106182	0,106571	0,980666
Er	0,053383	0,053405	0,987381
Th	0,429332	0,429380	0,822566

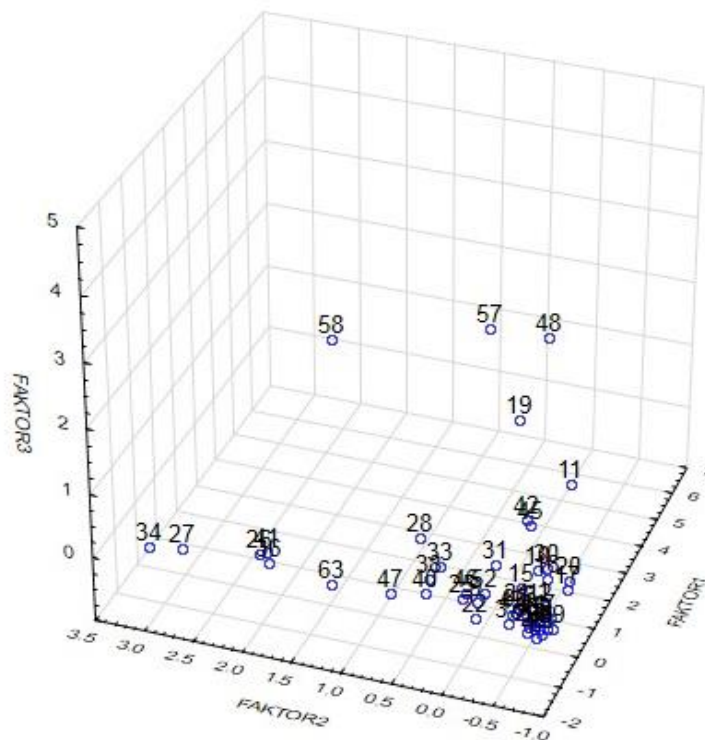
Z Tabulky 32 je zřejmé, že hodnoty komunalit ukazují, jak správně je daná proměnná predikovaná vybranými faktory. Faktorová skóre jsou hodnoty faktorů pro jednotlivé řádky dat. Na Obrázku 10 je uveden rozptylový diagram faktorového skóre, který dokumentuje hlavní strukturu nalezenou v datech.

Z Obrázku 10A je zřejmý shluk sedmi vzorků (č. 26, 27, 34, 36, 41, 58 a 63). Jedná se o vzorky rybích granulí, které se vyznačují maximální či vyšší koncentrací Hg, As, Se a Sr oproti mediánu a nejvíce přispívají k Faktoru 2. Vzorek č. 57, 11 a 42 byly odděleny od ostatních vzorků podle Faktoru 1. Pomocí Faktoru 3 byly nejvíce odlišeny vzorky č. 58, 57, 48 a 19, které mají vyšší koncentrace V, Dy, Ho a Er oproti mediánu (Obrázek 9). Pomocí faktorové analýzy nebyla shledána jednoznačná souvislost mezi produkty s různou kvalitou nebo rozdílnými druhy krmiv.

10A



10B



Obrázek 10 2D (10A) a 3D (10B) rozptylový diagram faktorových skóre pro 51 objektů a 16 proměnných koncentrace Al, V, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th, Hg, As, Se, Sr po standardizaci dat

4.4.4 Srovnání nalezených koncentrací s limitami danými legislativou

Hladiny koncentrací určitých prvků v krmivech reguluje v Evropské unii směrnice Rady 1831/2003/EC, 2002/32/ES a Evropského parlamentu [6, 7]. Naměřené hodnoty byly srovnány jak s limity dané legislativou, tak i s koncentracemi doporučenými organizací FEDIFAF [25] (viz Tabulka 33). Koncentrace Cu, Fe, Mn, Se a Zn dané legislativou 1831/2003/EC jsou uvedeny pouze orientačně, protože tyto hodnoty jsou určeny pro prvek přidávaných do krmiv jako aditivum a nevychází z koncentrací surovin použitých pro výrobu. Medián souboru dat se nachází vždy pod koncentrací stanovenou legislativou.

Jak již bylo diskutováno v kapitole 4.4.3, tak vyšší koncentrace prvků (Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Th, Hg, V, Cr a Ni) oproti mediánu skupin byly naměřeny u vzorku č. 57, který pocházel od značky Taste of the Wild®. Byl to vzorek kočičích granulí se pstruhem a uzeným lososem. Taktéž u vzorků č. 26, 27, 36, 41 a 34 neboli vzorků rybích granulí, u kterých byla hodnota koncentrace průměrně 10x vyšší než hodnota mediánu ($0,003 \text{ mg kg}^{-1}$). Prvky uran a thorium se nacházely ve vyšších koncentracích u vzorků č. 10, 11, 19, 24, 28, 31, 38 a 58 pro U a pro Th to byly vzorky č. 10, 11, 42, 48, 57 a 58. U vzorku č. 11 a 57 byla naměřena nejvyšší koncentrace Th ($0,215$ a $0,235 \text{ mg kg}^{-1}$, medián souboru $0,045 \text{ mg kg}^{-1}$). A nejvyšší koncentrace U byla nalezena u vzorku č. 58 a u vzorku č. 19 ($2,72 \text{ mg kg}^{-1}$ a $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$, medián souboru $0,022 \text{ mg kg}^{-1}$).

Tabulka 33 Srovnání naměřených hodnot vybraných prvků s limity danými legislativou a koncentracemi doporučenými FEDIAF

Prvek Limity dané legislativou					
	2002/32/ES [7]	1831/2003/EC [24] (mg kg⁻¹)	Doporučení FEDIAF (mg kg⁻¹)[25]	Medián souboru dat (mg kg⁻¹), Ca a P (g kg⁻¹)	Maximální naměřené koncentrace (mg kg⁻¹)
As	2 ^a	-	-	0,107	0,876 (vz.č.36)
Hg	0,4 ^a	-	-	0,003	0,042 (vz.č.34)
Cu	-	28	28	15,6	37,1 (vz.č.25)
Fe	-	1420	1420	215,1	570,6 (vz.č.59)
Mn	-	170	170	46,9	99,3 (vz.č.8)
Se	-	0,568	0,568	0,518	2 (vz.č.22)
Zn	-	284	227	162,2	354,2 (vz.č.33)
Ca	-	-	25 ^b	13,7	34,4 (vz.č.31)
P	-	-	16 ^b	9,7	19,7 (vz.č.31)

^a maximální obsah v mg kg⁻¹ v krmivu s 12 % obsahem vlhkosti

^b maximální doporučená nutriční hodnota v g kg⁻¹

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo provést multielementární analýzu krmiv pro domácí zvířata pomocí vybraných metod atomové spektrometrie. Teoretická část se věnuje rozdělení granulí pro psy a kočky, složení, výrobnímu procesu a problematice prvkové analýzy krmiv se zaměřením na metodu ICP-MS.

Pro stanovení Hg byla použita metoda termooxidačního stanovení rtuti za využití přístroje AMA 254. Vzorky byly analyzovány v pevném stavu po předchozí lyofilizaci. Ostatní prvky, pro jejichž stanovení byla použita metoda ICP-OES a ICP-MS byly analyzovány v kapalném stavu po mikrovlnné mineralizaci. Cílem bylo najít účinný a časově úsporný postup přípravy vzorků. Pro mikrovlnný rozklad byla použita směs činidel 65% HNO₃ a 30% H₂O₂. Kompletní příprava vzorku zahrnující vážení, pipetování činidel a samotný mikrovlnný rozklad trvala okolo 50 minut. Pomocí postupu mikrovlnné mineralizace byly i eliminovány některé možné interference. Optimalizovány byly rovněž parametry nastavení metod ICP-OES a ICP-MS. Správnost stanovení byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu SRM[®] 1577c Bovine Liver (National Institute of Standards & Technology, USA). Byla nalezena dobrá shoda mezi certifikovanými a naměřenými hodnotami.

Celkově bylo analyzováno 51 vzorků krmiv a stanoveny 35 prvků (Mg, Na, K, P, Ca, Fe, Mn, Ba, Cu, Al, Zn, Hg, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U). Výsledky analýzy byly statisticky zhodnoceny pomocí metod jednorozměrné a vícerozměrné analýzy dat. Konkrétně byly použity metody exploratorní, diskriminační a faktorové analýzy dat. Pomocí diskriminační analýzy byly nalezeny proměnné umožňující klasifikovat vzorky krmiv do 2 kategorií na psí a kočičí granule. Prvky Fe, Cr, Cs, Cu, Hg, Ba, Ca a P byly nalezeny jako znaky s dostatečnou klasifikační silou. Úspěšnost zařazení objektů do tříd byla 100 %. Faktorovou analýzou nebyla shledána jednoznačná souvislost mezi produkty s různou kvalitou nebo rozdílnými druhy krmiv. První dva faktory nám popisují více než 80% variabilitu v datech. Analýza byla zaměřena i na prvky, které nejsou běžně sledovány. Díky tomu byly zjištěny vyšší koncentrace např. lanthanoidů, aktinoidů, Th a U oproti běžně analyzovaným prvkům jako jsou As či Hg. Za zmínku stojí vzorek č. 57, který z celé řady vzorků vybočoval vyššími koncentracemi Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Th, Hg, V, Cr a Ni.

6 LITERATURA

- [1] D-test. *Krmivo pro psy* [online], 2016. Dostupné z: https://www.dtest.cz/testy-vyrobku-745/test-krmiva-pro-psy-2016?gclid=EAIaIQobChMIwuD5oY3V1wIVVcYbCh1qvwNwEAAYASAAEgJX_PD_BwE. [cit. 25.4.2018].
- [2] M.E. Thompson, M.R. Lewin-Smith, V.F. Kalasinsky, K.M. Pizzolato, M.L. Fleetwood, M.R. McElhaney, T.O. Johnson, *Characterization of Melamine-containing and Calcium Oxalate Crystals in Three Dogs with Suspected Pet Food-induced Nephrotoxicosis*, *Veterinary Pathology* 45(3) (2008) 417-426.
- [3] C.A. Brown, K.-S. Jeong, R.H. Poppenga, B. Puschner, D.M. Miller, A.E. Ellis, K.-I. Kang, S. Sum, A.M. Cistola, S.A. Brown, *Outbreaks of Renal Failure Associated with Melamine and Cyanuric Acid in Dogs and Cats in 2004 and 2007*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19(5) (2007) 525-531.
- [4] M. Harada, *Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution*, *Critical Reviews in Toxicology* 25(1) (1995) 1-24.
- [5] L. Vomelová, *Stanovení výživné hodnoty granulovaných krmných směsí pro psy*. České Budějovice, 2008. Diplomová práce. Jihočeská univerzita, Katedra genetiky, šlechtění a výživy.
- [6] *NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 767/2009 ze dne 13. července 2009* [online]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32009R0767>. [cit. 25.4.2018].
- [7] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech* [online]. [cit. 25.4.2018]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32002L0032>.
- [8] A. Lišková. *Technologické zpracování „PET FOOD“*. České Budějovice, 2012. Diplomová práce, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.
- [9] S.C. Zicker, *Evaluating Pet Foods: How Confident Are You When You Recommend a Commercial Pet Food?*, *Topics in Companion Animal Medicine* 23(3) (2008) 121-126.
- [10] The European Pet Food Industry Federation, *REQUIREMENTS OF THE PET ANIMAL* [online]. Dostupné z: <http://www.fediaf.org/prepared-pet-foods/requirements-of-the-pet-animal.html>. [cit. 25.4.2018].
- [11] The European Pet Food Industry Federation, *THE OBJECTIVES OF PET FOOD* [online]. Dostupné z: <http://www.fediaf.org/prepared-pet-foods/the-objectives-of-pet-food.html>. [cit. 25.4.2018]

- [12] B.J. Bednářová, *Studium vlivu složení krmiv pro psy na příjem a chutnost*. Brno, 2009. Diplomová práce, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Ústav výživy zvířat a pícninářství.
- [13] Association of American Feed Control Officials (AAFCO), *Dog Food Nutrient Profiles* [online]. Dostupné z: <https://www.aafco.org/Publications>. [cit. 25.4.2018].
- [14] Psí krmivo rádce, *Lexikon surovin* [online]. Dostupné z: <http://www.psikrmivoradce.html>. [cit. 25.4.2018]
- [15] P. Svobodová, *Stanovení kvality bílkovin krmných směsí pro psy*. Brno, 2009. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Ústav výživy a pícninářství.
- [16] J. Šterc, E.Štercová, *Výživa a potřeba živin u psů*, Veterinářství 8 (2014) 583-589.
- [17] D.P. Bone, E.L. Shannon, *Process for making a dry pet food having a hard component and a soft component*, Google Patents, 1977.
- [18] Doc. MVDr. Miroslav Svoboda, CSc., JUDr. Karel Rozsypal, *Výživa psa a kočky* in: A.T.B. Edney (Ed.) *Canis*, Praha, 1991.
- [19] M. Kvaš, *Výživa psů*, Dona, České Budějovice, 1998.
- [20] M. ČÁSTKOVÁ, *Vybrané antinutriční látky v krmivech*. Brno 2017. Diplomová práce. Mendelova univerzita, Agronomická fakulta.
- [21] R.V. Hedegaard, & Sloth, J. J. (2011). *Speciation of arsenic and mercury in feed: Why and how?* *Biotechnologie, Agronomie, Société Et Environnement*, 15, 45-51. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/856823228?accountid=17239>
- [22] S.B. Hooser, *Chapter 24 - Cadmium A2 - Gupta, Ramesh C*, *Veterinary Toxicology* (Third Edition), Academic Press 2018, pp. 417-421.
- [23] P. Atkins, L. Ernyei, W. Driscoll, R. Obenauf, R. Thomas, *Analysis of toxic trace metals in pet foods using cryogenic grinding and quantitation by ICP-MS, part II*, *Spectroscopy* 26(2) (2011) 42.
- [24] *Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003* [online]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=en%3E>. [cit. 25.4.2018]
- [25] The European Pet Food Industry Federation, *Nutritional Guidelines* [online]. Dostupné z: <http://www.fedaf.org/self-regulation/nutrition/>. [cit. 25.4.2018]
- [26] M.L. Slováček, *Vitaminy ve výživě psa* [online], 2002. Dostupné z: <http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/vitaminy-ve-vyzive-psa-117.html>. [cit. 25.4.2018]

- [27] The European Pet Food Industry Federation, *RECIPES AND PROCESSING* [online]. Dostupné z: <http://www.fediaf.org/prepared-pet-foods/recipes-and-processing.html>. [cit. 25.4.2018]
- [28] P. Atkins, L. Ernyei, W. Driscoll, R. Obenauf, R. Thomas, *Analysis of toxic trace metals in pet foods using cryogenic grinding and quantitation by ICP-MS, part I*, *Spectroscopy* 26(1) (2011) 46-56.
- [29] D.V.L. Ávila, S.O. Souza, S.S.L. Costa, R.G.O. Araujo, C.A.B. Garcia, J.d.P.H. Alves, E.A. Passos, *Determination of Zn in Dry Feeds for Cats and Dogs by Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry*, *Journal of AOAC International* 99(6) (2016) 1572-1575.
- [30] L. Perring, M. Nicolas, D. Andrey, C. Fragnière Rime, J. Richoz-Payot, S. Dubascoux, E. Poitevin, *Development and Validation of an ED-XRF Method for the Fast Quantification of Mineral Elements in Dry Pet Food Samples*, *Food Analytical Methods* 10(5) (2017) 1469-1478.
- [31] M.-B.S. Andersen, J. Frydenvang, P. Henckel, Å. Rinnan, *The potential of laser-induced breakdown spectroscopy for industrial at-line monitoring of calcium content in comminuted poultry meat*, *Food Control* 64 (2016) 226-233.
- [32] G. Bilge, H.M. Velioglu, B. Sezer, K.E. Eseller, I.H. Boyaci, *Identification of meat species by using laser-induced breakdown spectroscopy*, *Meat Science* 119 (2016) 118-122.
- [33] Y. Dixit, M.P. Casado-Gavalda, R. Cama-Moncunill, X. Cama-Moncunill, M. Markiewicz-Keszycka, F. Jacoby, P.J. Cullen, C. Sullivan, *Introduction to laser induced breakdown spectroscopy imaging in food: Salt diffusion in meat*, *Journal of Food Engineering* 216 (2018) 120-124.
- [34] Y. Dixit, M.P. Casado-Gavalda, R. Cama-Moncunill, M. Markiewicz-Keszycka, X. Cama-Moncunill, P.J. Cullen, C. Sullivan, *Quantification of rubidium as a trace element in beef using laser induced breakdown spectroscopy*, *Meat Science* 130 (2017) 47-49.
- [35] M.P. Casado-Gavalda, Y. Dixit, D. Geulen, R. Cama-Moncunill, X. Cama-Moncunill, M. Markiewicz-Keszycka, P.J. Cullen, C. Sullivan, *Quantification of copper content with laser induced breakdown spectroscopy as a potential indicator of offal adulteration in beef*, *Talanta* 169 (2017) 123-129.
- [36] B. Sezer, G. Bilge, I.H. Boyaci, *Capabilities and limitations of LIBS in food analysis*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 97 (2017) 345-353.
- [37] H.M. Velioglu, B. Sezer, G. Bilge, S.E. Baytur, I.H. Boyaci, *Identification of offal adulteration in beef by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS)*, *Meat Science* 138 (2018) 28-33.
- [38] M. Markiewicz-Keszycka, X. Cama-Moncunill, M.P. Casado-Gavalda, Y. Dixit, R. Cama-Moncunill, P.J. Cullen, C. Sullivan, *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review*, *Trends in Food Science & Technology* 65 (2017) 80-93.

- [39] A. Luippold, M.S. Gustin, *Mercury concentrations in wet and dry cat and dog food*, *Animal Feed Science and Technology* 222(Supplement C) (2016) 190-193.
- [40] S.S.L. da Costa, A.C. Lima Pereira, E. Andrade Passos, J.d.P. Hora Alves, C.A. Borges Garcia, R.G. Oliveira Araujo, *Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES*, *Talanta* 108(Supplement C) (2013) 157-164.
- [41] N. Bilandžić, M. Sedak, M. Đokić, I. Varenina, B. Solomun Kolanović, Đ. Božić, M. Brstilo, B. Šimić, *Determination of zinc concentrations in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake*, *Journal of Food Composition and Analysis* 35(2) (2014) 61-66.
- [42] A.M. Nunes, R.A. de Sousa, C.S. da Silva, R.R.A. Peixoto, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, S. Cadore, *Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization*, *Journal of Food Composition and Analysis* 32(1) (2013) 1-5.
- [43] A. Duran, M. Tuzen, M. Soylak, *Trace element concentrations of some pet foods commercially available in Turkey*, *Food and Chemical Toxicology* 48(10) (2010) 2833-2837.
- [44] W. Guo, S. Hu, J. Zhao, S. Jin, W. Liu, H. Zhang, *Removal of spectral interferences and accuracy monitoring of trace cadmium in feeds by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Microchemical Journal* 97(2) (2011) 154-159.
- [45] V. Dufailly, L. Noël, T. Guérin, *Determination of chromium, iron and selenium in foodstuffs of animal origin by collision cell technology, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), after closed vessel microwave digestion*, *Analytica Chimica Acta* 565(2) (2006) 214-221.
- [46] N. Gerber, R. Brogioli, B. Hattendorf, M.R.L. Scheeder, C. Wenk, D. Günther, *Variability of selected trace elements of different meat cuts determined by ICP-MS and DRC-ICPMS*, *animal* 3(1) (2009) 166-172.
- [47] R. Bou, F. Guardiola, A. Padro, E. Pelfort, R. Codony, *Validation of mineralisation procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19(10) (2004) 1361-1369.
- [48] V. Dufailly, L. Noël, T. Guérin, *Optimisation and critical evaluation of a collision cell technology ICP-MS system for the determination of arsenic in foodstuffs of animal origin*, *Analytica Chimica Acta* 611(2) (2008) 134-142.
- [49] D. Pick, M. Leiterer, J.W. Einax, *Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS*, *Microchemical Journal* 95(2) (2010) 315-319.
- [50] O. Reykdal, S. Rabieh, L. Steingrimsdottir, H. Gunnlaugsdottir, *Minerals and trace elements in Icelandic dairy products and meat*, *Journal of Food Composition and Analysis* 24(7) (2011) 980-986.

- [51] S. Millour, L. Noël, A. Kadar, R. Chekri, C. Vastel, T. Guérin, *Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation*, *Journal of Food Composition and Analysis* 24(1) (2011) 111-120.
- [52] Atomová absorpční spektrometrie (AAS) [online]. Dostupné z: http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/1IAME/3%20IAME-AAS.pdf. [cit. 25.4.2018]
- [53] D. Milde, *Porovnání metod atomové spektrometrie* [online], 2017. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/02-apas-porovnani-metod-1505758225.pdf>. [cit. 25.4.2018]
- [54] R.F.J. Dams, J. Goossens, L. Moens, *Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass-spectrometry*, *Microchimica Acta* 119(3) (1995) 277-286.
- [55] T.P. N. Jakubowski, L. Rottmann, F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.* 26, (2011) 693., *Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry*, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 693-726.
- [56] Ing. Lenka Husáková, Ph.D. *Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu*, 2018. [cit. 25.4.2018].
- [57] C. Agatemor, D. Beauchemin, *Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review*, *Analytica Chimica Acta* 706(1) (2011) 66-83.
- [58] I. Rodushkin, T. Ruth, D. Klockare, *Non-spectral interferences caused by a saline water matrix in quadrupole and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13(3) (1998) 159-166.
- [59] B.M. Dvořáková, *Nespektrální interference při analýze roztoků plazmovou tužkou*. Brno 2015. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie.
- [60] B.V. Herman, *Stanovení mikro a makro prvků v balených vodách technikou ICP-OES*. Brno 2005. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií.
- [61] B.T. Pluháček, *Možnosti analýzy klinických materiálů pomocí ICP-MS*. Olomouc, 2013. Diplomová práce. Univerzita Palackého, Fakulta přírodovědecká, Katedra analytické chemie.
- [62] A.F. de Oliveira, C.S. da Silva, S.R. Bianchi, A.R.A. Nogueira, *The use of diluted formic acid in sample preparation for macro- and microelements determination in foodstuff samples using ICP OES*, *Journal of Food Composition and Analysis* 66 (2018) 7-12.
- [63] R.A. Wilson, E.G. Yanes, R.J. Kemppainen, *Iodine speciation in dog foods and treats by high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection*, *Journal of Chromatography B* 1022(Supplement C) (2016) 183-190.

- [64] B. GmbH, *Speedwave Xpert, The Professional* [online]. Dostupné z: https://www.berghof-instruments.com/fileadmin/redaktion/downloads/Brochure_Speedwave_Xpert_EN_n.pdf. [cit. 25.4.2018]
- [65] B. GmbH, *Fluoropolymers Isostatically molded PTFE of highest quality* [online]. Dostupné z: https://www.berghof-fluoroplastics.com/fileadmin/Dateien-Einpflge/Seitenbaum/Home-Downloads/Produkte/PTFE-Produkte/PTFE-CompressionTechnology_PI_en.pdf. [cit. 25.4.2018]
- [66] T. Fišerová, *Stanovení celkové rtuti ve vzorcích ryb*. Pardubice, 2013. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
- [67] *Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight (TOF) Mass Spectrometer* [online]. Dostupné z: <http://www.gbcscientific.com/brochures/OptiMass9500Brochure.pdf>. [cit. 25.4.2018].
- [68] *GBC Integra XL* [online]. Dostupné z: <http://www.gbcscientific.com/brochures/01082901.pdf>. [cit. 25.4.2018].
- [69] *Podvarová destilace v teflonu* [online]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/podvarova-destilace-v-teflonu>. [cit. 25.4.2018].
- [70] *CoolSafe Superior Touch, Floor Standing Freeze Dryers* [online]. Dostupné z: <https://www.labogene.com/CoolSafe-Superior-Touch--Floor-Standing-Freeze-Dryers>. [cit. 25.4.2018].
- [71] L. Husáková, I. Urbanová, J. Šrámková, T. Černohorský, A. Krejčová, M. Bednaříková, E. Frýdová, I. Nedělková, L. Pilařová, *Analytical capabilities of inductively coupled plasma orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry (ICP-oo-TOF-MS) for multi-element analysis of food and beverages*, *Food Chemistry* 129(3) (2011) 1287-1296.
- [72] M. Meloun, J. Militký, *Kompendium statistického zpracování dat*, 3 ed., Karolinum, Praha 2012.
- [73] A. Mahne Opatić, M. Nečemer, S. Lojen, J. Masten, E. Zlatić, H. Šircelj, D. Stopar, R. Vidrih, *Determination of geographical origin of commercial tomato through analysis of stable isotopes, elemental composition and chemical markers*, *Food Control* 89 (2018) 133-141.
- [74] D. Granato, V.M. de Araújo Calado, B. Jarvis, *Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology*, *Food Research International* 55 (2014) 137-149.
- [75] M. Meloun, J. Freisleben, *Statistické zpracování vodohospodářských dat*. 2009, [online].
- [76] M. Meloun, J. Militký, M. Hill, *Statistická analýza vícerozměrných dat v příkladech* Academia Praha, 2012.