Fluorescentna detekcija selenija u organskim uzorcima

Ižaković, Marinela

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:874385

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Marinela Ižaković

Fluorescentna detekcija selenija u organskim uzorcima

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer

Marinela Ižaković

Fluorescentna detekcija selenija u organskim uzorcima

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Mirela Samardžić
Neposredni voditelj: dr.sc. Mateja Budetić

Osijek, 2018.

Izjavljujem:

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za kemiju, Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku pod vodstvom doc. dr. sc. Mirele Samardžić. Rad je predan stručnom vijeću na ocjenu radi stjecanja diplome magistra kemije.

Zahvala

Prvo bih se željela zahvaliti svim profesorima, docentima i asistentima na Odjelu za kemiju koji su me u ovih pet godina puno toga naučili i pokazali mi kako je kemija jako zanimljiva znanost u čijem svijetu možemo putovati bez granica i otkriti uvijek nešto novo. Da moram ponovno birati, opet bih baš nju izabrala. Najviše bih se zahvalila mojoj mentorici, doc. dr. sc. Mireli Samardžić koja je odvojila svoje vrijeme za mene kako bih mogla napraviti ovaj diplomski rad. Bez nje ne bih uspjela. Hvala joj na strpljivosti, savjetima, trudu i pomoći. Zahvaljujem se i mojoj neposrednoj voditeljici, dr. sc. Mateji Budetić koja je svo ovo vrijeme radila sa mnom dajući mi razne ideje i upute kako bih ovo što bolje mogla napraviti.

Posebnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima Stanislavu i Ankici i bratu Dariu bez kojih ovo ne bi bilo moguće. Spremno su se odrekli svega odlučni u tome da mi pomognu ostvariti moj san, te su mi bili velika emocionalna podrška i onda kada mi je bilo najteže, te kada nisam vjerovala u sebe oni jesu. Zahvaljujem se i mome dečku Marku na kojeg sam se uvijek mogla osloniti, koji je bio tu kada mi je bilo najteže i pomogao mi da ovaj put prijeđem sa još više motivacije. Na kraju bih se zahvalila mome djedu Đuri i svim prijateljima koji su mi pomogli u bilo kojem smislu, a osobito Darku, Milanu i Janji.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

Fluorescentna detekcija selenija u organskim uzorcima

Marinela Ižaković

***Rad je izrađen na*:** Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: doc.dr.sc. Mirela Samardžić

Sažetak:

Cilj ovog diplomskog rada je mjerenje koncentracije selenija u organskim uzorcima fluorescentnom spektrometrijom. Budući da selenij ne fluorescira, potrebno ga je označiti odgovarajućim markerom koji može fluorescirati. Kao takav marker koristi se 2,3-diaminonaftalen (DAN). Reakcijom DAN-a i selenija nastaje kompleks Se-DAN koji može fluorescirati te se na taj način mjeri selenij u uzorku. Za uzorke su uzeti suplementi u obliku tableta koji u sebi sadrže znatnu količinu selenija. Osim što je bilo potrebno pronaći najbolji način digestije takve tablete, težilo se tome da se odabere otapalo u kojemu će se kompleks Se-DAN najbolje ekstrahirati te samim time što točnije odredi količinu selenija u uzorku. Uzorak se razarao uz pomoć koncentriranih kiselina: dušične, sulfatne, perklorne i klorovodične, a kao najbolje otapalo za ekstrakciju Se-DAN kompleksa pokazao se cikloheksan.

Diplomski rad obuhvaća: Stranica: 63, Slika: 18, Tablica: 15, Literaturnih navoda: 37
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: selenij, fluorescencija, 2,3-diaminonaftalen, cikloheksan
Rad prihvaćen: 29.10.2018.
Stručno povjerenstvo: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
doc. dr. sc. Mirela Samardžić
doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD ***Diploma Thesis***

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; Research Study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

Fluorescence detection of selenium in organic samples

Marinela Ižaković

Thesis completed at: Department of Chemistry

Supervisor: Mirela Samardžić, Ph.D., assistant prof.

Abstract:

Aim of this thesis is fluorimetric detection of selenium and determination of its concentration in organic samples. Selenium dosent show fluorescence in any oxidation state, but when bound to specific marker the obtained compound shows fluorescence. 2,3-diaminonaphtalene (DAN) was used as a selenium marker. Reaction of selenium and DAN gives Se-DAN complex, a fluorescent compound. With this method selenium concentration can be determinated. Samples that were analysed were suplement pills containing significant amount of selenium. Beside of finding the best way of digestion, it was important to choose suitable solvent in which Se-DAN complex will be completly extracted. Acuraccy of selenium determination in samples depends on the solvent. In this thesis, different digestion methods (with concentric nitric, sulfate, perchloric and hydrochloric acid) and different extraction solvents were tested. Cyclohexane showed best extraction characteristics.

***Thesis includes*:** Pages: 63, Pictures: 18, Tables: 15, References: 37
Original in: Croatian
Keywords: selenium, fluorescence, 2,3-diaminonaphtalene, cyclohexane
Thesis accepted: 29.10.2018.
Reviewers: Aleksandar Sečenji, Ph.D., assistant prof.
Mirela Samardžić, Ph.D., assistant prof.
Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D., assistant prof.

***Thesis deposited in*:** Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, Osijek, Croatia

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. LITERATURNI PREGLED ... 2
2.1. Povijest selenija ... 2
2.2. Selenij i hrana ... 3
2.3. Uloga selenija u ljudskom tijelu ... 4
2.4. Aminokiseline koje sadrže selenij ... 5
2.4.1. Selenocistein ... 5
2.4.2. Selenometionin ... 6
2.5. Metabolizam selenija ... 10
2.5.1. Apsorpcija ... 10
2.5.2. Transport ... 10
2.5.3. Metabolizam i raspodjela ... 11
2.5.4. Ugradnja selenija u selenoproteine ... 12
2.5.5. Izlučivanje ... 12
2.5.6. Izlučivanje selenija u mlijeku ... 12
2.6. Selenoproteini ... 13
2.6.1. Selenij i imuno funkcije ... 14
2.7. Unos selenija u organizam ... 15
2.8. Posljedice nedostatka selenija u ljudskom organizmu ... 16
2.8.1. Bolesti koje su uzrokovane nedostatkom selenija ... 16
2.8.2. Selenij i karcinom ... 17
2.8.3. Selenij i kardiovaskularne bolesti ... 17
2.9. Toksičnost selenija ... 18
2.10. Određivanje razine selenija ... 19
2.11. Važnost selenija u stočnoj hrani ... 20
2.12. Analitičke tehnike za određivanje selenija ... 23
2.12.1. Biološki uzorci ... 23
2.12.2. Ekološki uzorci ... 26
2.13. Metode za određivanje biomarkera ... 28
2.14. Metode za određivanje polaznih spojeva i degradacijskih produkata u ekološkom mediju ... 29
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 30
3.1. Određivanje selenija u ovome radu ... 30
3.2. Instrumenti i kemikalije ... 32
3.3. Priprema otopina ... 34

3.3.1. Priprema standardne otopine selenija ... 34
3.3.2. Priprema otopine EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$ ... 34
3.3.3. Priprema otopine 2,3-diaminonaftalena (DAN) ... 34
3.3.4. Priprema 1 M otopine klorovodične kiseline ... 34
3.3.5. Priprema 0,1M otopine HCl ... 35
3.4. Kalibracija sa standardnim otopinama selenija ... 36
3.5. Mjerenje koncentracije selenija u realnim uzorcima ... 40
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 43
4.1. Kalibracija sa standardnim otopinama selenija ... 43
4.2. Mjerenje koncentracije selenija u realnim uzorcima ... 47
5. ZAKLJUČAK ... 60
6. LITERATURA ... 61

1. UVOD

Selenij je esencijalan element za ljude i mnoge životinje. Ispočetka se nije pridavalo toliku važnost ovom elementu, jer se smatralo da je štetan i toksičan. No, kako prevelike koncentracije selenija mogu štetno djelovati na organizme, tako i njegov nedostatak može biti uzročnik mnogih bolesti. Stoga se u današnjici često dodaje stočnoj hrani kao aditiv, ali ga i ljudi konzumiraju kao dodatak prehrani. Najvažniji oblici selenija za ljude su selenometionin i selenocistein. Iz takvih aminokiselina selenij se dalje metabolizira i iskorištava u organizmu te se na kraju izlučuje iz tijela.

Selenij se može određivati u raznim tkivima. Postoji puno metoda koje se mogu primijeniti za detekciju selenija. Neke od njih su: atomska apsorpcijska spektroskopija, atomska emisijska spektroskopija, fluorimetrijske metode, analiza aktivacije neutrona, plinsko-tekućinska kromatografija i slično.

Ciljevi ovoga rada su: mjeriti koncentraciju selenija u suplementima pomoću fluorescencije kompleksa selenija s fluorescentnim markerom i pronaći otapalo u kojemu će se kompleks selenija s markerom najbolje ekstrahirati.

Hipoteza ovoga rada je da selenij s fluorescentnim markerom stvara kompleks čiji je intenzitet fluorescencije proporcionalan koncentraciji selenija u uzorku.

U literaturnom dijelu ovoga rada reći će se nešto o povijesti selenija, njegovoj važnosti za ljudski organizam, aminokiselinama koje sadrže selenij i metabolizmu selenija u tijelu. Opisat će se neki selenoproteini i bolesti koje mogu nastati ukoliko dođe do nedostatka selenija u organizmu. Na kraju će se proći kroz tehnike koje se najčešće koriste prilikom analize selenija u biološkim i ekološkim uzorcima. Eksperimentalni dio rada objašnjava načine na koji se selenij odredio u uzorcima poznate i nepoznate koncentracije. U rezultatima i raspravi prikazani su dobiveni rezultati. Tu se nalaze grafički prikazi koji se uspoređuju i objašnjenja pojedinih grafova.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Povijest selenija

Oduvijek se mislilo da je selenij (slika 1.) toksičan element. Danas se zna da je ne samo esencijalan, nego i antikancerogen. O biološkim utjecajima selenija prvi je pisao Marco Polo. To je bilo 1295. godine za vrijeme njegova putovanja kroz Kinu. Nakon toga o seleniju se nešto više saznaje tek 1817. godine, kada ga je Jons Jacob Berzelius opisao kao crveni talog na zidu kojeg je zamijetio tijekom proizvodnje sumporne kiseline. Taj talog je zapravo bio mješavina selenija i telurija. Berzelius mu je dao ime prema grčkoj riječi „*selene*“, što znači „mjesec“. U početcima se selenij koristio za bojenje stakla. Za uklanjanje zelene i dobivanje crvene boje koristio se kadmijev selenit [1].

Kada se u prošlom stoljeću, kod ovaca koje su unosile veliku količinu selenija u organizam pojavila bolest, smatralo se da je selenij toksičan. Međutim, nakon nekog se vremena ustanovilo da životinje koje ne unose dovoljno selenija u organizam isto obolijevaju od nekih bolesti. Nakon toga se nastavilo istraživati selenij. 1957. godine Mills je otkrio enzim glutation peroksidazu koji sadrži selenij. Taj enzim služi za metabolizam vodikova peroksida, odnosno sprječava oštećenja stanica koja bi nastala djelovanjem štetnih slobodnih radikala koji su nastali zbog vodikova peroksida. Tako se došlo do zaključka da je selenij esencijalan element kako za ljude tako i za životinje. Selenij ima antioksidativna, hemozaštitna, antikancerogena, antivirusna i antiupalna svojstva. To je zato što je selenij sastavni dio više za od 25 proteina, gdje se nalazi u obliku aminokiseline selenocisteina [1].

Slika 1. *Selenij* [2].

2.2. Selenij i hrana

Industrija mesa jedna je od najvažnijih grana u prehrambenoj industriji. Glavni sastojci mesa su: voda, proteini, masti i minerali. Meso se može modificirati dodavanjem sastojaka koji su korisni za zdravlje ili otklanjanjem štetnih sastojaka. Funkcionalna hrana je ona hrana koja sadrži jednu ili više komponenti, odnosno biološki aktivnih jedinki, koje utječu povoljno na organizam. Biološki aktivne tvari mogu biti makronutrijenti (rezistentni škrob, n-3 masna kiselina), mikronutrijenti (vitamini, minerali) i neki neesencijalni sastojci (oligosaharidi, konjugirana linolna kiselina, biljni sterol, likopen). Funkcionalni sastojci mogu biti i neke fitokemikalije (sulforafan, izoflavoni, fitoestrogeni) ili živi mikroorganizmi (probiotici). Meso može biti funkcionalna hrana, no ponekad je i izvor bolesti, a to većinom ovisi o kvaliteti mesa. Kod prehrane ljudi, često se usmjerava pažnja na masne kiseline, osobito n-3 i n-6 masne kiseline. Stoga se hrana tijekom proizvodnje često obogaćuje n-3 masnim kiselinama. Sve više se govori i o važnosti konjugirane linolne kiseline, eng. *conugated linoleic acid* (CLA). To je zapravo skupina polinezasićenih masnih kiselina koje su geometrijski izomeri linolne kiseline. Najčešći izomeri linolne kiseline su *cis*-9, *trans*-11 i *trans*-10, *cis*-12. Konačno, sve više istraživanja odnosi se na funkciju i utjecaj selenija na procese u organizmu. Sadržaj selenija i vitamina E u mesu životinja igra veliku ulogu u kvaliteti mesa, a to uključuje: oksidativnu stabilnost, boju mesa, sposobnost vezanja vode i slično. Prilikom konzumiranja takvog mesa, ono utječe na ljude. Tu su jako bitni antioksidansi koji sprječavaju nastanak slobodnih radikala, uništavaju nastale slobodne radikale ili obnavljaju tkivo koje je već uništeno njihovim djelovanjem [3].

2.3. Uloga selenija u ljudskom tijelu

Selenij je esencijalni mineral koji se u ljudskom tijelu nalazi u tragovima, ali je neophodan za normalnu funkciju organizma. Važnost ovog minerala je otkrivena i priznata tek 1970-ih godina. U prosjeku, odrasli ljudski organizam sadrži oko 20 mg selenija. Kod ljudi se najviše ovog elementa nalazi u: eritrocitima, jetri, slezeni, srcu, bubrezima i testisima. U ljudskom tijelu selenij gradi 30 vrsta selenoproteina koji su važni antioksidativni enzimi. Najbitniji enzim kojeg selenij gradi je glutation peroksidaza. Ovaj je enzim važan jer služi za odstranjivanje štetnog vodikova peroksida iz organizma [4]. Na taj način sprječava djelovanje štetnih slobodnih radikala na organizam. Još jedan takav enzim je i jodotironin deiodinaza koji ima istu ulogu. Osim toga, selenij je bitan za nastanak tokoferola koji igra veliku ulogu u oksidoredukcijskim reakcijama. Vitamin E i selenij djeluju sinergistički [3]. Selenij bi se trebao unositi u organizam zajedno s vitaminom E, jer mu je tada povećan antioksidativni učinak. Ako tijelu nedostaje selenija, vitamin E može spriječiti neke simptome koji se javljaju zbog njegova nedostatka. Vitamin A pospješuje apsorpciju selenija [4]. Selenij također štiti biološke membrane od oštećenja izazvanih oksidacijom te na taj način sprječava nastanak srčanih oboljenja, služi kao preventiva protiv karcinoma (osobito kod karcinoma dojke, želuca, grla i rektuma), održava elastičnost tkiva te povećava broj spermatozoida i plodnost muškaraca [3]. Još neke uloge selenija u ljudskom organizmu su ojačavanje imuniteta, zaštita tijela od toksičnosti teških metala i utjecaja zagađenog okoliša, usporavanje starenja, pomaganje u borbi organizma protiv artritisa, Chronove bolesti, infekcija dišnog sustava i kožnih bolesti, velika uloga u radu štitne žlijezde i pospješivanje antioksidativnog učinka vitamina A i E [4].

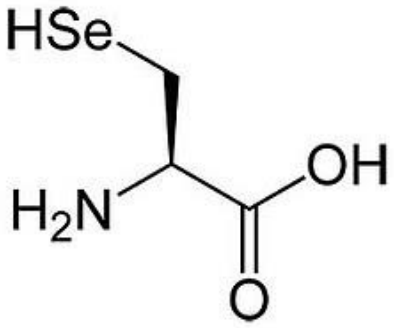
Najbogatiji izvori selenija su brazilski orasi. Jedan brazilski orah može sadržavati i do 1000 μg selenija. Ostale namirnice bogate selenijem su: iznutrice, meso i plodovi mora. Nešto manje selenija imaju žitarice, mlijeko i mliječni proizvodi. Voće i povrće imaju najmanje selenija, izuzevši bijeli luk. Termičkom obradom hrane gubi se 10-45% selenija [4].

2.4. Aminokiseline koje sadrže selenij

Dvije najzastupljenije aminokiseline koje sadrže selenij u prirodi i organizmima su selenocistein i selenometionin. Imaju veliku važnost u mnogim biološkim procesima koji se odvijaju u organizmima te su neophodne za razvoj i život biljnih i životinjskih organizama. Važne su i za čovjeka, jer ih on unosi kroz prehranu u organizam, gdje se dalje selenij iz tih aminokiselina metabolizira i iskorištava na razne načine.

2.4.1. Selenocistein

Većina uvjerenja o seleniju u području biokemije dolazi od otkrića da gen koji kodira mišju glutation peroksidazu i glutation peroksidazu kod *E. coli* kodira i dehidrogenazu koja je u okviru TGA terminacijskog kodona. Tako se selenocistein (slika 2.) smatra dvadeset i prvom aminokiselinom te je oznaka za selenocistein „U“ [5].



Slika 2. *Struktura selenocisteina. Atom sumpora koji se nalazi u cisteinu zamijenjen je atomom selenija* [6].

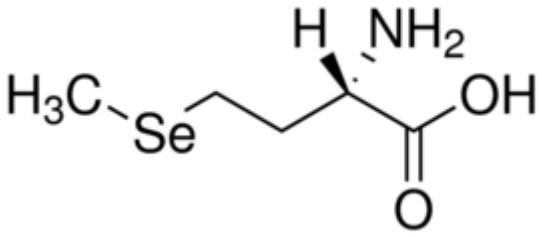
Identificirana su četiri gena čiji produkti imaju ulogu u metabolizmu selenija. To su: *seIA, seIB, seIC* i *seID*. *E. coli* sadrži tRNA koja je specifična za selenocistein, tzv. $tRNA^{Sec}$, a kodirana je *seIC* genom. Pronađeno je da se biosinteza selenocisteina događa na $tRNA^{Sec}$ i to počevši od vezanja serinskog dijela. Mutacije na određenim genima (*seIA* i *seID*) sprječavaju izgradnju selenocisteil-$tRNA^{Sec}$, što upućuje na to da produkti tih gena imaju funkciju prevođenja seril-$tRNA^{Sec}$ u selenocisteil-$tRNA^{Sec}$ [5].

Komparativne analize raspodjele selenatnog sustava su pokazale da je selenocistein prisutan u svim enterobakterijama i da su komponente jako očuvane te funkcionalno izmjenjive između različitih vrsta. Eukarioti sadrže supresore tRNA koji mogu biti nabijeni L-serinom, a njihovo pojavljivanje je široko rasprostranjeno u carstvu životinja. Serinski dio na tRNA je *O*-fosforiliran pomoću kinaze i odgovarajući *O*-fosfoseril-tRNA se ugrađuje u protein. Ovakva

tRNA nosi selenocistein *in vivo*, pa može biti homolog produkta *seIC* gena u *E. coli*. Ipak, izravan dokaz za prevođenje O-fosfoserina u selenocistein na ovoj tRNA još uvijek ne postoji, kao ni objašnjenje O-P-serinske i selenocisteinske ugradnje pomoću iste tRNA. Dakle, O-fosfoserin nije međuprodukt u biosintezi selenocisteina kod *E. coli*. Mehanizam umetanja selenocisteina bi mogao biti evolucijski ostatak iz razdoblja kada su različite tRNA mogle imati različite sustave dostavljanja aminokiselina na ribosome [5].

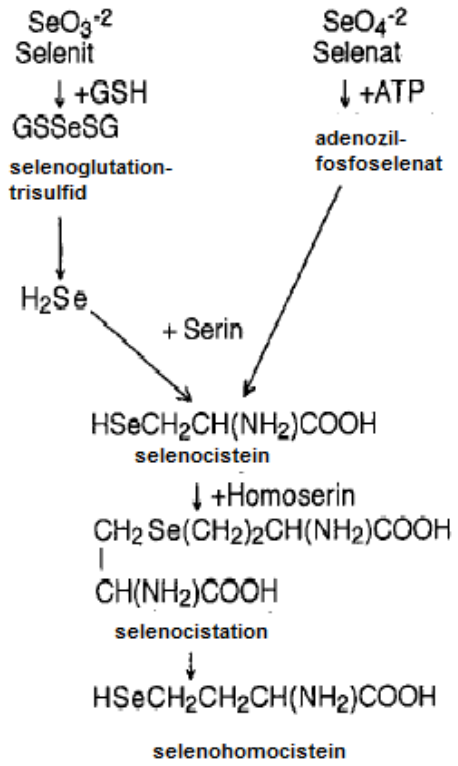
2.4.2. Selenometionin

1930-ih godina mislilo se da bi selenometionin (slika 3.) mogao biti otrovan za neke biljke koje ga sadrže [7]. Proučavanjem selenometionina u biljkama 1950-ih i 1960-ih godina se dokazalo da može nastati iz soja bakterija kao što su *S. cerevisiea, C. albicans, E. coli,* bakterija buraga i morskih alga kada se stave u medij koji je bogat selenijem [8]. 1962. godine se selenometionin s izotopom selenija ^{75}Se počeo koristiti kao agens za analizu gušterače [9]. 1970-ih se zaključilo da se Se-met jako dobro apsorbira i zadržava u organizmu, pa se počeo koristiti kao nadomjestak prehrani [10]. Ubrzo je kvasac obogaćen selenijem prihvaćen kao ekonomičan izvor selenija. Ipak, počelo se razmišljati o tome da bi se takav selenij mogao nakupljati u organizmu ili izlučiti u obliku nekih toksičnih metabolita [7].



Slika 3. *Struktura selenometionina. Umjesto atoma sumpora koji se nalazi u metioninu, ovdje je prisutan atom selenija* [11].

U žitaricama i stočnoj hrani selenij se većinom prevodi u selenometionin te se u proteinima ugrađuje na mjesto metionina jer $tRNA^{Met}$ ne razlikuje metionin i selenometionin. Najčešći način sinteze selenometionina u biljkama, morskim algama i kvascu prikazan je na slici 4 [7].



Slika 4. *Prikaz najčešćeg načina sinteze selenometionina u biljkama, morskim algama i kvascu* [7].

Selenometionin nije potreban za rast biljaka, ali on u njima nastaje i to ovisno o količini selenija koja je dostupna. U tkivu trave *Melilotus indica L*. sadržaj selenometionina raste s porastom koncentracije selenija u tlu sve dok njegov sadržaj ne iznosi više od 50% ukupne koncentracije ukupnog selenija u biljki. U suprotnom, selenocistein, metil-selenocistein i gama-glutamil-met-selenocistein ostaju u vrlo niskim koncentracijama neovisno o sadržaju selenija u tlu te se ne ugrađuju znatno u proteine. U kukuruzu, pšenici i soji koji su obogaćeni selenijem sadržaj selenometionina iznosi 81-82% ukupne koncentracije selenija. Selenometionin nastaje isto kao i metionin, samo što je potreban medij bogat selenijem [7].

Zamjena metionina sa selenometioninom ne mijenja značajno strukturu proteina, ali može utjecati na aktivnost enzima ako se zamjena dogodi blizu ili unutar aktivnog mjesta. Budući da je CH_3-Se skupina selenometionina hidrofobnija od CH_3-S skupine metionina, to utječe na neke kinetičke parametre kod pristupa supstrata. Primjerice, supstituirana timidilat sintaza *E. coli* sadrži 40% veću specifičnu aktivnost od uobičajene. U ß-galaktozidazi *E. coli* zamjenom više od pola metioninskih ostataka sa selenometioninskim ostatcima dolazi do inaktivnosti enzima. U usporedbi s normalnim enzimom, termalna stabilnost supstituirane

timidilat sintaze *E. coli* je osam puta niža od uobičajene, a osjetljivost na otopljeni kisik je povećana. Stoga selenometionin služi kao antioksidans koji štiti stanice od oksidanasa kao što je peroksinitrit. Na miševima se pokazalo i da selenometionin štiti od radijacija, osobito od UV-svjetla [12].

Životinje ne mogu sintetizirati selenometionin. U štakorima, koji su uzimali selenit kao suplement, je zabilježena pojava samo selenocisteina. Od aminokiselina koje sadrže selenij, jedino se selenometionin ugrađuje u proteine tijela. To omogućuje skladištenje selenija u organizmu i reverzibilno oslobađanje metaboličkim putevima. Uneseni selenometionin se apsorbira u tankom crijevu pomoću neutralnog aminokiselinskog apsorpcijskog sustava koji ovisi o natriju. Selenometionin, koji se nije odmah metabolizirao, se ugrađuje u organe u kojima se sinteza proteina odvija vrlo brzo kao što su: mišići skeleta, eritrociti, gušterača, jetra, bubrezi, želudac i gastrointestinalna sluznica. Takvo zadržavanje se opazilo i kod ^{35}S-metionina i ^{14}C-fenilalanina [13]. Eritrociti ugrađuju selenometionin uglavnom u hemoglobin. U plazmi se nalazi prvenstveno u frakciji albumina. Selenometionin se također ugrađuje i u proteine mozga. Suplement selenometionin u usporedbi sa selenitom i selenatom ima različite učinke na proliferaciju limfocita i ostale imunološke varijable. Prosječan poluživot selenometionina i selenita u ljudskom organizmu iznosi 252 i 102 dana. Selenometionin je pronađen i u ljudskom mlijeku. Kod dojilja, selenometionin i kvasac obogaćen selenijem sprječavaju pad koncentracije plazmatskog selenija i glutation peroksidazne aktivnosti, kao i pad koncentracije selenija u mlijeku. Puno je veći porast koncentracije selenija u mlijeku kod konzumiranja selenometionina nego selenita [7].

Selenometionin se aktivira adenozilacijom, demetilira se i prevodi u selenocistein preko selenohomocisteina i selenocistationina, analogno metioninu. To se odvija bez selenometioninskih specifičnih enzima. Selenocistein se nadalje razgrađuje u jetri do serina i selenida. Selenid se tada koristi za sintezu selenoproteina ili se metilira do dimetil selenida ili trimetilselenijeva iona te se zatim izdiše ili izlučuje. Također selenometionin se može razgraditi do metilselenola pomoću djelovanja gama-liaze. Brzina razgradnje selenometionina je velika. Metabolizam selenometionina ovisi o razini vitamina B-6, koji služi kao kofaktor većine enzima uključenih u ovaj metabolizam [7].

Što se tiče toksičnosti selenometionina, srednja smrtonosna doza (LD_{50}) u štakorima iznosila je 4,25 mg Se/kg. Kronična toksičnost selenometionina niža je od selenita. U tridesetodnevnom testiranju trudnih ženki dugorepih makakija, najveća tolerantna doza L-

selenometionina iznosila je 150 μg Se/(kg·d). Eritrocitni selenij, selenij u plazmi i selenij u kosi povezani su s porastom gubitka mase, a to se pripisuje toksičnosti selenija koja je bila veća od 2,3 mg/L, 2,8 mg/L i 27 μg/g. I L-selenometionin i D-selenometionin uzrokuju iste toksičnosti kod štakora i oba se zadržavaju u skeletnim mišićima, srcu, jetrima i eritrocitima u istom stupnju. Jedino su razine selenija u plazmi bile niže uzimanjem L-selenometionina. Tvrdnja da ugradnja selenometionina u proteine tijela može uzrokovati porast koncentracije selenija do toksičnih razina [14] nije sigurna, jer se javlja stacionarno stanje koje sprječava nekontroliranu akumulaciju selenija. Slično, oslobađanje selenometionina iz proteina tijela katabolitičkim procesima tijekom bolesti ne bi trebalo rezultirati toksičnosti selenija zato što ne postoji mehanizam za selektivno oslobađanje selenometionina tijekom katabolizma [7].

Budući da životinje i ljudi ne mogu sintetizirati selenometionin, on bi mogao imati blagotvorne psihološke učinke koje ostali spojevi selenija nemaju. Istraživanja se usmjeravaju na takve učinke i otkrivanja posebnih terapeutskih svojstava selenometionina. Ovo bi se moglo primijeniti na organe s visokim afinitetom za selenometionin, kao što su mišići skeleta, gušterača, mozak i stanice imunološkog sustava te bi se moglo koristiti za prevenciju karcinoma i ostalih bolesti [7].

2.5. Metabolizam selenija

U žitaricama i ostalim biljkama, selenij dolazi u obliku selenometionina. U životinjskoj hrani se nalazi kao selenocistein, a to je aktivan oblik funkcionalnih selenoproteina u tijelima sisavaca. Metabolizam selenija uključuje: apsorpciju, transport, raspodjelu, izlučivanje, zadržavanje i transformaciju u aktivni oblik. Ovi procesi ovise o kemijskom obliku i količini unesenog selenija te o interaktivnim prehrambenim čimbenicima [15].

2.5.1. Apsorpcija

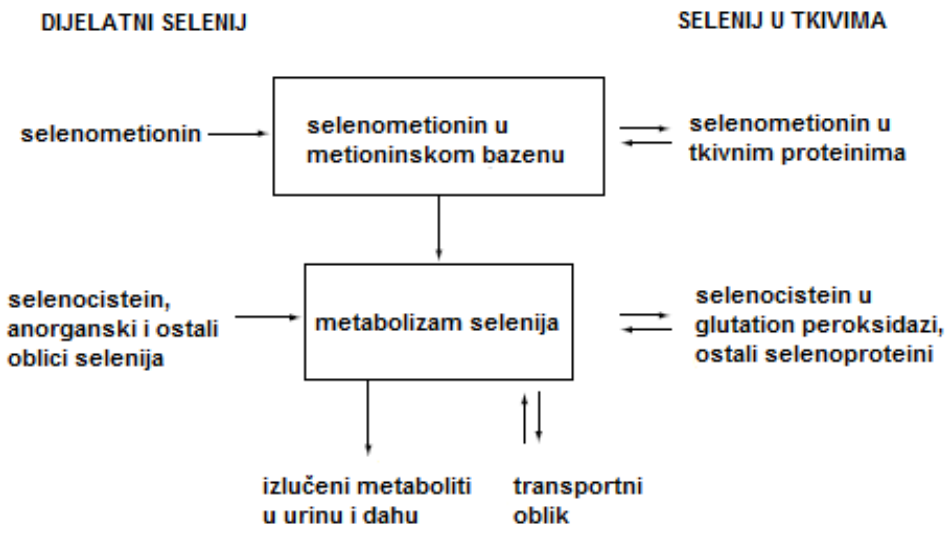
Selenij se najviše apsorbira iz dvanaesnika. Organski selenij apsorbira se kroz epitelne stanice crijeva isto kao i aminokiseline, selektivnim transportom. Skladišti se u tkivima i to u obliku selenoproteina. Selenometionin se transportira isto kao i metionin, dok je transport selenocisteina nepoznat. Anorganski oblici selenija, kao što su selenit i selenat, se apsorbiraju pasivnim mehanizmom. Njihova apsorpcija se događa u tankom crijevu. Selenit krvotokom dospijeva u jetru, a nakon enzimske reakcije s cisteinom nastaje selenocistein. Kod ljudi je apsorpcija selenija visoka. Tako se 80% selenija apsorbira iz hrane. Pokazano je da se selenometionin bolje apsorbira od selenita. Selenij se bolje apsorbira ako je prehrana bogata proteinima. Selenij koji je preostao i nije apsorbiran izlučuje se preko izmeta [15].

2.5.2. Transport

O transportu selenija kroz tijelo ne zna se baš puno, ali je sigurno to da se transportira tako da se veže na proteine plazme. Protein koji sadrži selenij zove se selenoprotein-P, a izoliran je iz plazme štakora i ljudi. Plazma također sadrži izvanstaničnu glutation peroksidazu, a molekule koje su lakše ponašaju se kao transportni proteini selenija [15].

2.5.3. *Metabolizam i raspodjela*

Metabolizam selenija prikazan je na slici 5.



Slika 5. *Kratki prikaz metabolizma selenija u ljudskom organizmu* [15].

U tkivima životinja, selenij može ući u sastav proteina u kojima može biti u dva oblika. Prvi takav oblik je selenocistein, koji predstavlja aktivni oblik selenija u selenoproteinima kao što je primjerice glutation peroksidaza koja je selenoenzim. Drugi oblik je selenometionin, koji je na mjestu metionina. Razina selenija u tkivu ovisi o unosu djelatnog selenija u organizam. To se odražava u širokim varijacijama razine selenija u krvi kod stanovnika različitih zemalja gdje su različite koncentracije selenija u tlima. Ukupna količina selenija u tijelu iznosi 3-20 mg, ovisno koliko ga se unosi. Zadržavanje selenija je usko povezano i s unosom nekih lijekova. Primjerice, s unosom selenometionina povećavaju se razine selenija u krvi više nego unošenjem natrijeva selenita ili selenata. Selenometionin vjerojatno slijedi isti metabolički put kao i metionin te je pripojen nespecifično na određeni protein. To doprinosi tkivnom obliku selenija, gdje se on nakuplja, ali nema svoju fiziološku funkciju. On se bez katalize ne može koristiti za sintezu funkcionalnijih oblika selenija [15].

U organizmu se selenat reducira u selenit, zatim selenid, gdje je u oksidacijskom stanju (-2). Tada se prevodi u selenocistein, koji je aktivni oblik selenoproteina. Anorganski oblik selenija ili onaj koji je dobiven katabolizmom selenometionina ili selenocisteina ulazi u regulaciju metabolizma selenija te je pripojen selenoproteinima. Ako se unese previše selenija, višak će se izlučiti urinom [15].

2.5.4. Ugradnja selenija u selenoproteine

Svi funkcionalni selenoproteini sisavaca sadrže u aktivnom mjestu selenocistein. Selenocistein je kodiran na jedinstven način, pomoću UGA kodona, specifičnog za selenoproteine, a koji je inače stop kodon u ostalim mRNA. Regulacija sinteze selenoproteina se vjerojatno odvija pomoću individualne mRNA na transkripcijskim ili posttranskripcijskim razinama i to u ovisnosti o raspoloživosti selenija. Na to utječu i čimbenici kao što su kemijski oblik selenija i izloženost kisiku [15].

2.5.5. Izlučivanje

Glavni način na koji se selenij izlučuje je urinom, iako to može biti i fekalnim putem, gdje je selenij ostao neapsorbiran. Homeostaza selenija se postiže regulacijom njegova izlučivanja. Dnevno izlučivanje selenija je usko povezano sa selenijem u plazmi i djelatnim unosom selenija. Izlučivanje selenija se koristi kao indikator razine selenija. Istraživanja su pokazala da se urinarnim putem izluči samo 50-60% ukupne količine unesenog selenija. Pokazano je da se kod stanovnika koji žive u zemljama gdje je tlo siromašno selenijem, selenij izlučuje puno sporije nego kod stanovnika koji žive u zemljama gdje je tlo njime bogato. Ovo pokazuje mogućnost prilagodbe na područja gdje je niska razina selenija. Jedan od metabolita selenija u urinu je trimetilselenijev ion. Za razliku od metilselenola, on se nalazi u urinu u manjim količinama. Manji gubici selenija događaju se kroz kožu ili kosu. Kad se unese puno selenija, u izdahnutom zraku se može osjetiti hlapljivi dimetilselenid [15].

2.5.6. Izlučivanje selenija u mlijeku

Većina selenija u ljudskom mlijeku je vezana na protein. Proteini koji sadrže selenij detektirani su u mlijeku pomoću glutation peroksidaze i iznosili su 15-30% ukupnog selenija [15].

2.6. Selenoproteini

Selenij je odgovoran za najmanje 30 bioloških učinaka u organizmu. Identificiranje i karakterizacija mnogih selenoproteina pomogli su u razumijevanju funkcija selenija u organizmu. Selenoproteini koji su pročišćeni i proučeni su: glutation peroksidaze (koje se nalaze u citosolu, stanicama i plazmi, gastrointestinalne glutation peroksidaze, fosfolipidni hidroperoksid), selenoprotein-P, jodotironin 5`-deiodinaze, selenoprotein kapsule sperme, selenoprotein-W, tioredoksin reduktaza, selenofosfat sintetaza, 58-, 56-, i 14-kDa Se-vezujući protein.

Glutation peroksidaza sastoji se od 4 jednake podjedinice, od kojih svaka sadrži po jedan selenocistein u aktivnom mjestu. U tkivima životinja gdje nedostaje selenija, aktivnost ovog enzima se može smanjiti na manje od 1%. Glutation peroksidaza u gastrointestinalnom traktu i stanicama plazme služi za uklanjanje vodikova peroksida i tako sprječava peroksidaciju membrana i oštećenje. Ipak, glutation peroksidaza ima puno veću ulogu u metabolizmu arahidonske kiseline u trombocitima, mikrobiocidnoj aktivnosti u leukocitima te u mehanizmu imunog odgovora ili možda kao pohranjeni protein. Drugi enzim koji sadrži selenij je fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza. On se razlikuje od uobičajene glutation peroksidaze po tome što može metabolizirati hidroperoksidne masne kiseline koje su esterificirane u fosfolipidima u membranama stanica. Ovaj enzim može inhibirati mikrosomalnu lipidnu peroksidaciju i osnova je selenij/vitamin E interakcija u patogenezi različitih deficijentnih bolesti kod životinja [15].

Selenoprotein-P je glikoprotein koji sadrži selenij u obliku selenocisteina, a njegova koncentracija u plazmi štakora pada ispod 10% kada nedostaje selenija. Njegova funkcija je još nepoznata, ali bi mogao imati ulogu u obrani od izvanstaničnih oksidansa zato što je njegova prisutnost povezana sa zaštitom od bolesti koje su izazvane nedostatkom selenija. Također ima ulogu transporta [15].

Jodotironin deiodinaze. Otkriće tipa 1 jodotironin 5`-deiodinaze, te tipa 2 i tipa 3 pokazalo je ulogu selenija u metabolizmu tiroidnih hormona. Ovaj enzim katalizira prevođenje tiroksina u njegov aktivni metabolit trijodotironin u jetri i bubregu. Zbog nedostatka selenija u plazmi dolazi do porasta razine tiroksina, a pada razine trijodotironina. Kada je količina selenija mala, prije će doći na ovaj enzim nego na glutation peroksidazu [15].

Tioredoksin reduktaza je flavonoenzim ovisan o NADPH koji reducira disulfide u tioredoksinu. Ovaj enzim regenerira askorbinsku kiselinu iz dehidroaskorbinske. Aktivnost ovog enzima se krije u nedostatku selenija. Selenij je ovdje u aktivnom mjestu prisutan u obliku selenocisteina [15].

Selenoprotein-W se nalazi u mišićima i ostalim tkivima. Njegova koncentracija pada nedostatkom selenija i može biti uzrok mišićne degeneracije kod ovaca kojima fali selenija [15].

Ostali selenoproteini uključuju enzime u nekim mikroorganizmima i životinjskim tkivima. Takav je na primjer selenoprotein u tkivu prostate, mitohondrijski selenoprotein u spermiju te 14-kDa i 56/58-kDa vezujući protein. Tu se ubraja i jedan od dva poznata enzima selenofosfat-sintetaze koji je uključen u regulaciju homeostaze selenija [15].

2.6.1. Selenij i imuno funkcije

Selenij je vrlo bitan za imunitet. Bitan je za razvoj stečenog imunosnog sustava te pomaže u borbi životinjskog organizma protiv bakterija i raznih infekcija. Ima i veliku ulogu u zaštiti organizma protiv virusnih infekcija. Uključenje selenija u imunološki sustav povezano je s glutation peroksidazom, fosfolipid glutation peroksidazom i selenoproteinom-P [15].

2.7. Unos selenija u organizam

Unos selenija se razlikuje kod ljudi i to u ovisnosti o tome što jedu i koje su im životne navike [15]. Najveći izvor selenija je hrana. Sadržaj selenija u hrani ovisi o njegovoj prisutnosti u tlu. Primjerice, područje srednje Europe je siromašno selenijem, pa stanovništvo na tim područjima ne može unijeti dovoljno selenija u organizam kroz hranu. Ako u tlu ima dovoljno selenija, ponekad sumpor iz kiselih kiša i gnojiva može spriječiti njegovu apsorpciju iz tla. Prosječan Europljanin unese 25-48 μg selenija dnevno. Za razliku od toga, prosječni Kanađanin unese 100-200 μg selenija dnevno [4]. Iz toga se vidi da prosječan dnevni unos selenija ovisi o tome u kojoj se zemlji živi.

Preporučeni dnevni unos selenija za odrasle osobe iznosi 55-75 μg, ovisno o spolu. U pravilu, muškarci trebaju više selenija nego žene. Kod prevencija ili liječenja nekih bolesti potrebno je uzimati 100-200 μg selenija dnevno. On se najčešće uzima kao dodatak prehrani i to u dva oblika: organski (selenometionin) i anorganski (natrijev selenat ili natrijev selenit). Prednost organskog oblika selenija je ta što se on apsorbira do 90%, što je puno više od anorganskog oblika. Međutim, anorganski selenij se duže zadržava u organizmu. U slučaju viška organskog selenija, on će se pohraniti u tkivima. Anorganski će se izlučiti urinom. Potrebno je usmjeriti pažnju na kadmij koji smanjuje iskoristivost selenija jer djeluje kao njegov antagonist [4].

2.8. Posljedice nedostatka selenija u ljudskom organizmu

Nedostatak čistog selenija je obično rijedak. Nedostatak selenija se uglavnom očituje kod niske razine selenija u kombinaciji s čimbenicima kao što su izloženost kemikalijama, porast oksidativnog stresa, koji se pripisuje nedostatku vitamina E, vježbanje ili povećan unos polinezasićenih masnih kiselina. Stanovnici koji žive u mjestima gdje je niska koncentracija selenija, imaju nisku koncentraciju selenija u krvi, nisku aktivnost glutation peroksidaze i niske razine selenoproteina-P [15].

2.8.1. Bolesti koje su uzrokovane nedostatkom selenija

***Keshan* bolest** je bolest koja se pojavila u Kini u područjima koja su siromašna selenijem, a očituje se u endemskoj kardiomiopatiji[1]. Pojavljuje se ako se kao dodatak koristi natrijev selenit. Ovdje se radi o multifokalnoj nekrozi miokarda, koja uzrokuje poremećaje kao što su: povećanje srca, kongestivno zatajenje srca, kardiogenički šok te na kraju smrt. Kod ove bolesti se očituje niska razina selenija u krvi i kosi. Ova bolest pogađa uglavnom djecu i žene koje su u plodnom razdoblju života. Neke značajke ove bolesti (kao na primjer periodične varijacije) se ne mogu potpuno objasniti na temelju niske razine selenija, pa se pretpostavlja da na to utječu i neki drugi čimbenici kao što su virusi, mineralna neravnoteža i neki otrovi. Istraživanjem na miševima je pokazano da *Coxsackie virus B,* koji uzrokuje miokarditis kod nedostatka selenija, ima utjecaj na ovu bolest [15].

***Kashin-Beck* bolest** je bolest koja je zabilježena u Kini i Rusiji. Posljedica ove bolesti je endemski osteoartritis u predadolescentnoj ili adolescentnoj dobi. Na ovu bolest isto mogu utjecati neki čimbenici, a to su: zagađenje žitarica nekim gljivicama te visoka razina organskih tvari (na primjer fulvinske kiseline). Osnovne značajke ove bolesti su kratak stas i deformacija zglobova koje, na kraju, rezultiraju multiplom fokalnom nekrozom i rastom pločastih cjevastih kostiju. Nedostatak selenija također može biti povezan i s dugotrajnom intravenoznom prehranom jer je u tekućini niska razina selenija. Iako ne kod svih pacijenata, zabilježeni su neki simptomi kao što su: kardiomiopatija, bol i slabost u mišićima [15].

[1] Kardiomiopatija je naziv za skupine bolesti koje dovode do poremećaja funkcija srca.

2.8.2. Selenij i karcinom

Neka istraživanja su pokazala da niska razina selenija može uzrokovati pojavu karcinoma. To je prvi put zamijećeno u SAD-u gdje je regionalna stopa smrtnosti od karcinoma bila povezana s izloženosti seleniju iz biljaka. Spoznaja da selenij igra veliku ulogu kao antikancerogena tvar dolazi od proučavanja koja su se vršila na životinjama *in vitro*. Proučavao se utjecaj kombinacije vitamina E, ß-karotena i selenija na karcinom jednjaka kao i utjecaj selenija na karcinom kože. Primijećeno je da svakodnevno uzimanje 200 µg selenija nije imalo utjecaja na karcinom kože, ali kod većine ostalih karcinoma (karcinom prostate, pluća, kolorektalni karcinom) smrtnost se smanjila i to za oko 50% i više [15].

Pretpostavlja se da selenij štiti organizam od karcinoma na četiri načina. Selenij štiti stanice od oštećenja koja uzrokuju kisikovi slobodni radikali. Oni su jako reaktivni i stvaraju perokside koji ubrzavaju početni stadij karcinoma u kojem nastaju pred-kancerogene stanice. Sljedeće što selenij radi je to da ublažava mutacijsko djelovanje kancerogenih tvari kao što su kemikalije, virusi i zračenja. Nadalje, selenij sprječava razmnožavanje kancerogenih virusa. I na kraju, zaustavlja diobu stanica karcinoma te na taj način sprječava njegovo širenje po cijelom tijelu [4].

2.8.3. Selenij i kardiovaskularne bolesti

Nedostatak selenija može uzrokovati razne kardiovaskularne bolesti. Dugoročna istraživanja u Finskoj pokazala su da selenij može utjecati na srčani udar kod ljudi s niskom razinom selenija, no te studije odbačene jer nisu uspješno dokazane. Ipak, dokazano je da selenij ima ulogu u borbi protiv tromboze i oksidacije lipoproteina niske gustoće u slučajevima kao što su pušači koji su izloženi velikom riziku od oksidativnog stresa [15].

2.9. Toksičnost selenija

Granica između prikladnog i toksičnog unosa selenija u organizam je prilično tanka. Pretjerana izloženost ili selenoza se može dogoditi kod pretjeranog konzumiranja hrane koja je bogata selenijem. Glavne posljedice su: opadanje noktiju i kose, ozljede na koži i živčanom sustavu te na zubima. Miris češnjaka u dahu može upućivati na višak selenija, a spoj koji daje taj miris je dimetilselenid. Kada se unese doza selenija već od 900 μg vide se posljedice za zdravlje [9]. Kod akutnog trovanja ljudi selenijem pojavljuju se simptomi kao što su: groznica, ubrzano disanje, gastroentelitis, mijelitis, anoreksija i smrt. Ipak, selenij čak ni u dvostruko većim dozama od terapijskih nije toksičan [4].

2.10. Određivanje razine selenija

Za određivanje selenija u organizmu najčešće se koristi krv, ali mogu poslužiti i ostala tkiva. Plazma odražava kratkoročnu razinu selenija, a eritrociti dugoročnu. Koncentracije selenija u krvi su pod utjecajem oblika u kakvom je selenij progutan, a rezultat toga je i različita apsorpcija i zadržavanje. Za analizu se često koriste nokti na nogama ili kosa. Urin se također može koristiti za analizu količine selenija, a za određivanje ukupnog dnevnog unosa selenija potrebno ga je analizirati dva puta na dan. Uska povezanost između krvi ili glutation peroksidaze crvenih stanica i koncentracije selenija se koristi za određivanje selenija kod ljudi koji imaju nisku koncentraciju istog. Najveća aktivnost tog enzima je kada je koncentracija selenija 100 μg/L. Mjerenje količine selenoproteina-P se također koristilo za određivanje razine selenija, a postojala je mogućnost korištenja i nekih drugih enzima kao markera. Međutim, problem je nedostatak tehnika koje bi se tu koristile. Ipak, zaključci izvedeni mjerenjem jednog selenoproteina se ne mogu primijeniti na sve biološke funkcije selenija zbog razlika u odgovorima tkiva kod smanjenih, umjerenih i povećanih razina selenija. Situacija je puno kompliciranija kada djeluju još neki čimbenici kao što su neki proteini, metionin, polinezasićene masne kiseline i ostali oksidativni stresori, vitamin E, neki elementi u tragovima i teški metali poput žive, kadmija i olova [15].

2.11. Važnost selenija u stočnoj hrani

Utjecaj selenija je prvi put opažen kod stoke koja se hranila određenim biljkama u kojima je koncentracija selenija bila visoka. Tamo je uzrokovao alkalnu bolest. Kasnije je otkriveno kako je selenij u tragovima zapravo esencijalan za životinje. Kod štakora kojima je nedostajao vitamin E pokazano je da sprječava nekrozu jetre. Kod stoke i ovaca sprječava bolest bijelog mišića[2], a kod svinja bolest *hepatosis dietectica*[3]. Kod peradi sprječava eksudativnu dijalizu[4] [15].

Raspoloživost selenija u stočnoj hrani ovisi o njegovoj ukupnoj količini, kemijskom obliku u kojem se nalazi, stanju organizma, primjeni lijekova i dobnoj skupini. Budući da se koncentracije selenija u različitim tlima razlikuju, često postoji potreba da se selenij dodaje stočnoj hrani. Uglavnom se dodaje u anorganskom obliku, odnosno u obliku selenita i selenata. Kod korištenja anorganskog selenija treba usmjeriti pažnju na njegovu toksičnost, interakciju s ostalim mineralima te na prelazak u mlijeko, jaja i meso, ali i na mogućnost stvaranja rezervi selenija u organizmu. Količina selenija u različitim vrstama mesa i namirnicama varira. Primjerice, kod govedine ona iznosi 12,3 μg/100 g, a kod peradi 22,9 μg/100 g. Kod riba i u plodovima mora nađeno je da je količina selenija 45 μg/100 g, dok je za jaja bilo 40 μg/100 g, a za mlijeko samo 2,8 μg/100 g. Zbog ovako različitih količina selenija u pojedinim životinjama, postojala je potreba za dodavanjem selenija u stočnu hranu i to u obliku selenometionina. Za optimalne koncentracije selenija u stočnoj hrani prihvaćeno je 0,1-0,5 mg/kg u suhoj tvari. Do trovanja selenijem dolazi kada je njegova koncentracija 2-5 mg/kg. Kod kupnje, ali i konzumiranja mesa bitni su boja, tekstura i izgled. Jedan od načina očuvanja izgleda i kvalitete mesa je dodavanje antioksidansa kao što je selenij ili vitamin E. Antioksidansi se mogu dodati u stočnu hranu ili tijekom tehnološke obrade mesa [16].

Adler [17] je istraživala količinu selenija u različitim namirnicama. Analizirala je jetra, svinjski i juneći but te meso peradi. Zaključila je da su te namirnice bile bogate selenijem zbog stalnog dodavanja selenija u stočnu hranu. Isto tako, zaključila je da je svinjsko meso u Hrvatskoj puno siromašnije selenijem (u usporedbi s ostalim europskim zemljama). Najniža količina selenija bila je u junetini, zato što se u takvu stočnu hranu nije dodavao selenij. Selenij

[2] Bolest bijelog mišića javlja se zbog nedostatka selenija ili vitamina E, očituje se u rađanju slabih i ne-vitalnih janjaca, a može dovesti i do ugibanja.
[3] *Hepatosis dietectica* je bolest koja se javlja kod svinja zbog niskih razina selenija u organizmu. Posljedice ove bolesti su depresija, povraćanje i iznenadna smrt.
[4] Odignuće mrežice. Pojava gdje se mrežica odlijepi od temeljnog sloja potpornog tkiva.

se dodavao hrani za mliječna goveda i tu je ustanovljeno smanjenje broja somatskih stanica. Također, povećana je količina selenija u mlijeku [16].

Kako bi se otkrio pravi utjecaj selenija na životinje i njihove proizvode, provedeno je puno istraživanja u kojima se selenij dodavao u stočnu hranu. U jednom takvom istraživanju organski oblik selenija (selenometionin) dodavao se hrani za piliće i na kraju pokusa pilići koji su konzumirali takvu hranu imali su veću razinu selenija u mišićima od pilića iz kontrolne skupine. Razlog tome je taj što se selenometionin akumulirao u mišićima te je služio za sintezu selenoproteina. Takvo meso koje je obogaćeno selenijem korisno je za ljude, jer je selenij važan mikronutrijent [16].

U jednom istraživanju proučavao se utjecaj organskog u usporedbi s anorganskim oblikom selenija na koncentraciju selenija u kokošjim jajima. Bilo je već poznato da se koristio anorganski oblik selenija u obliku natrijevog selenita (engl. *sodium selenite*, SS), a kasnije je u upotrebu ušao organski selenij. To je selenijem obogaćen kvasac koji nastaje rastom *Saccharomyces cerevisiae*, odnosno pivskog kvasca (engl. Se-*enriched yeast*, SY), u mediju koji je bogat selenijem. Beilstein, Whanger, Kelly i Power [12] su otkrili da je selenij u tom kvascu većinom prisutan u obliku selenometionina (SM). Istraživanja su uspoređivala SS sa SM i SY. Ukupna koncentracija selenija u jajima rasla je dodatkom SS, SM i SY. Nadalje, koncentracija selenija u jajima je ipak najviše rasla dodatkom SM i SY [18].

Pokazalo se da kod nepreživača selenij u hrani utječe na to koliko će selenija biti prisutno u tkivima životinje. Tako je količina selenija u tkivu uvijek proporcionalna seleniju koji se unosio hranom. Međutim, ako selenij iz hrane potječe od natrijeva selenita, tada selenij u tkivu nije proporcionalan unesenom seleniju [19]. Većina selenija kojeg životinje unose dolazi od biljaka. Istraživanja su pokazala da otprilike pola oslobođenog selenija u pšenici koji je radioaktivan prelazi u selenometionin. Ostatak selenija se raspršiu neke druge spojeve [20]. Većina selenija u biljkama prisutna je u obliku selenometionina. No, u biljkama koje ga skladište, selenij se uglavnom nalazi u obliku aminokiselina koje se ne vežu za proteine. Takve su aminokiseline selenocistation i metilselenocistein [21]. Kod nepreživača, selenij u prehrani je većinom zastupljen u obliku selenometionina. Ova aminokiselina se ugrađuje u protein na način da tvori peptidnu vezu s pripadajućim proteinom ili zamjenom s metioninom koji se nalazi na tom proteinu. Kao dodatak prehrani, većinom se koristi anorganski oblik selenija. Selenit se može vezat za proteine, ali se ne uključuje u peptidnu vezu [22]. Za istraživanja raspodjele selenija u tkivima većinom se koristi jaje. Kada se u hranu kokoši dodaju prirodni izvori

selenija, tada je sadržaj selenija u bjelanjku jajeta jednak ili veći od onog u žumanjku. No, ako se u hranu dodaje selenit, tada je veća koncentracija selenija u žumanjku. Prije nastanka jajeta, u jajovodu prvo nastaje protein bjelanjka, pa tako bjelanjak jajeta utječe na promjenu razine selenija i to u jednom ili dva dana [23]. Nakon što u jetrima nastanu proteini žumanjka, jajašcu je potrebno oko deset dana za sazrijevanje i potreban je duži period prije nego li se razlika u koncentraciji selenija primijeti u žumanjku [24]. Različita prehrana kokoši utjecala je i na zadržavanje selenija u njima. Selenij se u kokošima najmanje zadržavao kada se nije dodavao ni u kojem obliku. Rezultati upućuju na to da se selenij najviše zadržavao kada se dodavao u obliku selenometionina. Zadržavanje selenija kod kokoši bilo je podjednako kada su se hranile hranom koja je obogaćena selenocisteinom i onom koja ima duplo više natrijeva selenita. U pokusu se proučio i utjecaj različitih vrsta prirodnog oblika selenija na jaje. Kod kokoši kojima se selenij dodavao iz biljke *Astragalus racemosus,* primijećena je veća koncentracija selenija u žumanjku jajeta nego u bjelanjku. To je slično kao kod hranjenja selenitom. Dalje, ako se kokoši hrane pšenicom koja je bogata selenijem, koncentracija selenija će biti veća u bjelanjku nego u žumanjku. Ovo istraživanje je pokazalo da jaje može biti vrlo korisno u proučavanju apsorpcije i metabolizma različitih spojeva selenija. Različiti spojevi selenija daju različite raspodjele selenija u organizmu, jer proteini bjelanjka jajeta nastaju u jajovodu, dok proteini žumanjka nastaju u jetrima [25].

Kao što je već rečeno, selenometionin se može zamijeniti s metioninom. Painter i Franke su otkrili sličnosti sumpornih i selenijevih spojeva u biljkama [26]. Ipak, metabolizam spojeva selenija nije identičan metabolizmu sumpornih spojeva. U pšenici je više od pola sumpora prisutno u obliku cisteina, a selenocistin i sulfoselenocistein još nisu pronađeni. U biljkama se metionin sintetizira iz cisteina. Ako se selenometion sintetizira iz selenocisteina, u reakciji mora nastajati selenometionin jer je selenocistein prisutan u malim količinama. Pilići su nepreživači te ne mogu sintetizirati aminokiseline selenija iz anorganskog selenija. Jednako tako ne mogu sintetizirat aminokiseline sumpora iz sumporovih spojeva. Ako se selenometionin dodaje prehranom, tada se takve aminokiseline mogu ugradit u protein. Tijekom ovog eksperimenta, više selenometionina se ugradilo u bjelanjak jajeta nego u žumanjak. S druge strane, više selenita se ugradilo u žumanjak nego u bjelanjak. Raspodjela selenija u jajetu je pokazala da se selenocistin i selenocistein ne ugrađuju u proteine peptidnom vezom. Aminokiseline selenija se metaboliziraju u selenit ili neke druge anorganske spojeve selenija i to možda oksidativnim putem koji se koristi kod cisteina i metionina. Samo mali dio selenija u tkivima životinja je prisutan u obliku selenocisteina, selenocistina i sulfoselenocistina [25].

2.12. Analitičke tehnike za određivanje selenija

U ovome ulomku će se opisati analitičke tehnike koje služe za detekciju, mjerenje i praćenje selenija, njegovih metabolita i ostalih biomarkera koji utječu na selenij. Cilj je otkriti uspješne metode koje će se koristiti kao standardne analitičke tehnike. Puno analitičkih tehnika koje su se koristile za analizu ekoloških uzoraka su odobrene od strane federalnih agencija i organizacija. Nadalje, nastoji se modificirati već postojeće metode s ciljem postizanja niže granice detekcije te veće točnosti i preciznosti [27].

2.12.1. Biološki uzorci

Kod uzorkovanja bioloških materijala u kojima se određuje ukupna koncentracija selenija obično nema poteškoća sve dok nema potrebe za identificiranjem nekih posebnih spojeva selenija. Jedan takav izuzetak je skupljanje i skladištenje uzoraka urina bez gubitka hlapivih spojeva selenija. Kod većine analiza bioloških uzoraka se krivo procijeni koncentracija takvih spojeva. Za mjerenje 24-satne koncentracije selenija u urinu najbolje je pohraniti ga u polietilenskom spremniku i to u kiselom mediju. Ako se razine selenija mjere odvojeno, uzorci krvi se mogu prije zamrzavanja razdvojiti na plazmu i krvne stanice. Zamrzavanje bioloških uzoraka odmah nakon skupljanja preporučuje se zbog smanjenja enzimskog stvaranja hlapivih spojeva selenija [27].

Postoje mnoge metode koje se mogu koristiti za određivanje selenija u tragovima (ng/g). To uključuje: fluorometriju, analizu aktivacije neutrona (NAA), atomsku apsorpcijsku spektroskopiju (AAS), atomsku emisijsku spektroskopiju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES), masenu spektrometriju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), plinsku kromatografiju (GC), spektrofotometriju, fluorescentnu analizu *x*-zrakama i ostale tehnike [27].

Klasična **plamena atomska apsorpcijska spektroskopija** nema dovoljno nisku granicu detekcije za selenij da bi se mogla koristiti za analizu bioloških uzoraka. Stoga se koristi **AAS s nastankom hidrida** (HGAAS). Ona se upotrebljava za određivanje selenija u uzorcima kao što su krv i dijelovi krvi te za meso, voće i povrće [27].

Atomska apsorpcijska spektroskopija s grafitnom peći (GFAAS) ima visoku osjetljivost. No, razni interferenti iz matriksa mogu uzrokovati poteškoće prilikom analize. Ključ ove metode leži u tome da spojevi metala reagiraju sa spojevima selenija kako bi nastali relativno stabilni metalni selenidi. Da bi se selenij učinio termički stabilnim, dodaju se nikal, molibden i platina. Prije atomizacije, organski spojevi se uništavaju na visokim temperaturama.

Prednost ove tehnike je ta što se tvar u grafitnoj ćeliji može kemijski tretirati *in situ* kako bi se smanjio broj interferenata. Ova tehnika zahtjeva i korekciju pozadinske apsorpcije. To se odvija pomoću deuterijeva kontinuiranog izvora svjetla i cijepanja Zeemanove apsorpcijske linije. Zeemanov efekt koji dovodi magnetsko polje atomizeru dopušta korekcije na točnim valnim duljinama analita, bez dodatnih izvora svjetlosti. Korekcije su nužne za određivanje selenija u krvi, jer su spektralne smetnje koje nastaju od iona željeza bliske valnoj duljini selenija, a to se ne može korigirati deuterijevim kontinuiranim izvorom svjetla [27].

Postoji i modificirani oblik GFAAS. U takvoj **elektrotermalnoj atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji** (EAAS) dodaju se dušična kiselina, nikal i platina u grafitnu ćeliju. Dodavanjem nikla maskiraju se smetnje koje su nastale fosfatom iz urina. EAAS se koristila i za određivanje razine selenija u ljudskoj spermatozoi. Za ljudsku krvnu plazmu i serum, granica detekcije ove metode iznosi 0,8 μg/L [27].

HGAAS omogućuje smanjenje kemijskih interferenata, ali zahtjeva veći volumen uzorka od GFAAS. HGAAS tehnika se koristila za određivanje selenija u hrani. Tu se koristi mokra digestija uzorka pomoću dušične i perklorne kiseline. Time se razaraju organske tvari. Prvo se Se (VI) prevodi u Se (IV), pa se koristi natrijev borhidird kako bi se reducirao ukupan selenij koji se nalazi u selenijevom hidridu. Zatim se selenijev hidrid termički raspada i atomizira atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom. Za digestiju se koriste dušična i perklorna kiselina. Umjesto perklorne kiseline može se koristiti fosforna kiselina, jer perklorna kiselina je eksplozivna. Za digestiju uzorka potrebno je koristiti temperaturu od najmanje 200 °C [27].

Za određivanje ukupne razine selenija u biološkim uzorcima koristi se **ICP-AES metoda s nastankom hlapivog hidrida**. Metoda je prilagođena za analizu malih uzoraka. Uzorci se prevode u pepeo mokrim putem, najčešće pomoću dušične, sumporne ili perklorne kiseline na temperaturi od 310 °C. Nakon tretiranja klorovodičnom kiselinom, selenij se reducira pomoću natrijeva borhidrida u vodikov selenid. To se odvija u jednostavnom kontinuiranom cjevovodu. Standardni pneumatski raspršivač utječe na plinsko-tekuće razdvajanje H_2Se, a kvantificira se pomoću ICP-AES pri 196,090 nm. Granica detekcije ove tehnike iznosi 0,4 μg/L [27].

Atomska fluorescentna spektrometrija s nastankom hidrida se koristi za mjerenje koncentracije selenija u urinu. Uzorak se potpuno mineralizira korištenjem fokusiranih

mikrovalova sa smjesom dušične i sumporne kiseline u vremenskom razdoblju od 14 minuta. Granice detekcije i kvantifikacije u ovoj metodi iznose 57 i 190 pg/L [27].

U **GLC kromatografiji** omogućeno je uklanjanje interferenata iz biološkog matriksa. Prvo je potrebno razložiti organske tvari dušičnom kiselinom. Ova tehnika zasniva se na mjerenju količine piazselenola koji nastaje reakcijom selenija (IV) s prikladnim reagensom u kiselom mediju. Za određivanje selenija pomoću detektora elektronskog zahvata, mogu se koristiti 1,2-diaminoareni kako bi nastao piazselenol. Ukoliko se koristi 1,2-diamino-3,5-dibromobenzen granica detekcije je $1 \cdot 10^{-9}$ g selenija po gramu uzorka [27].

Plinska kromatografija razrjeđivanjem izotopa u kombinacija s masenom spektrometrijom (IDGC/MS) je metoda koja ima veliku točnost, pa je pogodnija za korištenje od NAA tehnike. Ova metoda služi za određivanje selenija u: hrani, plazmi i serumu, crvenim krvnim stanicama, fekalijama, urinu i ljudskom mlijeku. Količina uzorka potrebnog za ovu analizu iznosi 0,5-10 g, odnosno 0,5-10 mL. Glavna karakteristika ove metode je ta što se selenij dodaje uzorku u obliku stabilnog izotopa i to prije digestije. To ne zahtijeva kvantitativnu pripremu uzorka niti vanjsku standardizaciju. Nedostatak ove metode leži u tome što su standardi određenih izotopa skupi [27].

NAA tehnike imaju nižu granicu detekcije za selenij i ona iznosi $1 \cdot 10^{-8} – 1 \cdot 10^{-9}$ g selenija/g uzorka. U ovoj metodi najčešće se proizvodi dugoživući radionuklid selenija: ^{75}Se. Njegova količina u uzorku se broji nakon 50-100 sati ozračenosti i to u razdoblju hlađenja od 2 do 10 tjedana. Brža metoda NAA je korištenje metastabilnog izotopa selenija: ^{77m}Se. Njegovo vrijeme poluživota je puno kraće od ^{75}Se, pa u tom slučaju brojenje može započeti nakon ozračivanja i hlađenja, čije je razdoblje kraće od jedne minute. Najuobičajeniji standardni referentni uzorak koji se koristi u NAA metodama je tkivo od goveđih jetara. Još neka tkiva koja se mogu analizirati ovom metodom su: kosti, kosa, bubreg, pluća, serum, krv, fekalije, urin, mozak, trbuh, koža, aorta, srce, testisi, hipofiza, zubna caklina, jezik, mišići, slezena i tiroidna žlijezda. Prednosti ove metode su niska granica detekcije i sposobnost detekcije više elemenata [27].

Za određivanje selenija u krvi, tkivima i kosi koriste se još neke metode. To su: spektrofotometrija, fluorimetrija, voltametrija i fluorescentna analiza *x*-zrakama. Od njih se najviše koriste fluorimetrijske metode. **Fluorimetrijske metode** se, u ovom slučaju, zasnivaju na nastanku heterocikličkih produkata Se-DAN ili Se-DAB u reakcijama Se(IV) s 2,3-diaminonaftalenom (DAN), odnosno 3,3-diaminobenzidinom (DAB). Fluorescencija koja

nastaje reakcijom piazselenola s DAN-om ima jači intezitet nego ona koja nastaje u doticaju piazselenola s DAB-om te se nastali kompleks može lako ekstrahirati u organska otapala iz kisele otopine. Ove metode zahtijevaju digestiju uzoraka kako bi se razorio organski dio te se selenij reducirao iz Se(VI) u Se(IV). Tijekom digestije uzorka moguć je gubitak hlapivih spojeva selenija. Napravljene su neke modifikacije u procesu digestije te se tako smanjila količina potrebnog uzorka, a mogu se mjeriti čak submikrogramske količine selenija [27].

U nekim istraživanjima uspoređivala se točnost triju metoda za određivanje selenija u biološkim uzorcima [28]. To su bile: kisela dekompozicijska fluorometrija, HGAAS i EAAS. Sve tri metode bile su jednako točne. Nadalje, uspoređivla se točnost AAS s grafitnom peći, Zeemnovim učinkom korekcije pozadine i masenom spektrometrijom razrjeđenjem izotopa [29]. Masena spektrometrija s razrjeđenjem izotopa bila je duplo preciznija od AAS sa Zeemanovim učinkom. Kod uspoređivanja HGAAS i GFAAS tijekom određivanja selenija u plazmi pokazano je da obje metode imaju jednake granice detekcije [30].

U posljednjih nekoliko godina, sve ove metode su se unaprijedile s ciljem postizanja veće točnosti i brzine. Tako se u digestiji bioloških uzoraka umjesto perklorne kiseline koristila fosforna kiselina, dušična kiselina i vodikov peroksid [31]. Zaključeno je da fosforna kiselina daje veću sigurnost i praktičnost kod određivanja selenija. Također se koristila modificirana mokra digestija za određivanje selenija u jajima i jetrima ptica [32]. Kako bi se povećala topivost uzorka koristio se vodikov peroksid. Da bi se trimetilselenijev ion potpuno oksidirao kod određivanja ukupne razine selenija u urinu, digestija se mora odvijati pomoću HNO_3 i $HClO_4$ [33].

2.12.2. Ekološki uzorci

Za određivanje selenija u tlu, vodi i zraku često se koriste iste metode kao i za određivanje selenija u biološki uzorcima. Međutim, ipak treba paziti pri skupljanju i pohrani takvih uzoraka kako ne bi došlo do gubitka hlapivih spojeva selenija. Prije mjerenja razine selenija često je potrebno razoriti organske tvari. Da bi se sačuvali spojevi selenija u vodenim uzorcima, potrebno je zakiseliti otopinu do pH 1,5. Za to se može koristiti dušična kiselina. Vodene uzorke selenija najbolje je pohraniti u staklenom spremniku na temperaturi od 4 °C [27].

Kod određivanja selenija u ekološkim uzorcima, analitičke metode se mogu podijeliti u dvije skupine: one u kojima nije potrebno razaranje organskih tvari i one u kojima je potrebno

eliminirati interferente. U metode kod kojih nije potrebno razaranje organske tvari ubrajaju se: fluorescencija *x*-zrakama te neke analize koje se temelje na aktivaciji neutrona. S druge strane, spektrofotometrija, plinska kromatografija, atomska asporpcijska spektrometrija, polarografija, titracija, masena spektrometrija, fluorometrija i neke analize koje se temelje na aktivaciji neutrona zahtijevaju određena razaranja uzorka. Metode koje se najviše koriste za određivanje selenija u ekološkim uzorcima su: fluorimetrija, atomska apsorpcijska spektrometrija i analize koje se temelje na aktivaciji neutrona [27].

Za mjerenje razine selenija često se koristi **emisija induktivno spregnutom plazmom**. Ova metoda pruža mogućnost mjerenja više elemenata, ali je skupa i može se pojaviti problem interferencije pozadine. Za mjerenje selenija u zraku koristi se emisija induktivno spregnutom plazmom s argonom [27].

AAS s nastankom hidrida je puno osjetljivija od AAS s grafitnom peći kod određivanja selenija u uzorcima koji imaju varijabilni sastav. Vodeni uzorci kao što su: svježa, riječna, morska i površinska voda te otpadne vode, mulj, sedimenti i uzorci tla analiziraju se AAS metodom i na taj način se određuje količina selenija u ppt-ima. Se(VI) je moguće razlikovati od Se(IV) u vodenim otopinama GFAAS metodom pomoću selektivne ekstrakcije. Moguće ih je odvojiti i HGAAS metodom, jer Se(VI) ne može tvoriti hidride dok se ne reducira. Razina Se(VI) se računa na način da se oduzme količina Se(IV) od ukupne količine selenija u uzorku [27].

Kod korištenja **ne destruktivne NAA metode**, granica detekcije selenija u uzorcima zraka iznosi $1 \cdot 10^{-10}$ g/m^3. Ova metoda se može koristiti i za određivanje selenija u vodi ili tlu te također postoji mogućnost razlikovanja Se(VI) od Se(IV) [27].

Kod korištenja **plinsko-tekućinske kromatografije** moguće je izdvojiti interferente. Za mjerenje s detektorom elektronskog zahvata selenij se prevodi u oblik piazselenola [27].

Veliki značaj ima otkriće **plinsko-tekućinske kromatografije s nastankom hidrida i fotoionizirajućom detekcijom**. Ovdje se istovremeno koriste fotoionizacijski detektor i hladna zamka te se na taj način granica detekcije pomiče za sto puta u odnosu na običnu plinsko-tekućinsku kromatografiju. Granica detekcije za ovu metodu iznosi $1 \cdot 10^{-12}$ g selenija/mL za 28 mL uzorka. Prednost metode je ta što se mogu istovremeno odrediti 4 nastala hidrida različitih elemenata [27].

2.13. Metode za određivanje biomarkera

Pokušaj mjerenja glutation peroksidazne aktivnosti u krvi kao indikatora ljudske izloženosti seleniju nije bio uspješan. Grješke nastaju ukoliko se aktivnost glutation peroksidaze koja ovisi o seleniju ne razlikuje od one koja ne ovisi. Također, ukupna koncentracija selenija u krvi i aktivnost glutation peroksidaze su međusobno ovisni samo kada je razina selenija u krvi manja od 0,100 mg selenija/L uzorka. Aktivnost gluatation peroksidaze koja se mjerila u trombocitima ukazuje na izloženost selenija u krvi ako je koncentracija selenija niska. To znači, ako netko tko ima malu koncentraciju selenija u krvi, uzme selenij kao dodatak tada će se aktivnost glutation peroksidaze promijeniti. Još nema poznatih i osjetljivih markera za proučavanje učinka selenija. Zbog toga još uvijek nema posebnih analitičkih metoda kojima bi se pratili takvi biomarkeri selenija [27].

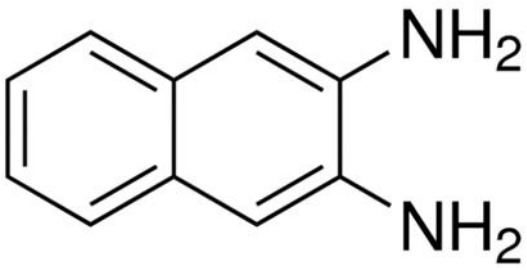
2.14. Metode za određivanje polaznih spojeva i degradacijskih produkata u ekološkom mediju

Za određivanje selenija u ekološkim uzorcima dostupno je puno metoda. No, većina njih ne razlikuje različite spojeve selenija. Puno metoda može detektirati selenij u nanogramskim količinama. Najčešće korištene tehnike su fluorometrija, kromatografija i spektrometrija. Kod analize više elemenata ili analize kompleksnih matriksa potrebno je koristiti puno sofisticiranije metode. Pomoću NAA metode moguće je detektirati razine selenija u zraku niže od 1 ng/m^3. Za razlikovanje anorganskih oblika selenija u uzorcima iz okoliša postoji nekoliko metoda. Primjerice, za razlikovanje Se(VI) od Se(IV) koriste se metode kao što su: HGAS, INAA i GFAAS. Nedostaju metode za određivanje selenijeva sulfida [27].

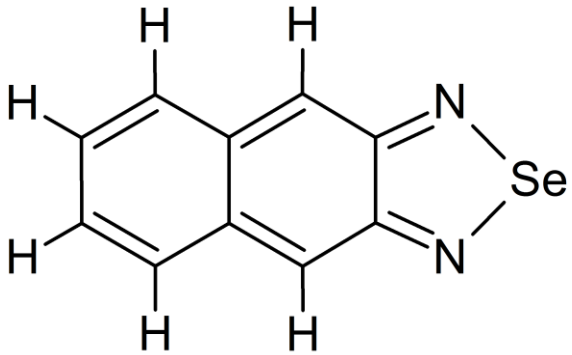
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Određivanje selenija u ovome radu

U ovome radu selenij je određivan u uzorku suplemenata. Koncentracija selenija je određena pomoću fluorescencije. Budući da selenij ne može fluorescirati, potrebno je vezanje na marker koji fluorescira. Zbog toga je kao marker za praćenje selenija korišten 2,3-diaminonaftalen (DAN) s kojim selenij tvoriti kompleks nazvan piazselenol, pa je moguće pratiti i odrediti selenij u uzorku. DAN (Slika 6.) je jako osjetljiv na svjetlo, pa ga je potrebno čuvati u tamnoj bočici, a reakcije izvoditi što je više moguće u mraku. Optimalan pH prije dodatka DAN-a, odnosno pH pri kojem se kompleks (Slika 7.) stvara je 3 [36].



Slika 6. *Struktura 2,3-diaminonaftalena* [34].



Slika 7. *Struktura piazselenola, kompleksa selenija s 2,3-diaminonaftalenom* [35].

Koncentracija selenija, odnosno intenzitet fluorescencije kompleksa mjeren je fluorimetrom. Puni naziv uređaja je modularni čitač mikrotitar pločica (Slika 8.). Kao izvor svjetla kod mjerenja fluorescencije korištena je ksenonska lampa visoke energije (eng. *Xenon*

flash lamp), a detektor je sa fotomultiplikacijskim cijevima (eng. *PMT enhanced*). Raspon spektra za ekscitaciju iznosi 230-90 nm, a za emisiju 280-900 nm. Mjerenja su provedena u pločicama s jažicama (mikrotitar pločice), uz miješanje u uređaju. Granica detekcije uređaja je < 1 ng/µL, a mjerenje traje oko 2 minute. Uređaj ima mogućnost automatizacije.

Slika 8. *Modularni čitač mikrotitar pločica.*

3.2. Instrumenti i kemikalije

U izradi eksperimentalnog dijela ovog rada koristile su se kemikalije:

- standardna otopina selenija koncentracije 0,001 g/L
- otopina kompleksa EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$
- metiloranž
- otopina amonijaka (25%)
- otopina klorovodične kiseline (1 M)
- otopina 2,3-diaminonaftalena (DAN)
- univerzalni indikatorski papir
- cikloheksan
- heptan
- smjesa heptana i butil-acetata (V(heptana) = 97 mL, V(butil-acetata) = 3 mL)
- koncentrirana dušična kiselina
- koncentrirana perklorna kiselina
- koncentrirana sumporna kiselina
- koncentrirana klorovodična kiselina
- realni uzorak selenija poznate koncentracije (suplementi u obliku tableta)
- destilirana voda
- ultra čista voda.

Tijekom eksperimenata koristila se slijedeća instrumentacija:

- analitička vaga
- pipeta za doziranje (10-100 µL)
- pipeta za doziranje (100-1000 µL)
- pipeta za doziranje (5 mL)
- uljna kupelj
- termometar
- vijalice
- tikvice s okruglim dnom
- zračno hladilo
- vodeno hladilo
- lijevak za odjeljivanje
- odmjerne tikvice

- lijevak
- magnetić za miješanje
- kapalice
- pločice s jažicama
- folija
- modularni čitač mikrotitar pločica (Instrument Spark 10 M) uz pripadajući program Spark kontrol.

3.3. Priprema otopina

3.3.1. Priprema standardne otopine selenija

1 gram krutog selenija otopi se u 3-5 mL koncentrirane dušične kiseline. Sadržaj se prelije u tamnu tikvicu od jedne litre i nadopuni se ultra čistom vodom do oznake. U takvoj otopini koncentracija selenija iznosi 1 g/L. Međutim, kako koncentracija otopine selenija koja je potrebna za kalibraciju iznosi 0,001 g/L ova otopina se razrijedi.

3.3.2. Priprema otopine EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$

Odvaže se 1 gram EDTA i 2,5 grama $HONH_2 \cdot HCl$ te se otopi u ultra čistoj vodi. Kada se sadržaj potpuno otopi nadopuni se do 100 mL.

3.3.3. Priprema otopine 2,3-diaminonaftalena (DAN)

Tijekom priprave ove otopine potrebno je raditi u polumraku, jer je DAN osjetljiv na svjetlo i raspada se. Odvaže se 0,05 grama DAN-a i otopi se u 50 mL klorovodične kiseline, koncentracije 0,1 M. Otapanje se odvija uz grijanje na temperaturi od 50 °C. Kada se cijeli DAN otopi i otopina se ohladi, tada se prebaci u lijevak za odjeljivanje. Otopina se ekstrahira tri puta s po 10 mL cikloheksana kako bi se uklonile nečistoće. Tijekom ekstrakcije cikloheksanski sloj je gore, stoga se skuplja donji dio u kojemu je DAN, a cikloheksanski sloj koji je pun nečistoća se baca.

3.3.4. Priprema 1 M otopine klorovodične kiseline

W(HCl)= 37%

ρ (HCl)= 1,18 g/cm^3

$$c_1(HCl) = \frac{w \cdot \rho}{M(HCl)} = \frac{0{,}37 \cdot 1{,}18\ g/mL}{36{,}46\ g/mol} = 0{,}01197 \frac{mol}{mL} = 11{,}97\ mol/L$$

$$V_1(HCl) = \frac{c_2(HCl) \cdot V_2(HCl)}{c_1(HCl)} = \frac{1\frac{mol}{L} \cdot 100mL}{11{,}97\ mol/L} = 8{,}35\ mL$$

Otopina klorovodične kiseline (1 M) pripremi se na način da se uzme 8,35 mL koncentrirane klorovodične kiseline te se nadopuni destiliranom vodom do oznake (100 mL).

3.3.5. Priprema 0,1M otopine HCl

$$V_1(HCl) = \frac{c_2(HCl) \cdot V_2(HCl)}{c_1(HCl)} = \frac{0{,}1\frac{mol}{L} \cdot 50mL}{11{,}97\ mol/L} = 0{,}4177\ mL$$

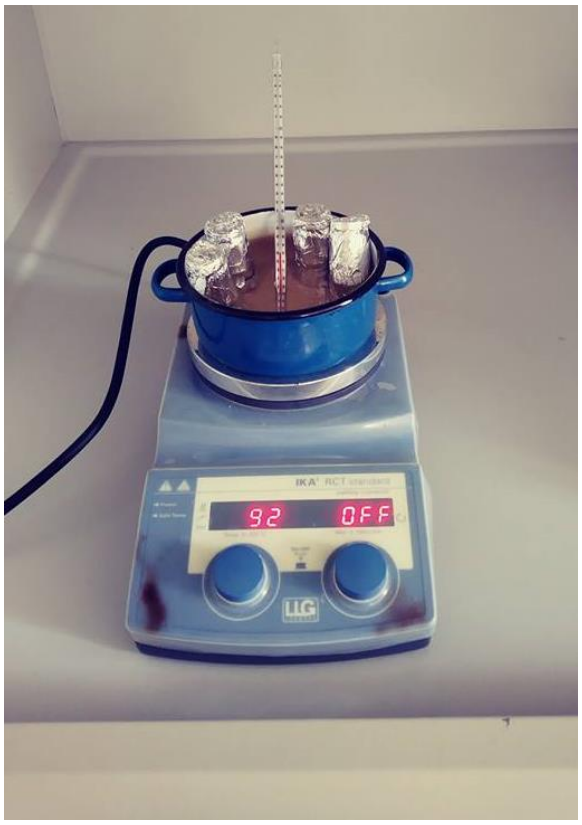
Otopina klorovodične kiseline (0,1 M) pripremi se na način da se uzme 0,4177 mL koncentrirane klorovodične kiseline i nadopuni se destiliranom vodom do oznake (50 mL).

3.4. Kalibracija sa standardnim otopinama selenija

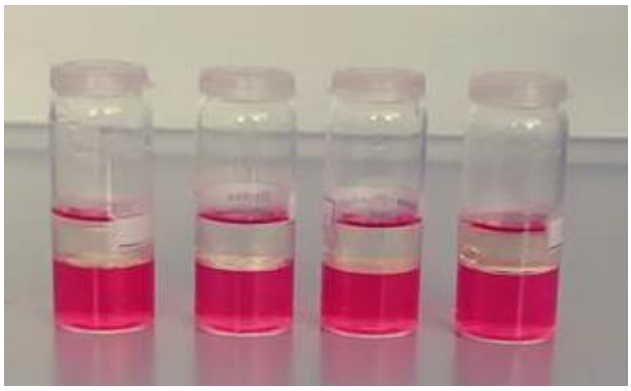
Kalibracija sa standardnim otopinama selenija izvela se nekoliko puta i to s tri različita otapala. To su: cikloheksan, heptan i smjesa heptana s 3% butil acetata.

U vijalicu se stavi 500 µL standardne otopine selenija (c = 0,001 g/L) i 1 mL EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$ otopine. U to se doda jedna kap metiloranža te se može vidjeti narančasto obojenje. Nakon toga dodaje se kap po kap amonijaka (25%) do pojave žute boje (Slika 9.), pa kap po kap klorovodične kiseline (c = 1 M) do pojave ružičastog obojenja (Slika 9.). Nakon zakiseljavanja, pH bi trebao biti oko 3, a to se može provjeriti univerzalnim indikatorskim papirom. Nakon podešavanja pH dodaje se 5 mL DAN-a. Od toga trenutka treba raditi brzo i u, što više mogućem, mraku jer je ovaj spoj osjetljiv na svijetlo i raspada se te bi samim time moglo doći do dobivanja krivih rezultata o koncentraciji selenija. Nakon dodavanja DAN-a, vijalica se stavi na vorteks oko 30 sekundi, omota se folijom i stavi na vodenu kupelj te se grije na 60 °C idućih dvadeset minuta (Slika 10.). Potom se izvadi i ohladi pod mlazom hladne vode, pa se u nju stavi 5 mL otapala (cikloheksan, heptan ili smjesa heptana s butil-acetatom). Vorteksira se 60-90 sekundi kako bi se kompleks ekstrahirao u otapalo i ostavi se da se slojevi odijele (Slika 11.). Kompleks selenija se nalazi u gornjem, prozirnom sloju stoga se iz tog sloja pažljivo odpipetira određeni volumen (Tablica 1.) i stavlja u pločicu s jažicama (Slika 12.) zajedno sa otapalom. Svaka jažica ima volumen od 340 µL. Preferira se stavljati prvo otapalo u pločicu, pa tek onda uzorak kako ne bi došlo do gubitka uzorka koji bi mogao zaostati na stjenkama pločice. Nakon toga uzorak je spreman za mjerenje fluorescencije. Pločica se poklopi kako ne bi došlo do isparavanja otapala, te se stavi u uređaj (modularni čitač mikrotitar pločica). Odabere se program i uvjeti u kojima se želi mjeriti fluorescencija. Temperatura u uređaju iznosi 25 °C, a valne duljine pri kojima se odvijaju ekscitacija i emisija iznose 382 nm i 522 nm. Prije samoga mjerenja, uređaj linearno promiješa uzorke.

Slika 9. *Otopine selenija nakon dodatka amonijaka (žuto) i klorovodične kiseline (ružičasto).*



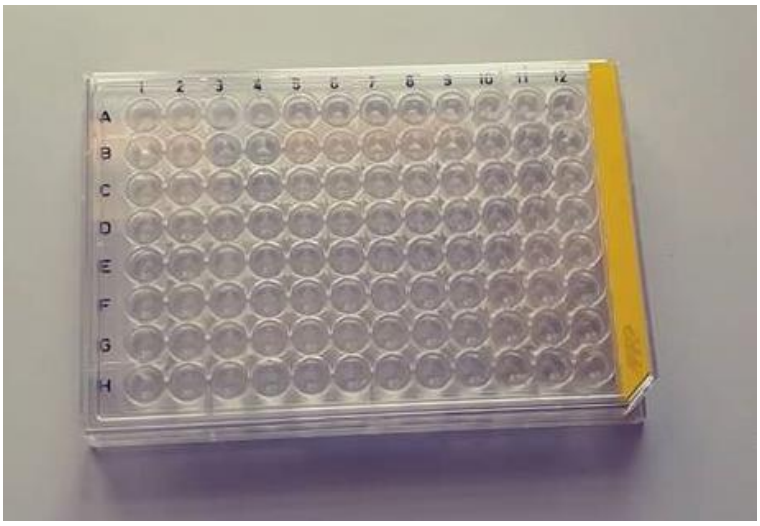
Slika 10. *Prikaz grijanja otopine selenija s DAN-om uz stvaranje Se-DAN kompleksa. Vijalica se zaštitila folijom, kako bi se izbjegao doticaj svjetla s kompleksom.*



Slika 11. *Izgled otopine nakon dodavanja otapala. U gornjem, prozirnom sloju nalazi se Se-DAN kompleks, pa se on oprezno odpipetira u pločicu.*

Tablica 1. *Prikaz dodanih volumena otapala i otopine u kojoj je kompleks selenija.*

c (Se za kalibraciju) / ng/mL	*V (Se nakon postupka) / µL*	*V (otapala) / µL*
0	***0***	***300***
10	***30***	***270***
20	***60***	***240***
30	***90***	***210***
40	***120***	***180***
50	***150***	***150***
60	***180***	***120***
70	***210***	***90***



Slika 12. *Pločica s jažicama u koju se stavljaju uzorak i otapalo te se stavlja u uređaj za mjerenje fluorescencije.*

3.5. Mjerenje koncentracije selenija u realnim uzorcima

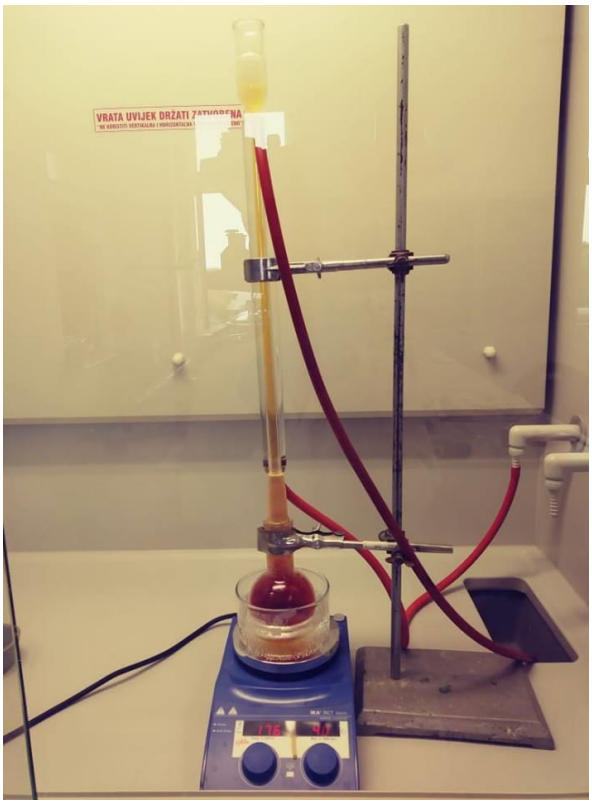
Kao realni uzorci korištene su tablete selenija koje se koriste kao suplementi. Masa jedne tablete iznosila je u prosjeku 0,45929 g. Provelo se nekoliko mjerenja na različite načine.

1. serija mjerenja (digestija uz reduktor)

U prvoj seriji mjerenja izvagalo se masu tablete selenija od 0,45929 g te se sadržaj stavio u okruglu tikvicu. Dodalo se 2 mL koncentrirane dušične kiseline, 0,5 mL koncentrirane perklorne kiseline i magnetić za miješanje. Tikvicu se stavilo u uljnu kupelj i zagrijavalo. Postupak digestije provodilo se bez hladila, samo uz reduktor. Temperatura kupelji bila je konstantna i iznosila je 110-120 °C. Broj okretaja na miješalici iznosio je 1500. Tijekom digestije, između ostalih interferenata, izlazile su pare dušikovih oksida, a to se moglo vidjeti po smeđoj boji. Za vrijeme digestije treba paziti da ne bi došlo do gubitka selenija u obliku hlapljivih spojeva, a to je osobito moguće ukoliko dođe do pougljenjivanja [36]. Završetak digestije označio je prestanak pojavljivanja smeđih para, nakon čega su pare bile žućkaste. Sama digestija trajala je dva sata. Preostali sadržaj u tikvici iznosio je 2,8 mL. To se razrijedilo ultra čistom vodom do 100 mL te je uzeto 500 μL, za daljnju analizu, čiji je postupak isti kao i kod kalibracije otopine selenija. Kao otapala koristili su se cikloheksan i heptan.

2. serija mjerenja (digestija uz vodeno hladilo)

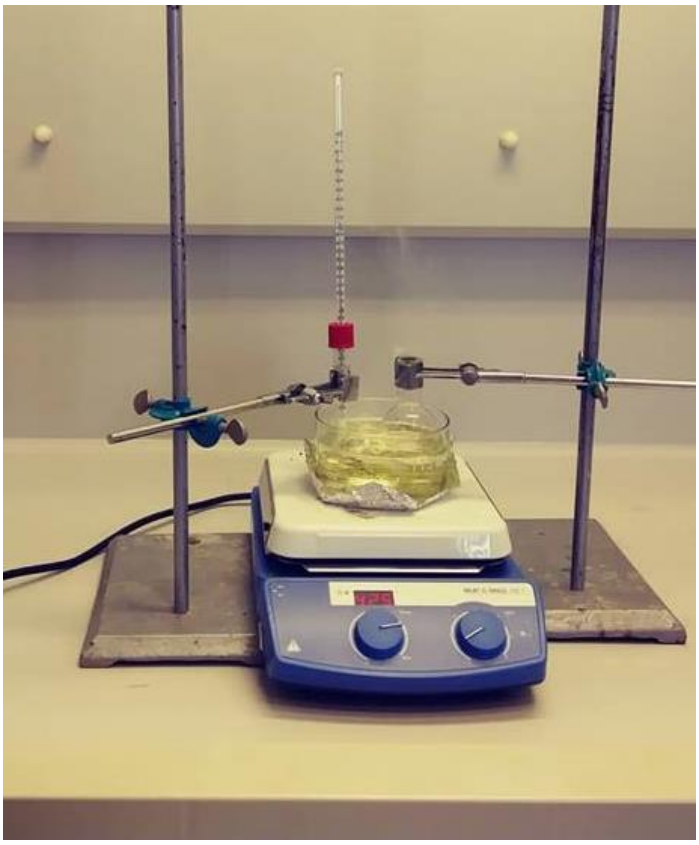
U slijedećim mjerenjima izvagalo se opet masu tablete od 0,45929 g i stavilo u okruglu tikvicu zajedno s magnetićem. Dodalo se 2 mL koncentrirane dušične kiseline i 0,5 mL koncentrirane perklorne kiseline. Ovaj put digestija se provela s vodenim hladilom (Slika 13.), a smjesu se zagrijavalo opet u uljnoj kupelji. Temperatura kupelji iznosila je 125 °C, a broj okretaja na miješalici bio je namješten na 1500. Digestija je trajala 5 sati, a u jednom trenutku se i temperatura naglo povisila, pa opet snizila. To se vjerojatno dogodilo zbog nagle promijene reakcijske smjese. Na kraju digestije tikvica je iznutra bila narančasto-smeđa. Ostatak smjese se razrijedio, a postupak analize se proveo uz tri otapala: cikloheksan, heptan i smjesu heptana s butil-acetatom.



Slika 13. *Prikaz digestije uzorka tablete selenija poznate koncentracije.*

3. serija mjerenja (digestija bez hladila i reduktora, na 200 °C)

U posljednjoj seriji mjerenja izvagalo se ponovno 0,45929 g tablete selenija te ga se stavilo u okruglu tikvicu. U nju je dodano 5 mL koncentrirane dušične kiseline, 1 mL koncentrirane sulfatne kiseline i 1 mL koncentrirane perklorne kiseline. Tikvicu se stavilo u uljnu kupelj i grijalo na temperaturnom rasponu 180-200 °C (Slika 14.). Već nakon desetak minuta smjesa je postala žućkaste, a zatim narančasto-smeđe boje. Kada su dušikovi spojevi izašli, smjesa se razbistrila. Nakon 40 minuta grijanja smjesa je počela presušivati, pa se dodalo još 2,5 mL koncentrirane dušične kiseline, 0,5 mL koncentrirane sulfatne kiseline i 0,5 mL koncentrirane perklorne kiseline. Smjesu se nastavilo zagrijavati. Nakon dva sata grijanja, snizilo se temperaturu do 110 °C i dodalo još 1 mL koncentrirane klorovodične kiseline. Smjesu se grijalo još 15 minuta te se potom ostavilo da se hladi. Nakon hlađenja, smjesu se razrijedilo i analiziralo uz cikloheksan, heptan i smjesu heptana s butil-acetatom.



Slika 14. *Digestija tablete selenija.*

4. REZULTATI I RASPRAVA

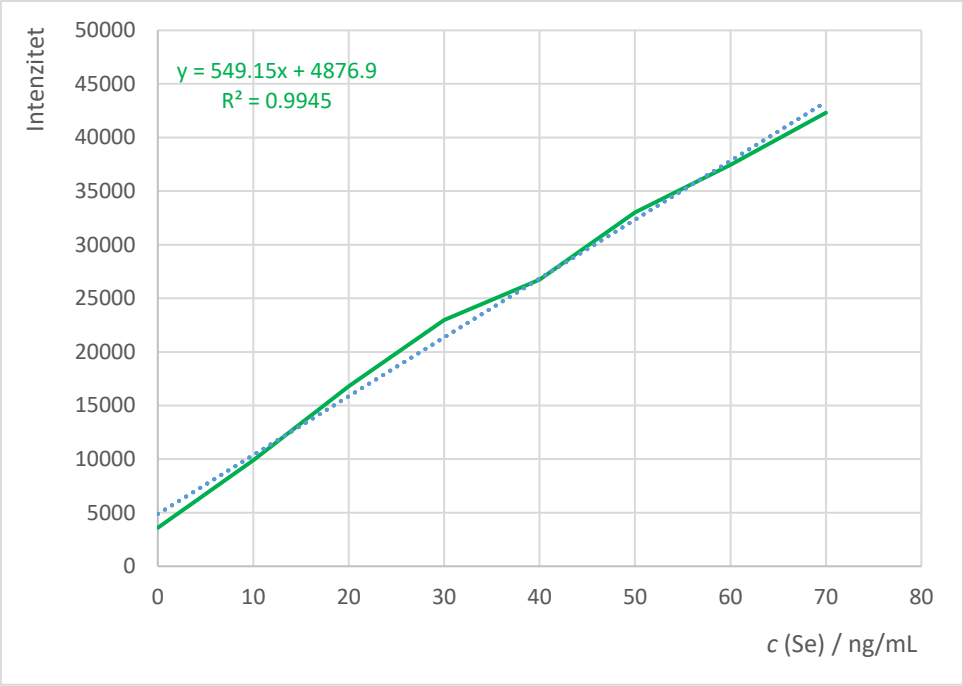
4.1. Kalibracija sa standardnim otopinama selenija

Kalibracije sa standardnim otopinama selenija provedene su uz tri otapala, kako bi se usporedilo u kojem otapalu se kompleks Se-DAN najbolje ekstrahira. Za nastanak kompleksa Se-DAN optimalan pH iznosi 3 [36]. Tijekom eksperimenta dodaje se kompleks EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$ kako bi se uklonili mogući interferenti. Klorovodična kiselina se dodaje zato što reducira selenij iz Se^{6+} u Se^{4+}, a to je važno zato što samo Se^{4+} može reagirati s DAN-om tvoreći kompleks.

Prva su mjerenja provedena na način da su se standardne otopine selenija određivale pomoću cikloheksana. U tablici 2. prikazani su rezultati mjerenja. Na slici 15. prikazana je dobivena kalibracijska krivulja te se vidi da je koeficijent korelacije dosta dobar, a i nagib je zadovoljavajući. Cilj je imati što veći nagib kako bi male promijene u koncentraciji uzrokovale veće promjene intenziteta fluorescencije.

Tablica 2. *Prikaz dobivenih vrijednosti signala za otopinu standarda selenija sa cikloheksanom kao otapalom.*

c (Se) / ng/mL	*Intenzitet signala*
0	***3591***
10	***9885***
20	***16800***
30	***22975***
40	***26750***
50	***33019***
60	***37444***
70	***42314***

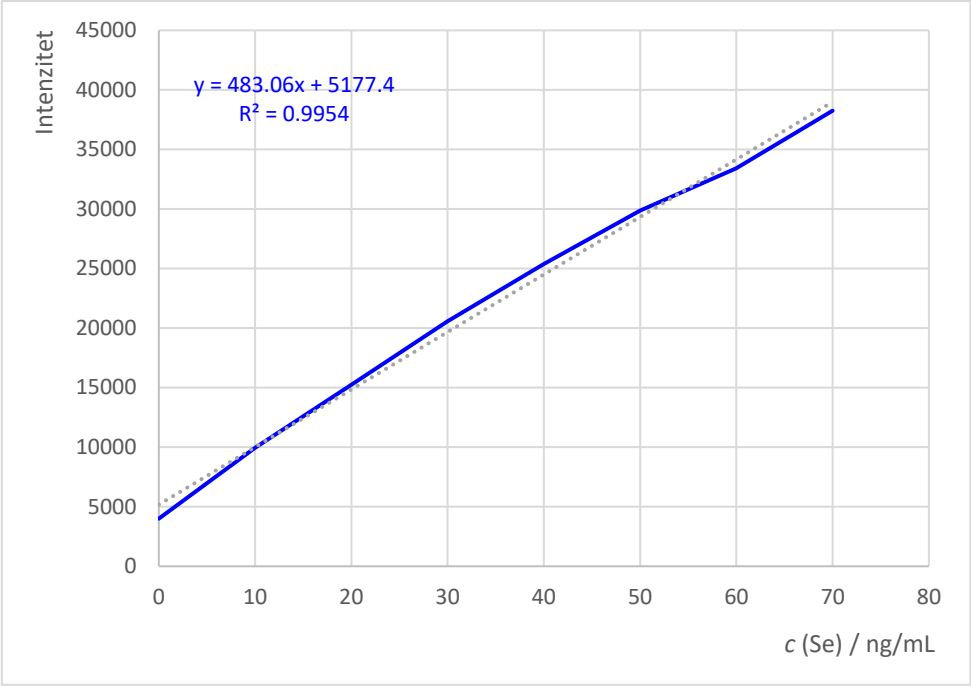


Slika 15. *Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN ekstrahiranom u cikloheksanu.*

Slijedeće kalibracije provedene su uz heptan kao otapalo. Rezultati se mogu vidjeti u tablici 3. i na slici 16. Pravac je gotovo idealan, kao i koeficijent korelacije. Nagib je također dosta dobar pa se za heptan može reći da bi bio pogodno otapalo za analizu selenija.

Tablica 3. *Prikaz dobivenih vrijednosti signala za otopinu standarda selenija sa heptanom kao otapalom.*

c (Se) / ng/mL	*Intenzitet signala*
0	***3999***
10	***9942***
20	***15251***
30	***20576***
40	***25379***
50	***29865***
60	***33410***
70	***38254***

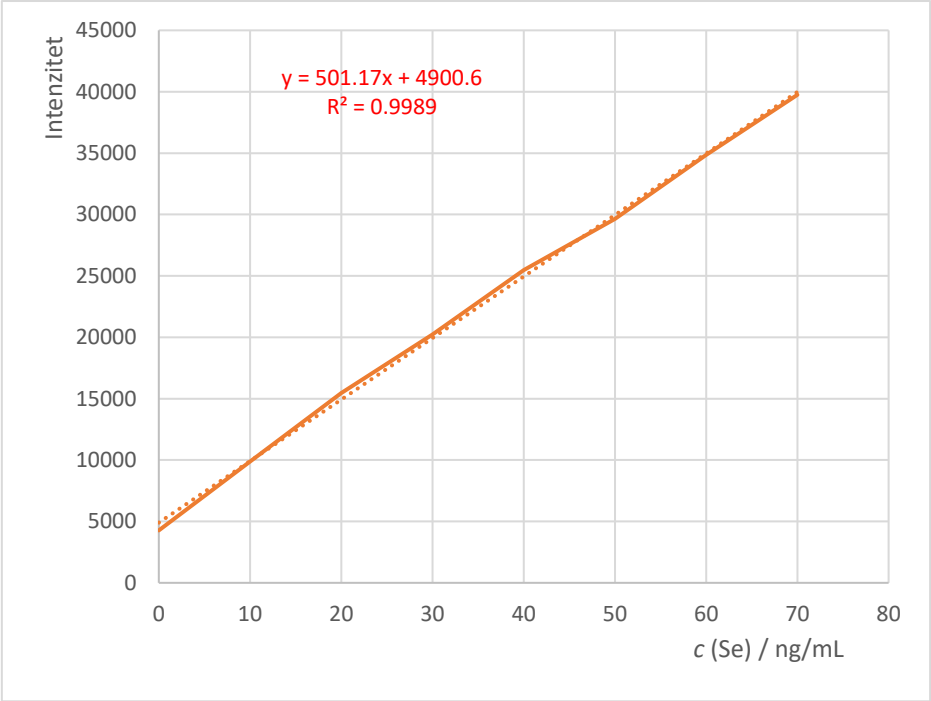


Slika 16. *Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN ekstrahiranom u heptanu.*

Posljednja kalibracija odvila se uz smjesu heptana i butil-acetata (3%) kao otapalo. Rezultati su prikazani u tablici 4. i na slici 17. Iz grafa se vidi da je pravac skoro potpuno linearan, što je odlično za očitavanje različitih koncentracija selenija. Koeficijent korelacije je izvrstan, kao i nagib.

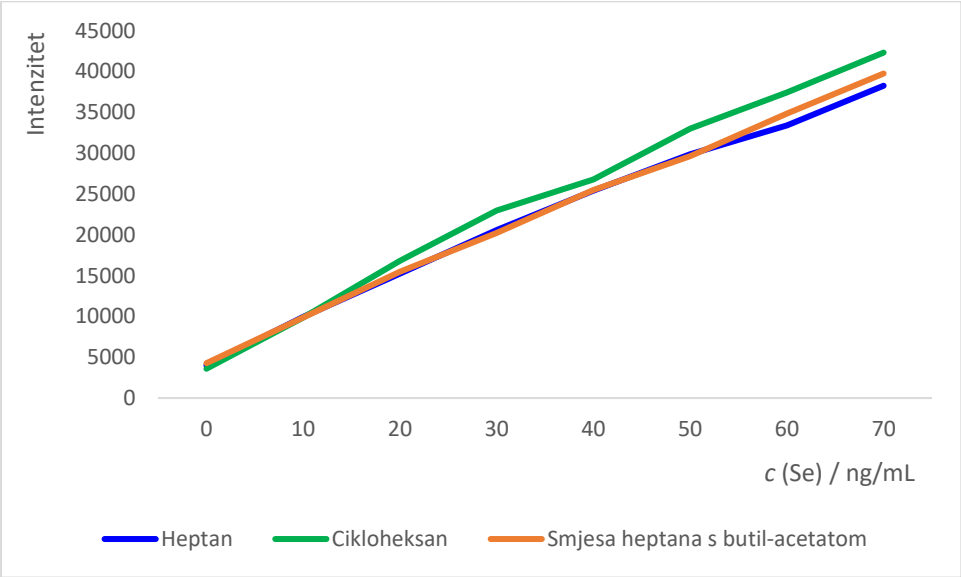
Tablica 4. *Prikaz dobivenih vrijednosti signala za otopinu standarda selenija sa smjesom heptana i butil-acetata (3%) kao otapalom.*

c (Se) / ng/mL	*Intenzitet signala*
0	***4269***
10	***9878***
20	***15460***
30	***20227***
40	***25463***
50	***29638***
60	***34849***
70	***39749***



Slika 17. *Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN ekstrahiranom u smjesi heptana s butil-acetatom.*

Na slici 18. prikazana je usporedba sva tri otapala koja su korištena pri kalibraciji sa standardnim otopinama selenija. Može se vidjeti da kalibracijski pravac dobiven nakon ekstrakcije kompleksa u cikloheksanu ima nešto veći nagib od ostala dva otapala.



Slika 18. *Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN ekstrahiranom u cikloheksanu, heptau i smjesi heptana s butil-acetatom.*

4.2. Mjerenje koncentracije selenija u realnim uzorcima

Nakon kalibracije sa standardnim otopinama selenija može se početi mjeriti realne uzorke koji sadrže selenij. Budući da su u suplementima poznate koncentracije selenija, ovim mjerenjima je ustanovljeno koliko je metoda s određenim otapalima i uz određenu digestiju pouzdana za određivanje koncentracije selenija u takvim uzorcima.

1. serija mjerenja (digestija uz reduktor)

Prva mjerenja u kojima se mjerio selenij u tabletama provela su se uz cikloheksan i heptan kao otapala. Rezultati mjerenja prikazani su u tablicama 5. i 6. Deklarirano je da je masa selenija u tableti 100 µg. Nakon digestije uzorak se razrijedio do 100 mL. Budući da se za analizu uzima samo dio tog ostatka, odnosno alikvot od 0,5 mL, masa selenija koji je podvrgnut analizi iznosi 0,5 µg. Potrebno je napomenuti da kod pipetiranja uzoraka treba prvo stavljati otapalo u jažice, a tek onda uzorak iz razloga što bi se dio uzorka mogao zadržati na stjenkama jažica te bi se dobili krivi rezultati.

Tablica 5. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije uz reduktor, uz korištenje cikloheksana kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
60	7550	21,6638
60	7844	23,8593
60	8063	25,4947
90	9187	22,5923
90	9597	24,6335
90	9882	26,0523
120	9746	19,0314
120	10875	23,2470
120	11219	24,5314
150	12129	22,3434
150	11893	21,6384
150	12975	24,8704
180	13170	21,2108
180	13084	20,9967
180	13879	22,9756
210	14937	21,9508
210	13800	19,5248
210	14649	21,3363

Tablica 6. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije uz reduktor, uz korištenje heptana kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
60	7671	16,2209
60	7867	17,7334
60	7872	17,7720
90	10033	22,9654
90	10012	22,8574
90	10019	22,8934
120	11697	23,6445
120	12116	25,2612
120	12062	25,0529
150	13891	25,6880
150	13924	25,7898
150	14049	26,1757
180	16408	27,8811
180	16456	28,0046
180	16305	27,6162
210	18623	28,7818
210	18347	28,1732
210	18397	28,2835

U tablicama 5. i 6. prikazani su rezultati određivanja selenija u uzorku. U prvom stupcu prikazani su volumeni uzoraka selenija nakon digestije i razrjeđivanja koji su se pipetirali u jažice. Svaki volumen otopine selenija pipetirao se i mjerio tri puta. Drugi stupac prikazuje vrijednosti signala koje su se dobile za svaki volumen uzorka. U trećem stupcu su vrijednosti mase selenija u tableti. Prosječna vrijednost koja se dobila tijekom mjerenja s cikloheksanom za masu selenija u uzorku tablete iznosi 22,6641 µg dok je ta vrijednost za heptan 24,4486 µg. Kako je stvarna vrijednost mase selenija u uzorku tablete koji se analizirao 100 µg potrebno je izračunati postotak greške. Njega se izračunalo na način da se od prosječne eksperimentalne vrijednosti mase selenija u uzorku oduzme teorijska (stvarna vrijednost) selenija u uzorku te se apsolutna vrijednost tog rezultata podijeli sa teorijskom vrijednosti selenija u uzorku. Dobiveni rezultat pomnoži se sa 100%. On iznosi 77,34% za mjerenje sa cikloheksanom i 75,55% za mjerenje sa heptanom. Ovi rezultati sumirani su u tablici 7. Iz tih rezultata se vidi da je greška velika, što znači da ovaj način digestije uz ova otapala nije pogodan za mjerenje selenija. Vjerojatno se jedan dio selenija izgubio tijekom digestije u obliku hlapljivih spojeva. Takav spoj je selenijev (IV) klorid koji sublimira pri temperaturi od 180 °C [37]. Gubitak selenija je moguć i preko selenijevih oksihalogenida. Takav spoj je selenijev oksiklorid koji ima vrelište pri temperaturi od 176,4 °C [37]. Još jedan spoj preko kojeg se može izgubiti selenij je selenijev (IV) oksid, jer on lako sublimira [37].

Tablica 7. *Rezultati određivanja selenija u tableti dobiveni nakon digestije uz reduktor, uz korištenje različitih otapala.*

Otapalo	*m (Se) / µg*	*% greške*
cikloheksan	***22,6641***	***77,34***
heptan	***24,4486***	***75,55***

<u>2. serija mjerenja (digestija uz vodeno hladilo)</u>

Druga serija mjerenja provela se na isti način, ali uz vodeno hladilo. Razoreni uzorak analizirao se uz tri otapala: cikloheksan, heptan i smjesu heptana s butil-acetatom. Uzorak se mjerilo na način da se ostatak nakon digestije razrijedio na 100 mL te je od toga uzet alikvot od 0,5 mL za analizu. U tablici 8. prikazani su rezultati koji su dobiveni analizom uzorka uz

cikloheksan kao otapalo. Slijedi tablica 9. s rezultatima mjerenja uz heptan kao otapalo te na kraju uz smjesu heptana i butil-acetata (tablica 10.).

Tablica 8. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije uz vodeno hladilo, uz korištenje cikloheksana kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
60	7069	8,2214
60	7189	9,1573
60	7343	10,3583
60	7444	11,1459
90	8651	13,7060
90	8587	13,3733
90	8539	13,1237
90	8472	12,7754
120	8906	11,2738
120	9106	12,0537
120	9681	14,2959
120	10092	15,8985
150	10134	12,8498
150	10943	15,3735
150	11943	18,4930
150	11493	17,0892
180	11533	14,3450
180	12690	17,3527

180	12779	17,5841
180	12800	17,6386
210	13559	16,8100
210	13944	17,6679
210	13752	17,2401
210	13156	15,9121

Tablica 9. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije uz vodeno hladilo, uz korištenje heptana kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
60	7770	24,4827
60	7864	25,4187
60	7757	24,3533
60	7771	24,4927
90	9456	27,5141
90	9374	26,9698
90	9377	26,9897
90	9484	27,7000
120	11064	28,6414
120	10947	28,0590
120	11518	30,9019
120	11231	29,4729
150	12389	28,1907
150	12618	29,1028

150	12817	29,8954
150	12694	29,4055
180	13777	28,0993
180	14147	29,3273
180	14093	29,1482
180	13969	28,7366
210	15474	28,9131
210	15438	28,8107
210	15246	28,2645
210	15518	29,0383

Tablica 10. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije uz vodeno hladilo, uz korištenje smjese heptana i butil-acetata kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
60	9591	30,7955
60	9793	32,6029
60	10062	35,0098
60	10035	34,7683
90	11995	34,8706
90	12175	35,9442
90	12563	38,2588
90	12571	38,3065
120	14284	36,3936
120	14248	36,2326

120	14458	37,1721
120	14783	38,6261
150	16688	37,7190
150	16558	37,2538
150	16661	37,6224
150	16998	38,8286
180	18431	36,6312
180	18495	36,8221
180	18363	36,4284
180	18870	37,9405
210	20313	36,2095
210	19747	34,7625
210	19620	34,4378
210	19751	34,7727

Kada se iz ovih podataka izračunaju srednje vrijednosti za mase selenija dobiju se vrijednosti prikazane u tablici 11. Masa selenija u tableti za uzorak kojeg se analiziralo uz cikloheksan iznosi 14,3225 µg. To je jako mala vrijednost s pogreškom od čak 85,68 %. Za uzorak kojeg se mjerilo uz heptan kao otapalo masa selenija iznosi 27,9970 µg, a pogreška je 72,00 %. Kod mjerenja uzorka sa smjesom heptana i butil-acetata masa selenija je 36,1837 µg s dosad najmanjom greškom koja iznosi 63,82 %. Budući da rezultati još nisu bili prihvatljivi nastavilo se tražiti bolji način digestije i otapalo.

Tablica 11. *Rezultati određivanja selenija u tableti dobiveni nakon digestije uz vodeno hladilo, uz korištenje različitih otapala.*

Otapalo	*m (Se) / µg*	*% greške*
cikloheksan	***14,3225***	***85,68***
heptan	***27,9970***	***72,00***
heptan + butil-acetat	***36,1837***	***63,82***

3. serija mjerenja (digestija bez hladila i reduktora, na 200 °C)

Posljednja digestija provela se uz koncentrirane kiseline: dušičnu, sulfatnu i perklornu na temperaturi od 180-200 °C i bez hladila i reduktora. Pred kraj se dodala koncentrirana klorovodična kiselina. Uzorak se analizirao uz otapala: cikloheksan, heptan i smjesu heptana sa butil-acetatom. Rezultati mjerenja sa svakim otapalom prikazani su u tablicama 12., 13. i 14.

Tablica 12. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije na 200 °C, uz korištenje cikloheksana kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	**intenzitet signala**	**m (Se) u uzorku / µg**
30	10067	94,5115
30	10095	95,0214
30	10210	97,1155
60	16972	110,1256
60	16853	109,0422
60	16472	105,5732
90	23151	110,9235
90	23129	110,7900

90	22694	108,1496
120	26796	99,7865
120	26547	98,6529
120	24545	89,5388
150	33501	104,2487
150	29932	91,2505
150	30775	94,3207
180	37158	97,9729
180	34400	89,6024
180	31932	82,1121
210	41753	95,9303
210	40352	92,2857
210	41877	96,2529

Tablica 13. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta* signala *i mase selenija u uzorku nakon digestije na 200 °C, uz korištenje heptana kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
30	8975	78,6155
30	9085	80,8926
30	8891	76,8766
60	13637	87,5626
60	13644	87,6351
60	14136	92,7276
90	18116	89,2822
90	18755	93,6916
90	18436	91,4904
120	22812	91,2651
120	23172	93,1282
120	23329	93,9407
150	27511	92,4672
150	27753	93,4691
150	28369	96,0195
180	19954	50,9826
180	31460	90,6809
180	32626	94,7039
210	36978	94,0451

210	35818	90,6146
210	35981	91,0966

Tablica 14. *Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala i mase selenija u uzorku nakon digestije na 200 °C, uz korištenje smjese heptana i butil-acetata kao otapala.*

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	intenzitet signala	m (Se) u uzorku / µg
30	9140	84,5901
30	9289	87,5631
30	9463	91,0350
60	14248	93,2558
60	14705	97,8151
60	14985	100,6086
90	18969	93,5704
90	19607	97,8138
90	20023	100,5806
120	24451	97,5238
120	24250	96,5211
120	24911	99,8184
150	28702	94,9833
150	29169	96,8470
150	29754	99,1815
180	33494	95,0888

180	33643	95,5843
180	34327	97,8590
210	37810	93,8073
210	37098	91,7778
210	38213	94,9561

Kada se iz gornjih podataka izračunaju srednje vrijednosti koncentracije selenija dobiju se rezultati prikazani u tablici 15. U uzorku koji se mjerio uz cikloheksan kao otapalo masa selenija iznosi 98,7241 µg. Postotak pogreške iznosi 1,28%. U uzorku kojeg se analiziralo s heptanom kao otapalom masa selenija iznosi 90,0103 µg s postotkom pogreške od 9,99 %. Ta vrijednost se dobije tako što se kod računanja izbaci rezultat od 50,9826 µg, jer se ta masa značajno razlikuje od ostalih. To je vjerojatno zbog greške tijekom pipetiranja. Za uzorak koji se mjerio uz smjesu heptana s butil-acetatom kao otapalom masa selenija iznosi 95,2753 µg, što znači da je postotak pogreške 4,72 %.

Tablica 15. *Rezultati određivanja selenija u tableti dobiveni nakon digestije na 200 °C, uz korištenje različitih otapala.*

Otapalo	*m (Se) / µg*	*% greške*
cikloheksan	***98,7241***	***1,28***
heptan	***90,0103***	***9,99***
heptan + butil-acetat	***95,2753***	***4,72***

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu mjerila se koncentracija selenija u organskim uzorcima uz pomoć označavanja selenija fluorescentnim markerom 2,3-diaminonaftalenom. Selenij nema mogućnost fluorescencije, pa se njegovo određivanje fluorescentnom spektrometrijom temelji na formiranju kompleksa s fluorescentnim markerom kao što je 2,3-diaminonaftalen, a čiji je intenzitet fluorescencije proporcionalan koncentraciji selenija. Nakon razaranja uzorka dobio se slobodan selenij kojemu se dodao 2,3-diaminonaftalen koji je s njime tvorio kompleks. Slijedila je ekstrakcija u određeno otapalo, a nakon toga mjerenje fluorescencije. Kao otapala koristili su se: cikloheksan, heptan i smjesa heptana s butil-acetatom. Ispitalo se koji je najbolji način razaranja uzorka u kojemu će se selenij mjeriti te koje je najpogodnije otapalo za takvu analizu.

Učinkovitost metode koja se koristila za analizu selenija ispitala se tako što se za uzorak uzelo tablete selenija koje se konzumiraju kao suplementi. U tim tabletama koncentracija selenija je poznata, pa se mjerenjem koncentracije selenija u takvom uzorku može provjeriti koliko se dobiveni rezultati slažu sa stvarnim vrijednostima koncentracije.

Nakon obrade rezultata može se zaključiti da se kao najbolji način razaranja uzorka pokazala digestija uz koncentrirane kiseline: dušičnu, sulfatnu i perklornu pri temperaturi 180-200 °C, s time da se zadnjih 15 minuta temperatura spusti na 90 °C te se doda koncentrirana klorovodična kiselina. Pri tome se mora paziti da uzorak ne presuši.

Kao najbolje otapalo pokazao se cikloheksan, jer je uz to otapalo eksperimentalno dobivena koncentracija selenija najbliža stvarnoj vrijednosti, a postotak pogreške je najmanji te on iznosi 1,28 %.

Osim ovog otapala moguće je pronaći još bolja otapala. To su otapala u kojima bi se kompleks Se-DAN još bolje ekstrahirao i koja se još manje miješaju s vodom te bi se dobili točniji i precizniji rezultati. Dodatnim usavršavanjem, moglo bi se primijeniti metodu i na uzorcima nepoznate koncentracije selenija, a to su neke namirnice koje su bogate selenijem: brazilski oraščići, jaja, piletina i slično.

6. LITERATURA

1. M. N. Veličković; Utjecaj različitih doza prepartalno primijenjenog selenija na smanjenje učestalosti zaostajanja posteljice kod visokomliječnih krava; doktorska disertacija; Beograd, 2015.
2. http://www.likar.info/urology/news-61205-selen-zashhishhaet-ot-muzhskogo-raka-uchenye/ (30.08 2018.)
3. R. Marković, Ž. M. Baltić, J. Đorđević, M. Todorović, M. Dokmanović-Starčević, S. Pantić, A. Drljačić, D. Šefer, Ishranom životinja do funkcionalne hrane, Veterinary Journal of Republic of Srpska 15 (2015) 41-54.
4. https://www.fitness.com.hr/prehrana/nutricionizam/selen.aspx (28.08.2018.)
5. A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, Selenocysteine: the 21st amino acid, Molecular Microbiology 5 (1991) 515-520.
6. http://aminoacidosnoesenciales.blogspot.com/2010/08/selenocisteina.html (30.02018.)
7. N. G. Schrauzer, Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity, J. Nutr. 130 (2000) 1653–1656.
8. A. Shrift, Metabolism of selenium by plants and microorganisms, In: Organic Selenium Compounds: Their Chemistry and Biology (D. L. Klayman, W. H. H. Günther, eds.), John Wiley & Sons, New York, NY (1973) 763-814.
9. M. Blau, M. A. Bender, ^{75}Se-selenomethionine for visualization of the pancreas by isotope scanning, Radiology 78 (1962) 974-979.
10. N. M. Griffiths, R. D. H. Stewart, M. F. Robinson, The metabolism of (^{75}Se)selenomethionine in four women, Br. J. Nutr. 35 (1976) 373-382.
11. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3132?lang=en&region=HR (30.08.2018.)
12. K. E. Burke, G. F. Combs, E. G. Gross, K. C. Bhuyan, H. Abu Lideh, The effects of topical and oral L-selenomethionine on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation, Nutr. Cancer 17 (1992) 123-137.
13. E. Hansson, S. O. Jacobsson, Uptake of (^{75}Se)slenomethionine in the tissues of the mouse studied by whole-body autoradiography, Biochim. Biophys. Acta 115 (1966) 285-293.
14. I. H. Waschulewski, R. A. Sunde, Effect of dietary methionine on tissue selenium and glutathione peroxidase on tissue selenium and glutathione peroxidase activity given selenomethionine, Br. J. Nutr. 60 (1988) 57-68.

15. C. D. Thomson, Selenium | Physiology, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (second edition), Benjamin Caballero ur., Academic Press (2003) 5117-5124.
16. Ž. Cvrtila, L. Kozačinski, M. Hadžiosmanović, S. Milinović-Tur, I. Filipović, Značenje selena u mesu peradi, Stočarstvo 59 (2005) 281-287.
17. N. Adler, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Istraživanje selena u namirnicama animalnog podrijetla, 1993.
18. C. A. Swanson, Comparative utilization of selenite, selenomethionine and selenized yeast by the laying hen, Nutr. Res. 7 (1987) 529-537.
19. P. K. Ku, E. R. Miller, R. C. Wahlstrom, A. W. Grace, J. P. Hitchcock, D. E. Ullrey, Selenium supplementation of naturally high selenium diets for swine, J. Anim. Sci. 37 (1973) 501-505.
20. O. E. Olson, E. N. Novacek, E. I. Whitehead, I. S. Palmer, Investigations on selenium in wheat, Phytochemistry 9 (1970) 1181-1187.
21. T. K. Virupaksha, S. Shrift, Biochemical differences between selenium accumulator and nonaccumulator Astragalus species, Biochim. Biophys. Acta 107 (1965) 69-80.
22. J. L. Martin, M. L. Gerlach, Selenium metabolism in animals, Ann. New York Acad. Sci. 192 (1972) 193-199.
23. C. B. Anfinsen, D. Steinberg;, Studies on the biosynthesis of ovalbumin, J. Biol. Chem. 189 (1951) 739-744.
24. O. Greengard, A. Sentenacand, G. Acs, Induced formation of phosphoprotein in tissues of cockerels in vivo and in vitro, J. Biol. Chem. 240 (1965) 1687-1691.
25. J. D. Latshaw, M. Osman, Distribution of Selenium in Egg White and Yolk after Feeding Natural and Synthetic Selenium Compounds, Poultry Science 54 (1975) 1244-1252.
26. E. P. Painter, K.W. Franke, On the relationship of selenium to sulfur and nitrogen deposition in cereals, Amer. J. Bot. 27 (1940) 336-339.
27. https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp92-c7.pdf (15.10.2018.)
28. A. K. Macpherson, B. Sampson, A. T. Diplock, Comparison of methods for the determination of selenium in biological fluids, Analyst 113 (1988) 281-283.
29. S. A. Lewis, N. W. Hardison, C. Veillon, Comparison of isotope dilution mass spectrometry with Zeeman background correction for the determination of plasma selenium, Anal.Chem. 58 (1986) 1272-1273.

30. O. Oster, W. Prellwitz, A methodological comparison of hidride and carbon furnance atomic apsorption spectroscopy foe the determination of selenium in serum, Clinica Chimica Acta 124 (1982) 277-291.
31. D. C. Reamer, C. Veillon, A double isotope dilution Method for using stable selenium isotopes in metabolic tracer studies: analysis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), The journal of nutrition 113 (1983) 786-792.
32. A. J. Krynitsky, Preparation of biological tissue for determination of arsenic and selenium by graphite furnance atomic apsorption spectrometry, Anal.Chem. 59 (1987) 1884-1886.
33. T. S. Koh, T. H. Benson, Critical re-aprraisal of fluorometric method for determination of selenium in biological materials, Association of official analytical chemists 66 (1983) 918-926.
34. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d2757?lang=en&region=HR (03.09.2018.)
35. http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.317183.html (24.09.2018.)
36. U. Tinggi, C. Reilly, C. M. Patterson; Determination off Selenium in Foodstuffs Using Spectrofluorometry and Hydride Generation Atomic Apsorption Spectrometry; Journal of food composition and analysis 5 (1992.) 269-280.
37. http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/elementi/se/spojevi.html (26.09.2018.)