Flourimetrijsko određivanje selenija u jajima

Kanis, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:182:013088

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek







Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Laura Kanis

Fluorimetrijsko određivanje selenija u jajima

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Laura Kanis

Fluorimetrijsko određivanje selenija u jajima

Diplomski rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Neposredni voditelj: dr. sc. Mateja Budetić

Osijek, 2019.

Zahvala

Veliku zahvalnost prvenstveno dugujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Mireli Samardžić, koja je svojim savjetima i strpljenjem najviše doprinijela izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i neposrednoj voditeljici dr. sc. Mateji Budetić koja je uvijek bila spremna pomoći.

Zahvaljujem se i zaposlenicima Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku na ukazanom strpljenju i edukaciji prilikom izvedbe digestije uzoraka.

Također se zahvaljujem i višem laborantu, ujedno i prijatelju, Milanu Pajičiću na strpljenju i pruženoj podršci prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala i svim ostalim profesorima, docentima, asistentima i laborantima Odjela za kemiju koji su svojim predavanjima probudili moju ljubav prema kemiji.

Posebne zahvale upućujem obitelji, dečku Davoru i prijateljima, posebno Daliboru i Tomislavu, koji su uvijek bili spremni pružiti riječi podrške i ohrabrenja, ali i utješiti kada je bilo najpotrebnije. Hvala što ste bili uz mene sve ove godine.

Veliko hvala roditeljima bez kojih ovo sve ne bi bilo moguće!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

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

FLUORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE SELENIJA U JAJIMA

Laura Kanis

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Sažetak:

U ovom radu fluorimetrijski se određivao selenij u uzorcima jaja uz pomoć fluorescentnog markera 2,3-diaminonaftalena. Metoda se temelji na stvaranju kompleksa selenija s fluorescentnim markerom. Intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa proporcionalan je koncentraciji selenija. Za razaranje uzoraka korištena je mikrovalna digestija. Kao otapala koristili su se cikloheksan, heptan i smjesa heptana i 3%-*n*-butil-acetata. Na temelju rezultata zaključeno je kako je najbolje otapalo za ekstrakciju kompleksa Se-DAN cikloheksan. Učinkovitost i točnost metode ispitani su određivanjem selenija u referentnom uzorku i metodom standardnog dodatka. Selenij je određen u tri domaća i tri kupovna jaja pri čemu nije bilo značajne razlike u sadržaju selenija između domaćih i kupovnih jaja.

Diplomski rad obuhvaća: 60 stranica, 24 slike, 11 tablica, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: selenij, 2,3-diaminonaftalen, fluorescencija, cikloheksan, jaja

Rad prihvaćen: 31.10.2019.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik
2. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
3. doc. dr. sc. Marija Jozanović
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjenski član povjerenstva

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

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

FLUORIMETRIC DETERMINATION OF SELENIUM IN EGGS

Laura Kanis

Thesis completed at: Department of Chemistry

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

Abstract:

In this work, selenium was determined fluorimetrically in egg samples using the fluorescent marker 2,3-diaminonaphthalene. The method was based on the formation of a selenium complex with a fluorescent marker. The fluorescence intensity of the resulting complex was proportional to the selenium concentration. Microwave digestion was used to destroy the samples. Cyclohexane, heptane and a mixture of heptane and 3% *n*-butyl acetate were used as solvents. Based on the results, it was concluded that the best solvent for extraction of the Se-DAN complex was cyclohexane. The efficiency and accuracy of the method were tested by determining the selenium in the reference sample and using the standard addition method. Selenium was determined in three domestic and three purchase eggs, with no significant difference in selenium content between domestic and purchase eggs.

Thesis include: 60 pages, 24 figures, 11 tables, 32 references

Original in: Croatian

Keywords: selenium, 2,3-diaminonaphthalene, fluorescence, cyclohexane, eggs

Thesis accepted: 31.10.2019.

Reviewers:

1. Martina Šrajer Gajdošik, Ph. D., assistant prof.
2. Mirela Samardžić, Ph. D., associate prof.
3. Marija Jozanović, Ph. D., assistant prof.
4. Martina Medvidović-Kosanović, Ph. D., assistant prof., alternate member of the committee

Thesis deposited in: Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Selenij 2
2.2. Povijest otkrića selenija 4
2.3. Selenij u hrani 5
2.3.1. Selenij u stočnoj hrani 6
2.3.2. Selenij u jajima 7
2.4. Unos selenija u organizam 10
2.5. Uloga selenija u ljudskom organizmu 11
2.6. Nedostatak selenija u ljudskom organizmu 12
2.6.1. Bolesti povezane s nedostatkom selenija 12
2.6.2. Selenij i kardiovaskularne bolesti 13
2.6.3. Selenij i karcinom 13
2.6.4. Selenij, funkcija štitnjače i autoimuna bolest štitnjače 14
2.7. Toksičnost selenija 15
2.7.1. Kronično trovanje selenijem 15
2.7.2. Akutno trovanje selenijem 15
2.8. Aminokiseline koje sadrže selenij 16
2.8.1. Selenocistein 16
2.8.2. Selenometionin 17
2.9. Metabolizam selenija 19
2.9.1. Apsorpcija 19
2.9.2. Transport 19
2.9.3. Metabolizam i raspodjela 19
2.9.4. Izlučivanje 21
2.9.4.1. Izlučivanje u mlijeku 21
2.10. Selenoproteini 22
2.10.1. Glutation peroksidaza 22
2.10.2. Fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza 23
2.10.3.Selenoprotein-P 23
2.10.4. Jodotironin dejodinaza 24
2.10.5. Tierodoksin reduktaza 24
2.10.6. Selenoprotein-W 24

2.11. Određivanje koncentracije selenija ... 25
2.12. Analitičke tehnike za određivanje selenija ... 26
2.12.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija ... 27
2.12.2. Atomska emisijska spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom ... 28
2.12.3. Kromatografija ... 28
2.12.4. Analiza aktivacije neutrona ... 28
2.12.5. Fluorimetrijske metode ... 29
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 30
3.1. Određivanje selenija ... 30
3.2. Kemikalije i instrumentacija ... 31
3.3. Priprema otopina ... 33
3.3.1. Priprema standardne otopine selenija ... 33
3.3.2. Priprema otopine EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$ ... 33
3.3.3. Priprema otopine 2,3-diaminonaftalena ... 33
3.3.4. Priprema 1 M otopine klorovodične kiseline ... 34
3.3.5. Priprema 0,1 M otopine klorovodične kiseline ... 35
3.4. Digestija uzoraka jaja ... 36
3.5. Kalibracija sa standardnom otopinom selenija i priprema uzoraka za mjerenje ... 38
3.6. Ispitivanje utjecaja nitrata na odzive ... 42
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 43
4.1. Fluorimetrijsko određivanje selenija ... 43
4.2. Ispitivanje utjecaja nitrata ... 44
4.3. Kalibracija ... 46
4.3.1. Kalibracija standardne otopine selenija s cikloheksanom kao otapalom ... 46
4.3.2. Kalibracija standardne otopine selenija s heptanom kao otapalom ... 47
4.3.3. Kalibracija standardne otopine selenija sa smjesom heptana i 3%-*n*-butil-acetata kao otapalom ... 49
4.3.4. Usporedba kalibracijskih krivulja standardne otopine selenija u sva tri otapala ... 50
4.4. Usporedba određivanja selenija u referentu u tri otapala ... 52
4.5. Određivanje selenija u uzorcima jaja ... 55
4.6. Određivanje selenija u uzorcima jaja uz standardni dodatak ... 57
5. ZAKLJUČAK ... 58
6. LITERATURA ... 59

1. UVOD

Cilj ovog diplomskog rada bio je mjeriti koncentraciju selenija u jajima metodom fluorimetrije, pronaći otapalo u kojem će se kompleks selenija i fluorescentnog markera najbolje otapati i koje će najmanje isparavati.

Hipoteza ovog rada je da fluorescentni marker selektivno veže selenij i formira kompleks te da je intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa proporcionalan koncentraciji selenija u uzorku jaja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Selenij

Selenij (simbol Se) je polumetal koji pripada 16. skupini i 4. periodi periodnog sustava elemenata zajedno s kisikom, sumporom, telurijem i polonijem. Ti elementi nazivaju se još i halkogeni elementi (oni koji tvore rude) jer su najzastupljeniji u rudama [1]. Atomski broj selenija je 34, relativna atomska masa iznosi 78,971 Da, a gustoća 4,809 g cm^{-3}. Pri sobnoj temperaturi je u čvrstom stanju. Može se pojaviti u tri alotropske modifikacije: siva kristalična (metalna) modifikacija, amorfna crna te amorfna i kristalična crvena modifikacija selenija (Slika 1.) Ove tri alotropske modifikacije nastaju ovisno o načinu vezanja molekula ili zbog različitog sastava molekula. Crvena modifikacija selenija je prstenasta struktura Se_8, a postoji u dva oblika, kao α-selenij i β-selenij. Oba navedena oblika lako prelaze u stabilniju sivu, odnosno metalnu, modifikaciju s lančastom strukturom. Crvena modifikacija selenija ne provodi električnu struju zbog svoje prstenaste strukture. Metalna modifikacija selenija je slab vodič električne struje u tami, ali mu se osvjetljenjem vodljivost povećava i do tisuću puta [1].



Slika 1. Tri alotropske modifikacije selenija; crni, sivi i crveni selenij [2]

U prirodi se selenij rijetko nalazi u elementarnom stanju. Uglavnom je dio nekih minerala kao što je na primjer pirit gdje djelomice zamjenjuje sumpor. Postoji šest prirodnih izotopa s masenim brojevima 74, 76, 77, 78, 80 i 82, a najčešći i najstabilniji su ^{80}Se i ^{78}Se [3]. Selenij se u prirodi najčešće pojavljuje uz sumpor. Tako se prilikom prženja sulfida ili izgaranja sumpora prisutni selenij oksidira u selenijev dioksid, SeO_2. Međutim prisutni sumporov dioksid, SO_2, reducira SeO_2 na elementarni selenij prema jednadžbi:

$$2SO_2(g) + SeO_2(s) \rightarrow Se(s) + 2SO_3(g), \quad (1)$$

gdje (g) označava plinovito stanje, a (s) čvrsto stanje. Tako nastali elementarni selenij se taloži u mulju olovnih komora, nakon čega se tretiranjem kiselinama (dušičnom i sulfitnom) dobiva talog crvenog praha, odnosno crvene modifikacije selenija. Može se još dobiti i elektrolitskom rafinacijom bakra, odnosno anodnog mulja [1]. Najveća upotreba selenija je u staklarskoj industriji gdje se upotrebljava za uklanjanje zelene boje stakla koja je uzrokovana prisutnošću tragova željeza. U većim količinama selenij staklu daje crvenu boju [1]. Također pronalazi upotrebu i u izradi ćelija koje služe za mjerenje intenziteta svjetla.

2.2. Povijest otkrića selenija

U početku se smatralo da je selenij otrovan i toksičan, a kasnije se otkrilo da, osim što je esencijalan element, ima i antikancerogena svojstva. Otkriće selenija pripisuje se Jonsu Jacobu Berzeliusu (Slika 2.) koji je 1817. godine selenij opisao kao crveni talog kojeg je uočio na zidu tijekom proizvodnje sumporne kiseline. Naime, taj talog nije bio čisti selenij, već mješavina selenija i telurija. Berzelius je selenij nazvao prema grčkom nazivu za Mjesec (grč. *σελήνη, selene*).



Slika 2. Jons Jacob Berzelius [4]

Kada se u prošlom stoljeću kod ovaca koje su hranom unosile prevelike količine selenija razvila bolest, razvilo se i mišljenje o otrovnosti selenija. Međutim, kasnije je primijećeno da se i kod životinja koje nisu unosile dovoljne količine selenija također razvijaju razne poteškoće i bolesti. Nakon tih opažanja nastavljeno je istraživanje selenija, a 1957. godine Mills je otkrio enzim glutation peroksidazu koji sadržava selenij. Taj enzim sudjeluje u metabolizmu vodikovog peroksida te tako sprječava oštećenja stanica koja bi nastala djelovanjem štetnih slobodnih radikala. Tadašnjim istraživanjima se došlo do zaključka da je selenij zapravo esencijalan mikronutrijent koji je potreban kako ljudima tako i životinjama. Također ima i antioksidativna, antikancerogena, antivirusna i antiupalna svojstva. Glavni razlog tomu je što je selenij sastavni dio više od 25 proteina, gdje se nalazi u obliku aminokiseline selenocisteina [4].

2.3. Selenij u hrani

Kako je selenij mikronutrijent i u organizmu se pojavljuje u tragovima, redoviti unos selenija je od iznimne važnosti za ljudski ali i životinjski organizam. Najbogatiji izvor selenija su brazilski orasi, plodovi mora, žitarice, jaja, meso, grah, mlijeko i sir. Sadržaj selenija u biljnoj hrani uvelike ovisi o koncentraciji u tlu. Međutim, neke od namirnica, na primjer meso, mogu se modificirati dodavanjem određenih sastojaka. Industrija mesa jedna je od najvažnijih grana u prehrambenoj industriji. Glavni sastojci mesa su voda, proteini, masti i minerali. Dodavanjem sastojaka koji su povoljni za zdravlje ili otklanjanjem štetnih sastojaka moguće je modificirati meso. Takva modificirana hrana naziva se i funkcionalna hrana. Prema FUFOSE (eng. *Functional Food Science in Europe*) programu Europske komisije predložena je tzv. „radna definicija" funkcionalne hrane prema kojoj se hrana može smatrati funkcionalnom ako se pokazalo da korisno utječe na jednu ili više ciljanih funkcija organizma, osim odgovarajućih nutritivnih učinaka, na način koji je važan za poboljšanje zdravstvenog stanja i/ili smanjenje rizika od razvoja bolesti. Funkcionalna hrana može biti prirodna hrana, hrana kojoj je dodan određeni sastojak ili hrana iz koje je određeni sastojak uklonjen tehnološkim ili biotehnološkim postupkom. To također može biti hrana u kojoj je osobina jedne ili više komponenata izmijenjena, hrana u kojoj je promijenjena biodostupnost jednog ili više sastojaka ili bilo koja kombinacija navedenih mogućnosti [5]. Funkcionalni sastojci mogu biti makronutrijenti (rezistentni škrob, omega-3 masne kiseline), mikronutrijenti (vitamini i minerali), neki neesencijalni sastojci (biljni sterol, oligosaharidi, konjugirana linolna kiselina) i živi organizmi (probiotici). Kada je u pitanju prehrana ljudi, pažnja se često obraća na masne kiseline, posebno na omega-3 i omage-6 masne kiseline. Iz tog razloga se hrana tijekom proizvodnje najčešće obogaćuje omega-3 masnim kiselinama. Sve se više spominje i važnost konjugirane linolne kiseline (eng. *conugated linoleic acid*, CLA). CLA predstavlja skupinu polinezasićenih masnih kiselina koje su geometrijski izomeri linolne kiseline, od kojih su najčešći *cis*-9, *trans*-11 i *trans*-10, *cis*-12. Također je i sve više istraživanja usmjereno na proučavanje funkcije i utjecaja selenija na procese u organizmu. Naime, sadržaj selenija i vitamina E u životinjskom mesu ima veliku ulogu u njegovoj kvaliteti, što uključuje boju mesa, oksidativnu stabilnost, sposobnost vezanja vode i slično. Selenij i vitamin E su jako bitni antioksidansi koji sprječavaju nastanak slobodnih radikala, uništavaju nastale slobodne radikale ili obnavljaju tkivo [6].

2.3.1. Selenij u stočnoj hrani

Osim što je važan za ljudski organizam, selenij je također važan i za životinjski organizam. Stoga je selenij u stočnoj hrani od iznimne važnosti. Utjecaj selenija na životinjski organizam prvi je puta opažen 1930-ih kod stoke koja se hranila biljkama s visokim koncentracijama selenija. Prevelike koncentracije selenija izazvale su alkalnu bolest kod tih životinja. Iz tog razloga je smatrano da je selenij toksičan za životinje, međutim 1957. istraživanja su pokazala da je selenij esencijalan za životinjski organizam. Kod štakora kojima nedostaje vitamin E sprječava nekrozu jetre, kod svinja bolest *hepatosis dieterica,* eksudativnu dijatezu kod peradi te bolest bijelog mišića kod stoke i ovaca [7].

Raspoloživost selenija u stočnoj hrani ovisi o njegovoj ukupnoj količini, kemijskom obliku u kojem se nalazi, stanju organizma, primjeni lijekova te dobnoj skupini [8]. S obzirom da se koncentracije selenija u različitim tlima razlikuju, često postoji potreba za dodatkom selenija stočnoj hrani. Najčešće se dodaje u anorganskom obliku, odnosno kao selenit i selenat. Prilikom korištenja anorganskog selenija potrebno je obratiti pažnju na njegovu toksičnost, interakciju s ostalim mineralima, na mogućnost stvaranja rezervnog selenija u organizmu, ali i na njegov prelazak u meso, mlijeko i jaja. Ovisno o vrsti mesa ili neke druge namirnice, količina selenija varira. Na primjer, kod govedine ta količina iznosi 12,3 μg/100 g, dok je kod peradi ta količina 22,9 μg/100 g. Najveću količinu selenija sadrže riba i plodovi mora, a ona iznosi 45 μg/100 g. Sljedeća su jaja čija količina selenija iznosi 40 μg/100 g, dok mlijeko sadrži samo 2,8 μg/100 g [8]. Zbog takvih varijacija u količini selenija u namirnicama pojavila se potreba za novim načinom unošenja selenija u životinjski organizam. Upravo je to razlog razvoja komercijalne uporabe organskog selenija i to u obliku selenometionina (SeMet) kao izvora dodatne količine selenija u životinjskom organizmu [8]. Primjenom ovakve hrane, oplemenjene organskim selenijem, poboljšano je zdravlje životinja, ali i produktivnost u smislu proizvodnje hrane. Kao optimalne koncentracije selenija u stočnoj hrani, u smislu moguće toksičnosti, prihvaćene su koncentracije u rasponu 0,1-0,5 mg/kg u suhoj tvari. Do trovanja dolazi kada su koncentracije selenija između 2 i 5 mg/kg ili više.

Adler je istraživala količinu selenija u raznim namirnicama životinjskog podrijetla. Analizom sadržaja selenija u uzorcima jetre (indikator količine selenija u organizmu), mišićima buta junadi i svinja te mesu peradi dobiveni su rezultati na temelju kojih se moglo zaključiti kako sve navedene namirnice sadrže velike količine selenija. Na temelju rezultata zaključeno je i da stalan unos selenija u životinjski organizam putem stočne hrane omogućuje dobivanje namirnica životinjskog porijekla s visokim udjelom selenija. Usporedbom mesa u Hrvatskoj i

mesa u drugim europskim državama, zaključila je i da je svinjsko meso u Hrvatskoj znatno siromašnije selenijem. Najniža količina selenija bila je u junećem mesu zato što se u stočnu hranu za junad nije dodavao selenij. Dodavao se samo hrani za mliječna goveda te je tu ustanovljeno smanjenje broja somatskih stanica, ali i povećana koncentracija selenija u mlijeku [9].

Zbog velike važnosti selenija u prehrani te mišljenja kako je unos selenija putem hrane obogaćene istim najbolji, provedeno je istraživanje prilikom kojeg se određivala količina selenija u mesu peradi hranjene dodatnim količinama organski vezanog selenija. Istraživanje je provedeno na pilićima hibridne linije Ross. Pilići su bili podijeljeni u dvije skupine, kontrolnu i pokusnu, s obzirom na primanu količinu selenija unesenu putem hrane. Pilići iz kontrolne skupine hranjeni su standardnim načinom ishrane, odnosno smjesom za tov pilića, dok je pokusna skupina bila hranjena hranom obogaćenom organskim selenijem. Utvrđeno je da nema razlika u masama pilića, ali da meso pilića iz pokusne skupine sadrži znatno veću količinu selenija od pilića iz kontrolne skupine. Zaključeno je kako je uporaba selenija u organskom obliku kao dodatka hrani za piliće korisna u smislu poboljšanja nutritivne vrijednosti namirnica [8].

2.3.2. Selenij u jajima

Zbog već spomenute važnosti selenija za organizam, provedena su istraživanja usporedbe utjecaja organskog i anorganskog oblika selenija. Kada se govori o organskom obliku selenija najčešće se misli na selenoamino kiseline, dok je u anorganskom obliku selenij najčešće prisutan u obliku selenita (natrijev selenit).

U istraživanju koje je proveo Latshaw [10] korišteni su prirodni izvori selenija, biljke, i anorganski selenij u obliku natrijeva selenita u prehrani kokoši nesilica. Poznato je da biljke mogu inkorporirati selenij u selenoamino kiseline. Kada se životinja hrani takvom hranom, te aminokiseline se mogu preko peptidne veze inkorporirati u proteine životinje. Monogastrične životinje nisu u mogućnosti selenij iz selenita ugraditi u aminokiseline. Cilj istraživanja je bila usporedba učinaka organskog i anorganskog selenija na meso i njegova distribucija u jajima. Ustanovljeno je da je koncentracija selenija i u mesu i u jajima bila povećana prilikom prehrane koja je sadržavala biljke bogate selenijem. Također je ustanovljeno da je koncentracija selenija u žumanjku prilikom ishrane anorganskim oblikom selenija veća nego u bjelanjku.

Također je izvršeno i istraživanje utjecaja organskog u usporedbi s anorganskim oblikom selenija na koncentraciju selenija u kokošjim jajima, gdje je kao organski oblik korišten selenijem obogaćen kvasac (eng. *selenized yeast*, SY) i hrana obogaćena selenometioninom (SeMet), a kao anorganski oblik korišten je natrijev selenit (eng. *sodium selenite*, SS). Selenijem obogaćen kvasac nastaje rastom *Saccharomyces cerevisiae*, odnosno pivskog kvasca u mediju koji je bogat selenijem. Utvrđeno je da je porast koncentracije selenija dodatkom SS bio najmanje zastupljen u jajima, dok je dodatkom SeMet i SY koncentracija selenija uvelike povećana [11].

Istraživanja s monogastričnim životinjama pokazala su da oblik selenija u hrani ima značajan utjecaj na količinu selenija koja će biti prisutna u tkivima životinja. Ako se u prehrani koristi selenij iz uobičajenih namirnica, odnosno organski selenij, tada je količina selenija u tkivu otprilike proporcionalna količini koja se nalazi u hrani [12]. Ako selenij u hrani potječe od natrijeva selenita, tada selenij u tkivu nije proporcionalan seleniju unesenom hranom. Većina selenija kojeg životinje unose u organizam dolazi iz biljaka. Istraživanje koje su proveli Olson i sur. [13] pokazalo je da je otprilike polovica selenija, koji je radioaktivno označen kako bi se mogao pratiti, prisutnog u pšenici inkorporirana u SeMet. Ostali selenij nalazi se u mnoštvu drugih spojeva. Međutim, kod biljaka koje skladište selenij, veći dio je prisutan u aminokiselinama koje nisu vezane u proteinima, kao što su selenocistation i metilselenocistein [14]. U prehrani monogastričnih životinja selenij je najzastupljeniji u obliku SeMet. Ta aminokiselina u protein se ugrađuje pomoću peptidne veze ili supstitucijom s metioninom [15]. Kao dodatak prehrani uglavnom se koristi anorganski oblik selenija. Selenit može biti vezan za protein, ali nije vezan peptidnom vezom. Za proučavanje raspodjele selenija u tkivima uglavnom se koristi jaje. Kada se u hranu kokoši dodaju prirodni izvori selenija, koncentracija selenija u bjelanjku jednaka je ili veća od one u žumanjku. Obrnuto je ako se u hranu dodaje selenit. Tada je koncentracija selenija u žumanjku veća nego ona u bjelanjku. Proučavanje nastanka jajeta omogućuje praćenje inkorporiranja selenija u proteine jajeta. Prije samog nastanka jajeta, u jajovodu se najprije odvija sinteza proteina bjelanjka. Ta sinteza utječe na promjenu razine selenija i ta promjena je vidljiva u roku od jednog ili dva dana [16]. S obzirom da proteini žumanjka nastaju u jetri, a jajašcu je potrebno oko 10 dana za sazrijevanje, potreban je duži period prije nego se primijeti razlika u koncentraciji selenija u žumanjku s obzirom na prehranu kokoši. Budući da prehrana utječe na zadržavanje selenija u organizmu, u istraživanju se primjenjivala različita prehrana, ali i pratio se utjecaj različitih vrsta prirodnog oblika selenija na jaje. Selenij se najkraće zadržavao u organizmu kokoši kada

nije dodavan niti u jednom obliku, a najviše se zadržavao kada je dodavan u obliku SeMet. Veća koncentracija selenija u žumanjku jajeta nego u bjelanjku primijećena je kada se kokošima u hranu dodavao selenij iz biljke *Astragalus racemosus*. Ako se kokoši hrane pšenicom koja je bogata selenijem, koncentracija će biti veća u bjelanjku. Ovo istraživanje pokazalo je da se u raznim biljkama nalaze različiti spojevi selenija što utječe na njegovu raspodjelu u organizmu [17].

2.4. Unos selenija u organizam

Unos selenija razlikuje se od čovjeka do čovjeka, a ovisi o načinu prehrane, životnim navikama te o mjestu stanovanja. Najbolji izvor selenija je hrana, a bitno je imati raznovrsnu prehranu. Sadržaj selenija u hrani uvelike ovisi o njegovoj prisutnosti u tlu. Razni čimbenici mogu utjecati na apsorpciju selenija iz tla, kao što je na primjer sumpor iz gnojiva ili kiselih kiša. Tla srednje Europe siromašna su selenijem, pa stanovništvo na tim područjima ne može unijeti dovoljno selenija u organizam kroz hranu. Na primjer, prosječni Europljanin dnevno unese 25-48 μg selenija dok prosječni Kanađanin unese između 100 μg i 200 μg selenija dnevno [18]. Preporučeni dnevni unos selenija za odrasle osobe iznosi između 55 i 75 μg, ovisno o spolu, pošto muškarci trebaju više selenija nego žene. Dnevni unos od 100-200 μg selenija preporuča se kod prevencija ili liječenja nekih bolesti. Selenij se može uzimati i kao dodatak prehrani. Kao takav može biti u dva oblika, anorganski (natrijev selenat ili selenit) i organski (SeMet). Jedna od prednosti organskog selenija je ta što se gotovo potpuno (90%) apsorbira u tijelu. Anorganski selenij se apsorbira sporije i slabije, ali se nešto duže zadržava u organizmu nego organski. Kada organizam postigne točku zasićenja, organski selenij se pohranjuje u tkivima, dok se anorganski izlučuje mokraćom [18]. Selenij se preporuča uzimati zajedno s vitaminom E jer mu se tada povećava antioksidativni učinak u tijelu. Bitno je istaknuti i da vitamin A pospješuje apsorpciju selenija, dok kadmij smanjuje iskoristivost selenija jer u tijelu djeluje kao njegov antagonist.

Najbogatiji izvor selenija su brazilski orasi. Jedan brazilski orah može sadržavati čak do 100 μg selenija. Ostali značajni izvora selenija za čovjeka su namirnice životinjskog porijekla kao što su iznutrice (bubrezi i jetra), plodovi mora i meso. Nešto manje selenija imaju žitarice i mliječni proizvodi. Voće i povrće imaju najmanju količinu selenija. Izuzetak je bijeli luk koji može sadržavati i do 50 puta više selenija za razliku od njemu sličnog povrća. Prilikom termičke obrade namirnica gubi se čak 10-45% selenija.

2.5. Uloga selenija u ljudskom organizmu

Selenij je esencijalni mineral, odnosno mikronutrijent, koji je neophodan za normalnu funkciju organizma. Iako se u ljudskom organizmu nalazi u tragovima, od iznimne je važnosti za normalan život. Odrasli ljudski organizam prosječno sadrži oko 20 mg selenija, a najviše ga ima u eritrocitima, slezeni, srcu, bubrezima, testisima, a može ga se pronaći i u štitnjači. U ljudskom organizmu, nutritivne funkcije selenija postižu se pomoću 25 selenoproteina koji imaju selenocistein u aktivnom mjestu [19]. Selenoproteini imaju širok spektar učinaka, od antioksidativnih efekata i protuupalnih učinaka do proizvodnje aktivnog hormona štitnjače [19]. Najvažniji enzim u kojem se nalazi selenij je glutation peroksidaza. Ovaj enzim služi za uklanjanje štetnog vodikovog peroksida iz organizma te tako sprječava nastajanje slobodnih radikala i njihovo djelovanje na organizam. Jodotironin dejodinaza je još jedan enzim koji sadrži selenij i ima antioksidativna svojstva. Selenij je također bitan za nastanak tokoferola koji je bitan u oksidoredukcijskim reakcijama. Štiti biološke membrane od oštećenja izazvanih oksidacijom i na taj način sprječava nastanak kardiovaskularnih oboljenja, odnosno štiti tijelo od krvožilnih i srčanih oboljenja, služi i kao preventiva protiv karcinoma, osobito karcinoma dojke, grla, rektuma i želuca te održava elastičnost tkiva. Također djeluje na plodnost muškaraca i povećava broj spermatozida [6], osnažuje imunitet, štiti tijelo od toksičnih metala, usporava starenje, pomaže u borbi protiv artritisa, infekcija dišnog sustava, Chronove bolesti i kožnih bolesti te ima značajnu ulogu u radu štitne žlijezde [18].

2.6. Nedostatak selenija u ljudskom organizmu

Nedostatak selenija utječe na ljude u cijelom svijetu. Broj ljudi koji pate od nedostatka selenija zbog neodgovarajućeg unosa kreće se između 500 milijuna i 1 bilijuna ljudi [20]. Nedostatak selenija se najčešće primjećuje kod niske razine selenija u kombinaciji s čimbenicima kao što su porast oksidativnog stresa, vježbanje, izloženost kemikalijama ili povećani unos polinezasićenih masnih kiselina. U područjima gdje je niska koncentracija selenija, stanovnici posljedično imaju nisku koncentraciju selenija u organizmu, nisku aktivnost glutation peroksidaze i niske razine selenoproteina-P [7].

2.6.1. Bolesti povezane s nedostatkom selenija

Kashin-Beck bolest, endemski osteoartritis, javlja se u predadolescentnoj i adolescentnoj dobi. Bolest je zabilježena u Rusiji i Kini. Na pojavu ove bolesti utječu čimbenici kao što su zagađenje žitarica gljivicama i visoka razina organskih tvari (npr. fulvinska kiselina). Glavne karakteristike ove bolesti su kratak stas te deformacije zglobova koje nastaju zbog višestruke žarišne nekroze u ploči rasta cjevastih kostiju [7].

Keshan bolest, endemska kardiomiopatija, javlja se u područjima Kine gdje je koncentracija selenija niska. Bolest se pojavljuje ukoliko se natrijev selenit koristi kao suplement. Ono što karakterizira ovu bolest je multifokalna nekroza miokarda koja uzrokuje povećanje srca, kongestivno zatajenje srca, kardiogeni šok, a može rezultirati i smrću. Bolest je povezana sa smanjenim unosom selenija i njegovom niskom koncentracijom u kosi i krvi. Najčešće pogađa djecu i trudnice. Kako se neke značajke ove bolesti ne mogu objasniti samo na temelju niske koncentracije selenija, znanstvenici pretpostavljaju da utjecaj imaju i neki drugi čimbenici poput virusa, nekih otrova iz okoliša ili neuravnoteženosti minerala. Istraživanja miokarditisa sa *Coxackie B* virusom na miševima kojima je selenij bio u deficitu pokazala su moguću uključenost virusa u nastanak *Keshan* bolesti [7].

Nedostatak selenija može biti povezan i s dugotrajnom intravenoznom prehranom, jer je u tekućini koncentracija selenija niska.

Klinički simptomi kardiomiopatije i bolova u mišićima mogu biti smanjeni uporabom selenija, ali se to ne primjećuje kod svih bolesnika što ukazuje na to da postoje i drugi čimbenici koji su međusobno povezani [7].

2.6.2. Selenij i kardiovaskularne bolesti

Nedostatak selenija može imati utjecaj na kardiovaskularnim bolestima. Finski znanstvenici istraživali su mogućnost srčanog udara u slučaju smanjene količine selenija u organizmu kao zaseban faktor. Istraživanje je odbačeno jer studije nisu pružile dovoljno dokaza da se implicira na nedostatak selenija u većini čimbenika kardiovaskularnih bolesti. Međutim dokazano je da selenij sudjeluje u zaštiti organizma od tromboze i oksidacije lipoproteina niske gustoće kod pojedinih skupina ljudi kao što su pušači. Uzima ih se za primjer jer su oni izloženi povećanom oksidacijskom stresu [7]. Također je dokazano da utječe na razine kolesterola u krvi i održava ravnotežu istog [19].

2.6.3. Selenij i karcinom

Neka istraživanja pokazala su da koncentracija selenija ima ulogu u nastanku karcinoma. Preliminarna istraživanja pokazala su da selenij pozitivno utječe na rizik od nastanka karcinoma pluća, jetre, prostate, debelog crijeva, jednjaka i štitnjače [19]. Takav utjecaj selenija prvi je puta primijećen prije 30-ak godina u SAD-u gdje je praćena stopa smrtnosti po regijama u odnosu na izloženost seleniju iz biljaka. Do znanstvenih spoznaja o antikancerogenom djelovanju selenija došlo se proučavanjima koja su se vršila *in vitro* i na životinjama. Proučavan je i utjecaj selenija, vitamina E i β-karotena na karcinom jednjaka te utjecaj selenija na karcinom kože. Primijećeno je da svakodnevno uzimanje 200 μg selenija nije imalo velikog utjecaja na karcinom kože, ali je kod većine ostalih karcinoma pokazalo dobar učinak. Smrtnost od karcinom bila je smanjena za 50%, a učestalost pojave karcinoma prostate smanjena je za 63%, pluća za 48% te karcinoma debelog crijeva za 58% [7].

Četiri su pretpostavljena načina na koje selenij štiti organizam od karcinoma:

1. štiti stanice od oštećenja koja uzrokuju kisikovi slobodni radikali. Ti spojevi su iznimno reaktivni te stvaraju perokside koji ubrzavaju početni stadij karcinoma u kojemu se stvaraju predkancerogene stanice;
2. ublažava mutacijsko djelovanje kancerogenih tvari, kao što su djelovanja kemikalija, virusa i zračenja na oštećenja genetskog materijala stanica;
3. sprječava razmnožavanje kancerogenih virusa;
4. zaustavlja diobu stanica karcinoma i tako sprječava njihovo širenje po organizmu [18].

2.6.4. Selenij, funkcija štitnjače i autoimuna bolest štitnjače

Štitnjača ima najveću koncentraciju selenija s obzirom na ostala tkiva. U štitnjači selenij ima različite uloge. Jodotironin dejodinaze (eng. *selenium-dependent iodothyronine deiodinases*) ovisne o seleniju stvaraju aktivni hormon štitnjače, trijodtironin (T3), iz svog neaktivnog prekursora, tiroksina (T4). Selenij u obliku glutation peroksidaze 3 štiti stanice štitnjače od vodikovog peroksida koji je tamo stvoren kako bi ga peroksidaza štitnjače koristila u sintezi T3 i T4 iz joda i tiroglobulina. Ova funkcija u skladu je s obrnutom povezanošću količine selenija i volumena štitnjače, oštećenja tkiva štitnjače i gušavosti. Nekoliko istraživanja pokazalo je da je uzimanje selenija u količinama od 80 μg ili 200 μg dnevno u obliku natrijeva selenita ili SeMet djelotvorno protiv autoimune bolesti štitnjače, Hashimotovog tiroiditisa. Bolest je karakterizirana prisutnošću autoantitijela koja blokiraju tiroidnu peroksidazu koja je važna u proizvodnji hormona štitnjače [19].

2.7. Toksičnost selenija

Granica između toksičnog i prikladnog unosa selenija u organizam poprilično je tanka. Do selenoze, odnosno pretjerane izloženosti seleniju najčešće dolazi prilikom pretjeranog konzumiranja hrane koja je bogata selenijem. Iako je kod nekih pojedinaca trovanje utvrđeno prilikom konzumacije od 900 μg selenija dnevno, najčešće dolazi do trovanja prilikom unosa od oko 5 mg selenija dnevno [18]. Trovanje selenijem može biti kronično i akutno.

2.7.1. Kronično trovanje selenijem

Kod kroničnog trovanja simptomi ovise o načinu, odnosno putu, izloženosti. To su udisanje spojeva selenija ili trovanje putem probavnog trakta.

Udisanje spojeva selenija uzrokuje iritaciju respiratorne membrane, plućni edem, upalu bronhija i upalu pluća. Izloženost prašini selenija, osim već navedenih simptoma, izaziva iritaciju sluznice, krvarenje iz nosa i kašalj [21].

Trovanje selenijem putem probavnog trakta podrazumijeva dugotrajni unos prekomjerne količine selenija putem hrane ili vode, a odnosi se i na organski i anorganski oblik selenija. Simptomi kroničnog trovanja selenijem prvenstveno se očituju u pojavi mirisa češnjaka u dahu i metalnog okusa u ustima. Spoj koji daje miris češnjaka u dahu je dimetilselenid. Nakon toga slijede gastrointestinalni simptomi poput mučnine ili dijareje, zatim umor i bolovi u zglobovima. Također se pojavljuju promjene na noktima, njihova deformacija te gubitak noktiju, alopecija, osipi na koži, opadanje kose, obezbojenje i gubitak zuba [21].

2.7.2. Akutno trovanje selenijem

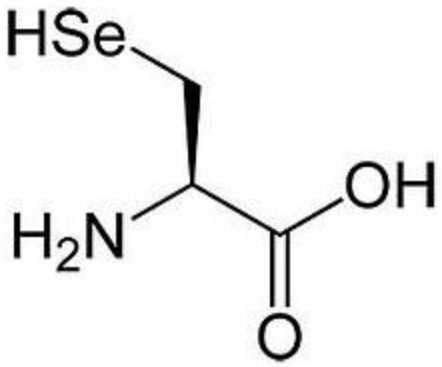
Prilikom akutnog trovanja tijelo je u kratkom roku izloženo velikim koncentracijama toksične tvari, u ovom slučaju selenija. Akutno trovanje selenijem očituje se u akutnom respiratornom distres sindromu, infraktu miokarda i zatajenju bubrega. Može izazvati i tahikardiju, crvenilo lica, ali i neurološke probleme kao što su drhtavica, razdražljivost i poremećaj rada mišića [21].

2.8. Aminokiseline koje sadrže selenij

Selenocistein i SeMet su dvije najzastupljenije aminokiseline u prirodi koje sadrže selenij. Neophodne su za razvoj i život biljnih i životinjskih organizama, ali i za ljudski organizam. Imaju veliku važnost u raznim biološkim procesima koji se odvijaju u organizmima. Čovjek ove aminokiseline u organizam unosi hranom te se selenij iz njih dalje metabolizira i iskorištava za razne procese. U obje aminokiseline je sumpor zamijenjen sa selenijem.

2.8.1. Selenocistein

Glavni pomak na polju biokemije selenija dolazi iz otkrića da gen za mišju glutation peroksidazu i glutation peroksidazu *E. coli* kodira i dehidrogenazu te sadrži TGA terminacijski kodon. Zbog tog se otkrića selenocistein (Slika 3.) smatra 21. aminokiselinom te je predloženo i slovo „U“ u jednoslovnom kodu za aminokiseline [22].



Slika 3. Struktura selenocisteina [23]

Za prisutnost selenija u proteinima zaslužan je TGA_{140} kodon. Kada je taj kodon prisutan, selenocistein se ugrađuje u proteine, suprotno tome, kada TGA_{140} kodon nije prisutan, selenocistein nije ugrađen u protein. Slično tome, ako se TGA_{140} kodon zamjeni TCA kodonom za serin, ugradnja selenija u protein je nemoguća. Međutim, ako se TGA_{140} kodon zamjeni kodonima za cistein (TGT ili TGC) postoji mogućnost da se u protein ugradi selenocistein. To ukazuje na ko-translacijsko ugrađivanje selenocisteina u proteine [22].

Značajka koja se podrazumijeva u ko-translacijskom ugrađivanju aminokiselina je prisutnost tRNA koja ih nosi. Tako je i u ovom slučaju morala postojati tRNA odgovorna za ugrađivanje

selenoamino kiseline, odnosno selenocisteina. Istraživanja su vršena na *E. coli*, a koristili su se mutirani geni kako bi praćenje bilo olakšano.

Identificirana su četiri gena, *selA, selB, selC* i *selD*, čiji produkti imaju ulogu u metabolizmu selenija. Mutacije na genima *selA* i *selB* onemogućile su sintezu selenopolipeptida koji formiraju dehidrogenazu H i N u *E. coli*. Mutacije na *selC* genu onemogućuju sintezu selenoproteina, dok mutacije na genu *selD* onemogućuju sintezu i selenoproteina i neuobičajenog nukleotida 5-metilaminometil-2-seleno-uridina koji je komponenta dvaju vrsta tRNA ($tRNA^{Lys}$ i $tRNA^{Glu}$) u *E. coli*. Određivanjem nukleotidne sekvence *selC* utvrđena je nova tRNA vrsta, odnosno $tRNA^{Sec}$. Glavna razlika $tRNA^{Sec}$ od ostalih vrsta je ta što ima osmerobazni par aminoacil-akceptorskih peteljki, dok ostale imanju sedmerobazni par peteljki [22].

Biosinteza selenocisteina događa se na $tRNA^{Sec}$, a počinje na serinskom dijelu. Mutacije na *selA* i *selD* sprječavaju nastanak selenocisteil-$tRNA^{Sec}$. To upućuje na to da produkti ovih gena imaju ulogu u prevođenju seril-$tRNA^{Sec}$ u selenocisteil-$tRNA^{Sec}$ [22].

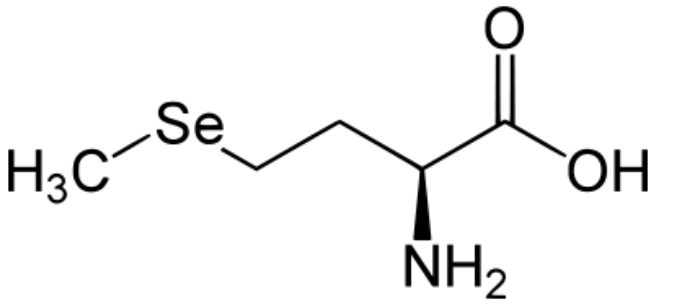
Enzim koji sintetizira selenocistein u eubakterijama i eukariotima je selenocistein sintaza. To je piridoksal fosfat ovisan protein. Enzim djeluje na seril-$tRNA^{Sec}$ i uklanja hidroksilnu grupu na serinskom dijelu. Prilikom toga nastaje intermedijer amino akrilil-(dehidroalanil)-$tRNA^{Sec}$. Dehidroalanil-$tRNA^{Sec}$ zatim veže aktivnog donora selenija, koji je u eubakterijama identificiran kao monoselenofosfat te nastaje selenocisteil-$tRNA^{Sec}$ [24].

Biosinteza u eukariotima odvija se pomoću kinaze. Djelovanjem *O*-fosfoseril-$tRNA^{Sec}$ kinaze na seril-$tRNA^{Sec}$ nastaje intermedijer *O*-fosfoseril-$tRNA^{Sec}$. Selenocistein sintaza zatim djeluje na fosfoseril-$tRNA^{Sec}$ te nastaje novi intermedijer dehidroalanil-$tRNA^{Sec}$ koji na sebe veže aktivnog donora selenija. Tom reakcijom nastaje selenocisteil-$tRNA^{Sec}$. Aktivni donor selenija i u ovom slučaju je monoselenofosfat [24].

2.8.2. Selenometionin

SeMet (Slika 4.) se, uz neke druge spojeve selenija, 1930-ih smatrao otrovnim. Kasnijim istraživanjima identificiran je kao protein biljaka, a dokazano je i da SeMet, ako ih se stavi u medij bogat selenijem, proizvode *Saccharomyces cerevisiea, Candidia albicans, Escherichia coli* te morske alge. 1962. ^{75}SeMet postao je dostupan kao agens za radiološko snimanje gušterače. Nedugo nakon toga istraživanja su pokazala da se dobro apsorbira u organizmu te također zadržava, pa se počeo upotrebljavati kao suplement selenija. Vrlo brzo je i kvasac

obogaćen selenijem predstavljen kao ekonomičan izvor selenija za ljuski organizam. Unatoč tome, razmišljalo se i o tome da bi se SeMet mogao akumulirati u tijelu ili biti izlučen u obliku toksičnih metabolita [25].



Slika 4. Struktura SeMet [26]

Žitarice i biljke koje se koriste za ishranu stoke prevode selenij pretežno u SeMet. SeMet se zatim veže na protein umjesto metionina (Met) jer $tRNA^{Met}$ ne razlikuje SeMet od Met. Zamjena metionina sa SeMet ne mijenja strukturu proteina značajno, ali postoji mogućnost utjecaja na aktivnost enzima ukoliko se zamjena dogodi blizu ili unutar aktivnog mjesta. S obzirom da je CH_3-Se skupina selenometionina hidrofobnija od CH_3-S skupine metionina, to može utjecati na neke kinetičke parametre prilikom vezanja supstrata [25]. Na primjer, SeMet supstituirana timidilat sintaza *E. coli* ima 40% veću specifičnu aktivnost nego običan enzim. Slično tome, SeMet supstituirana fosfomanoza izomeraza iz *C. albicans*, koja inače sadrži četiri metioninska ostatka u blizini aktivnog mjesta, imala je četiri puta veću koncentraciju supstrata. Suprotno tome, u β-galaktozidazi *E. coli* zamjena više od pola metioninskih ostataka sa SeMet rezultirala je inaktivnošću enzima.

Ljudi i životinje ne mogu sintetizirati SeMet. Nužno ga je unositi hranom. SeMet se apsorbira u tankom crijevu preko neutralnog aminokiselinskog apsorpcijskog sustava koji je ovisan o natriju. SeMet koji se nije metabolizirao ugrađuje se u dijelove tijela u kojima se sinteza proteina odvija brzo. To su mišići, gušterača, eritrociti, jetra, bubrezi te gastrointestinalna sluznica. Eritrociti SeMet uglavnom ugrađuju u hemoglobin. SeMet se može pronaći i u proteinima mozga.

2.9. Metabolizam selenija

U životinjskim namirnicama selenij se uglavnom nalazi u obliku selenocisteina jer je to aktivan oblik selenoproteina u tijelu sisavaca, dok se u žitaricama i ostalim biljkama nalazi u obliku SeMet. Metabolizam selenija obuhvaća apsorpciju, transport, raspodjelu, izlučivanje, zadržavanje te transformaciju u aktivni oblik. Svi ovi procesi ovise o interaktivnim prehrambenim čimbenicima te o količini i kemijskom obliku unesenog selenija [7].

2.9.1. Apsorpcija

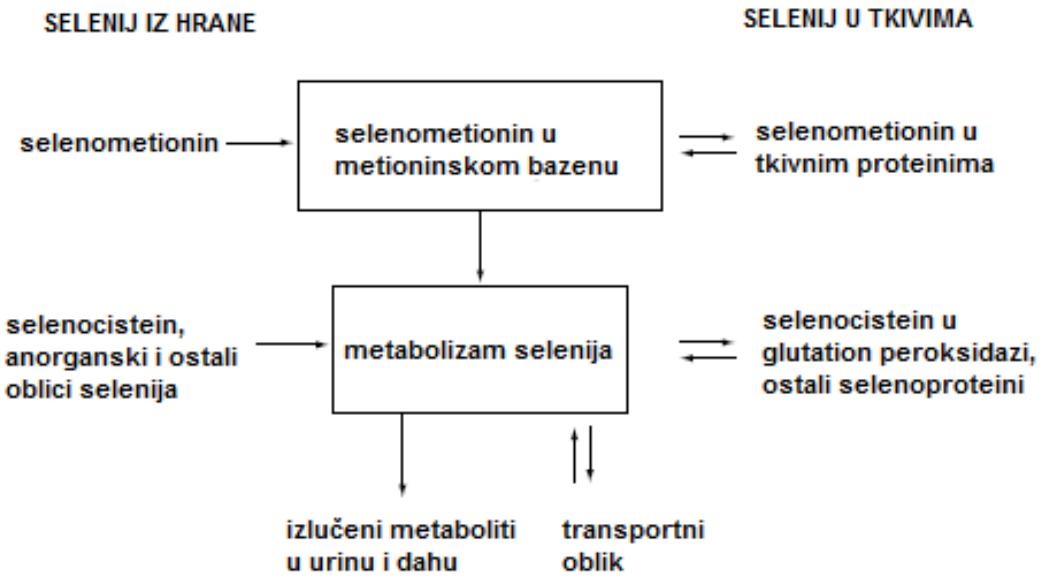
Selenij se uglavnom apsorbira iz dvanaesnika. Organski oblik selenija također se apsorbira i kroz epitelne stanice crijeva selektivnim transportom. SeMet i Met imaju isti oblik transporta, dok se o transportu selenocisteina zna vrlo malo. Anorganski oblik selenija, poput selenita i selenata, apsorbira se putem pasivnog mehanizma. Apsorpcija se uglavnom odvija u tankom crijevu. Ljudski organizam apsorbira čak 80% selenija iz hrane, a dokazano je i da se SeMet bolje apsorbira od selenita. Selenij se bolje apsorbira iz namirnica bogatih proteinima [7]. Neapsorbirani selenij iz organizma se izlučuje putem izmeta.

2.9.2. Transport

O transportu selenija kroz organizam ne zna se puno. Međutim, poznato je da se transportira na način da se veže na proteine plazme. Predloženi transportni protein koji sadrži selenij zove se selenoprotein-P, a izoliran je iz plazme štakora i ljudi. Plazma sadrži i izvanstaničnu glutation peroksidazu, ali veća je mogućnost da će se molekule selenija manje molekulske mase ponašati kao transportni proteini [7].

2.9.3. Metabolizam i raspodjela

U tkivima životinja selenij može ući u sastav proteina. U proteinima se nalazi u dva oblika. Prvi oblik je selenocistein koji predstavlja aktivni oblik selenija u selenoproteinima, kao na primjer u glutation peroksidazi koja je selenoenzim. Drugi oblik je SeMet koji se u proteinima nalazi na mjestu Met. Koncentracija selenija u tkivima ovisi o njegovom unosu u organizam. To se uvelike odražava na razine selenija u krvi kod stanovnika različitih zemalja, pošto su i količine selenija u tlima različite. Ukupna količina selenija u organizmu iznosi 3-20 mg, ovisno o unosu. Metabolizam selenija prikazan je na slici 5.



Slika 5. Shematski pregled metabolizma selenija u ljudskom organizmu [7]

Zadržavanje selenija u organizmu povezano je s oblikom selenija koji je unesen. Na primjer, razine selenija u krvi znatno su više nakon unosa SeMet nego kada se unosi natrijevim selenitom ili selenatom. Čini se da SeMet slijedi isti metabolički put kao i met te se na određeni protein ugrađuje nespecifično. To doprinosi stvaranju tkivnog selenija, gdje se on akumulira, ali nema fiziološku funkciju i nije dostupan za sintezu funkcionalnih oblika selenija. Dostupan postaje kada se katalizira [7]. U organizmu se selenat reducira u selenit, a zatim u selenid. Selenid je u oksidacijskom stanju (-2) i kao takav se prevodi u selenocistein, odnosno aktivni oblik selenoproteina. Selenij iz anorganskog oblika ili onaj dobiven katabolizom SeMet ili selenocisteina se ugrađuje u selenocistein koji zatim ulazi u regulatorni metabolizam selenija i ugrađuje se u selenoproteine. Ako postoji višak takvih oblika selenija, oni će se izlučiti putem urina [7].

Svi funkcionalni selenoproteini sisavaca u svom aktivnom mjestu sadrže selenocistein. Selenocistein je kodiran jedinstvenim stop kodonom UGA na mRNA specifičnoj za selenoprotein. Regulacija sinteze selenoproteina najvjerojatnije se odvija pomoću individualne mRNA na transkripcijskim i posttranskripcijskim razinama u ovisnosti o raspoloživosti selenija, kemijskom obliku selenija i izloženosti kisiku [7].

2.9.4. Izlučivanje

Glavni put izlučivanja selenija je urinom. Selenij koji je ostao neapsorbiran izlučuje se fekalnim putem. Homeostaza selenija postiže se regulacijom njegova izlučivanja. Dnevno izlučivanje selenija putem urina usko je povezano sa selenijem u plazmi i njegovim unosom putem hrane. Izlučivanje selenija korisno je u praćenju razine selenija. Istraživanja su pokazala da se samo 50-60% ukupne količine unesenog selenija izluči putem urina. Dokazano je i da se selenij sporije izlučuje iz organizma stanovnika zemalja gdje je tlo siromašno selenijem za razliku od onih koji žive u zemljama gdje je tlo bogato selenijem. To ukazuje na moguće prilagodbe organizama na uvjete gdje su količine selenija niske. Metaboliti selenija u urinu su trimetilselenijev ion i metilselenol, pri čemu je metilselenol više zastupljen. Do manjih gubitaka selenija dolazi putem kože ili kose [7].

2.9.4.1. Izlučivanje u mlijeku

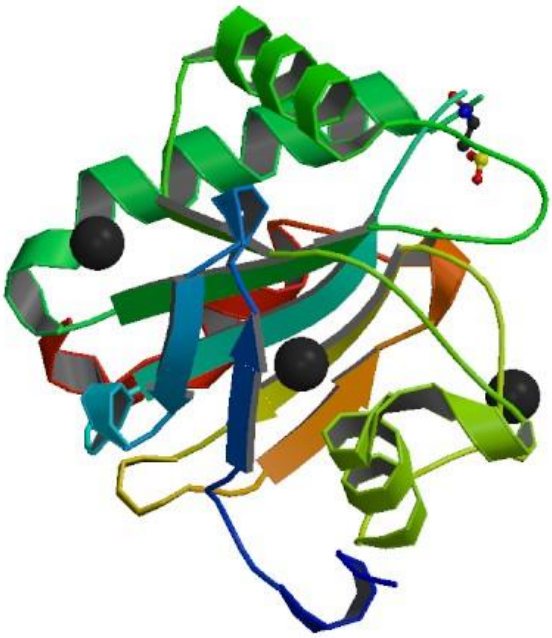
Većina selenija u ljudskom mlijeku je vezana na proteine. Detektirano je čak 9 selenoproteina od čega 15-30% ukupnog selenija u mlijeku sadrži glutation peroksidaza [7].

2.10. Selenoproteini

Selenij svoje biološko djelovanje pokazuje kroz djelovanje proteina koji se nazivaju selenoproteini. Njih u organizmu sisavaca može biti do 30. Identifikacija i karakterizacija selenoproteina u posljednjih nekoliko godina rezultirali su boljim shvaćanjem uloge selenija u organizmima. Selenoproteini koji su pročišćeni i proučeni su glutation peroksidaze (koje se nalaze u citosolu, stanicama te plazmi, gastrointestinalne glutation peroksidaze, fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza), selenoprotein-P, jodotironin 5`-dejodinaze, selenoprotein kapsule sperme, selenoprotein-W, tioredoksin reduktaza, selenofosfat sintetaza, 58-, 56- i 14-kDa Se-vezujući protein.

2.10.1. Glutation peroksidaza

Glutation peroksidaza (Slika 6.) je selenoprotein koji se sastoji od 4 jednake podjedinice od kojih svaka u svom aktivnom mjestu sadrži seleocistein. U slučaju nedostatka selenija, aktivnost ovog enzima može se smanjiti na manje od 1% u tkivima životinja. Glutation peroksidaza koja je prisutna u stanicama (uključujući i eritrocite), plazmi i gastrointestinalnom traktu, može djelovati na uklanjanje vodikovog peroksida *in vivo*. Tako se sprječava početak peroksidacije membrana i oksidacijsko oštećenje. Međutim, glutation peroksidaza ima specifičniju ulogu u metabolizmu arahidonske kiseline u trombocitima, mikrobiocidnoj aktivnost u leukocitima te u mehanizmu imunološkog odgovora. Također služi i kao protein za skladištenje selenija.



Slika 6. Struktura jedne podjedinice ljudske glutation peroksidaze koja sadrži selenocistein (molekula gore desno) [27]

2.10.2. Fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza

Ovaj enzim se od klasične glutation peroksidaze razlikuje po tome što može metabolizirati hidroperokside masnih kiselina koji se esterificiraju u fosfolipidima staničnih membrana. Fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza može inhibirati mikrosomalnu peroksidaciju lipida te je također i osnova interakcije selenij/vitamin E u patogenezi različitih deficijentnih bolesti kod životinja [7].

2.10.3.Selenoprotein-P

Selenoprotein-P je protein koji se nalazi u plazmi, a izdvojen je, pročišćen i karakteriziran iz plazme čovjeka i štakora. To je glikoprotein koji selenij sadrži u obliku selenocisteina. Njegova koncentracija u plazmi štakora povezana je s količinom selenija u organizmu te tako u slučaju nedostatka selenija njegova koncentracija u plazmi pada na 10% i manje. Njegova funkcija nije još u potpunosti poznata, ali smatra se kako ima ulogu u obrani od izvanstaničnih oksidansa pošto je njegova prisutnost u organizmu povezana sa zaštitom od bolesti koje nastaju uslijed nedostatka selenija. Također se pretpostavlja da je povezan s endotelnim stanicama te da ima ulogu transporta [7].

2.10.4. Jodotironin dejodinaza

Otkriće da su jodotironin 5´-dejodinaza tipa I, a u novije vrijeme i dejodinaze tipa II i tipa III selenoproteini, ukazuje na važnost selenija u metabolizmu hormona štitnjače koji su neophodni za rast i razvoj. Ovaj enzim katabolizira pretvorbu tiroksina (T4) u njegov aktivni metabolit trijodtironin (T3) u jetri i bubrezima. Manjak selenija dovodi do povećanja razine T4 u plazmi i smanjenja razine aktivnog T3. Kada je količina selenija u organizmu smanjena, selenij će se preferirano vezati na jodotironin dejodinazu, a ne na glutation peroksidazu [7].

2.10.5. Tierodoksin reduktaza

Tierodoksin reduktaza je novootkriveni selenoprotein. To je NADPH-ovisni flavonoenzim koji smanjuje količinu disulfid tioredoksina. Ovaj enzim obnavlja askorbinsku kiselinu iz dehidroaskorbinske kiseline. Aktivnost mu opada prilikom nedostatka selenija. Selenij je u aktivnom mjestu tierodoksin reduktaze prisutan kao selenocistein [7].

2.10.6. Selenoprotein-W

Selenoprotein-W je selenoprotein koji se nalazi u mišićima i drugim tkivima. Koncentracija mu se smanjuje prilikom nedostatka selenija i smatra se da je uključen u razvoj mišićne degradacije kod ovaca s nedostatkom selenija [7].

2.11. Određivanje koncentracije selenija

Krv se općenito smatra korisnom za mjerenje količine selenija u organizmu i količine njegova unosa u organizam, ali mogu se koristiti i tkiva u te svrhe. Plazma odražava kratkotrajnu razinu selenija, dok eritrociti odražavaju dugoročnu razinu selenija u organizmu. Međutim, koncentracije selenija u krvi pod utjecajem su kemijskog oblika konzumiranog selenija kao rezultat različite apsorpcije i zadržavanja svakog od oblika selenija. Također se u svrhu određivanja razine selenija u organizmu mogu koristit nokti na nogama ili kosa, iako je upotreba kose ograničena zbog šampona koji sadržavaju selenij. Urin se može koristit i za procjenu razine selenija i za ukupni selenij unesen hranom. Za određivanje ukupnog selenija unesenog hranom, urin se prikuplja dva puta dnevno. Bliska veza između krvi, aktivnosti glutation peroksidaze crvenih krvnih stanica te koncentracije selenija korisna je za procjenu koncentracije selenija kod ljudi s niskom koncentracijom istog. Najveća aktivnost glutation peroksidaze crvenih krvnih stanica je pri koncentraciji selenija 100 μg/L i više. Nedavno se u svrhu mjerenja koncentracije selenija počeo koristiti i selenoprotein-P, a postoji i mogućnost korištenja ostalih enzima kao funkcionalnih markera. Međutim, njihova upotreba je za sada ograničena nedostatkom jednostavnih tehnika za ispitivanje. Zaključci dobiveni mjerenjem jednog selenoproteina ne mogu se primijeniti na sve biološke funkcije selenija zbog razlika u reakcijama tkiva i selenoproteina na nedostatak, optimalnu koncentraciju i visoke koncentracije selenija u organizmu. U skladu s tim, smatra se da ne postoji jedan pokazatelj funkcionalnog statusa selenija, već niz markera koji se trebaju ispitati. Sve to dodatno kompliciraju učinci interaktivnih čimbenika kao što su bjelančevine, metionin, polinezasićene masne kiseline, vitamin E, drugi elementi u tragovima te teški metali [7].

2.12. Analitičke tehnike za određivanje selenija

U ovom ulomku ukratko će biti opisane analitičke tehnike koje se koriste za detekciju, mjerenje ili praćenje selenija, njegovih metabolita i drugih biomarkera koji su povezani s izloženšću seleniju i njegovim utjecajem. Mnoge analitičke tehnike koje se koriste za analizu uzoraka iz okoliša su metode koje su odobrile savezne agencije i organizacije kao što su Agencija za zaštitu okoliša (*Environmental Protection Agency*, EPA) i Nacionalni institut za zaštitu na radu (*National Institute of Occupational Safety and Health*, NIOSH). Ostale tehnike su odobrene od strane raznih skupina kao što je Udruženje službenih analitičkih kemičara (*Association of Official Analytical Chemists*, AOAC). Također se nastoje modificirati i nadograditi već postojeće tehnike kako bi se dobile metode za mjerenje nižih granica detekcije te poboljšanje preciznosti i točnosti [28].

Ukoliko nije potrebno identificirati specifični spoj selenija, uzorkovanje biološkog materijala za određivanje ukupne koncentracije selenija ne predstavlja problem. Izuzetak je naime prikupljanje i skladištenje urina bez gubitka hlapljivih spojeva selenija. Ukoliko se ne poduzmu određene mjere opreza, postoji mogućnost dobivanja krivih podataka o koncentraciji selenija. Idealno bi bilo mjeriti koncentraciju selenija u 24-satnim uzorcima urina koji su pohranjeni u polietilenske posude i u kiselom mediju. Kod krvi, ako se selenij mjeri u svakoj komponenti odvojeno, prije zamrzavanja potrebno je odvojiti plazmu i krvne stanice. Preporučljivo je zamrzavanje bioloških uzoraka odmak nakon prikupljanja kako bi se smanjilo enzimsko stvaranje hlapljivih spojeva selenija [28].

Za određivanje selenija u vodi, zraku i tlu koriste se iste metode kao i za određivanje selenija u biološkim uzorcima. Pažnju treba obratiti prilikom prikupljanja uzoraka i pohrane istih kako ne bi došlo do gubitaka hlapljivih spojeva selenija. Prije samog mjerenja gotovo uvijek je potrebno razoriti organske tvari u uzorku. Vodene uzorke je potrebno zakiseliti do pH 1,5 kako bi se sačuvali spojevi selenija te ih je najbolje pohraniti u staklene spremnike na temperaturu od 4° C. Kod određivanja selenija u ekološkim uzorcima analitičke metode se mogu podijeliti u dvije skupine. U prvu skupinu pripadaju metode u kojima nije potrebno razaranje organskih tvari u uzorku kao što su fluorescencija X-zrakama i neke analize temeljene na aktivaciji neutrona, a u drugu skupinu pripadaju one metode u kojima je to potrebno. U drugu skupinu ubrajaju se sljedeće metode: spetrofotometrija, plinska kromatografija, atomska apsorpcijska spektrometrija, polarografija, masena spektrometrija, fluorimetrija te neke analize temeljene na aktivaciji neutrona [28].

Mnoge analitičke metode se upotrebljavaju za određivanje koncentracije selenija u tragovima (ng/g). Te metode obuhvaćaju fluorimetriju, analizu aktivacije neutrona (NAA), atomsku emisijsku spektroskopiju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES), atomsku apsorpcijsku spektroskopiju (AAS), masenu spektroskopiju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS), plinsku kromatografiju (GC), spektrofotometriju i druge metode [28].

2.12.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Klasične AAS tehnike s plamenom nemaju dovoljno niske granice detekcije za selenij da bi se mogle koristiti za određivanje prisutnosti selenija u biološkim uzorcima. Iz tog razloga, metoda je modificirana.

Tako se za određivanje selenija u biološkim uzorcima kao što su krv, urin, meso, voće i povrće koristi atomska apsorpcijska spektroskopija s nastankom hidrida (HGAAS). Ova metoda se koristi i za analizu ekoloških uzoraka kao što su uzorci vode (svježa, morska, riječna i površinska voda te otpadne vode), mulj, sedimenti te uzorci tla. HGAAS zahtjeva veći volumen uzorka, ali i nudi smanjenje kemijskih interferencija. Najčešće se koristi za određivanje selenija u hrani. Za razaranje organske tvari koristi se mokra digestija uzorka pomoću perklorne i dušične kiseline. Umjesto perklorne kiseline može se koristiti i fosforna, pošto je perklorna kiselina potencijalno eksplozivna. Kako bi se Se (VI) reducirao u Se (IV) potrebno je koristiti natrijev borhidrid kako bi se sav selenij preveo u selenijev hidrid. Selenijev hidrid se termički razgrađuje i atomizira u atomskom apsorpcijskom spektrofotometru. Kako bi se uzorak tijekom digestije razgradio, potrebno je koristiti temperaturu od najmanje 200° C [28].

Atomska apsorpcijska spektroskopija s grafitnom peći (GFAAS) nudi visoku osjetljivost, ali analizu mogu ometati interferenti u matriksu. GFAAS metoda zasniva se na tome da brojni spojevi metala reagiraju sa selenijem i stvaraju relativno stabilne metalne selenide. Često se uzorku dodaju nikal, molibden i platina kako bi se postigla termička stabilizacija selenija. Prije same atomizacije, organski materijal se uništava na vrlo visokim temperaturama (npr. 2700° C). Prednost ove metode je što se materijal u grafitnoj peći može kemijski obraditi *in situ* kako bi se broj interferenata smanjio. GFAAS metoda zahtjeva korekciju pozadinske apsorpcije. Te korekcije postižu se pomoću kontinuiranog deuterijeva izvora svjetla ili cijepanja Zeemanove apsorpcijske linije. Korekcije su izuzetno važne prilikom određivanja selenija u krvi, jer su spektralne linije nastale od iona željeza veoma bliske valnoj duljini selenija [28].

2.12.2. Atomska emisijska spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom

ICP-AES sa stvaranjem hidrida koristi se za određivanje ukupnog selenija u biološkim uzorcima. Metoda je posebno prikladna za analizu malih uzoraka. Uzorci se prevode u pepeo mokrim putem pomoću dušične, perklorne ili sumporne kiseline na temperaturi od 310° C. Nakon tretiranja klorovodičnom kiselinom, selenij se pomoću natrijeva borhidrida reducira u vodikov selenid u jednostavnom kolektoru kontinuiranog protoka. Standardno penumatski raspršivač utječe na razdvajanje plin-tekućina vodikova selenida. Kvantikacija se odvija pomoću ICP-AES pri 196,090 nm, a granica detekcije ove metode iznosi 0,4 μg/L. Za mjerenje selenija u zraku, koristi se ICP-AES s argonom. Prednost ove metode je mogućnost mjerenja više elemenata, a nedostaci su što je skupa i postoji mogućnost pojave interferencije pozadine [28].

2.12.3. Kromatografija

Primjena plinsko-tekućinske kromatografije (GLC) za određivanje selenija u biološkim uzorcima omogućuje uklanjanje interferenata iz biološkog matriksa. Potrebno je prethodno razoriti organske tvari pomoću dušične kiseline. GLC tehnike temelje se na mjerenju količine piazselenola nastalog reakcijom selenija (IV) s odgovarajućim reagensom u kiselom mediju. Za plinsko kromatografsku detekciju selenija pomoću detektora elektronskog zahvata, mogu se koristiti 1,2-diaminoareni za nastanak piazselenola. Ukoliko se koristi 1,2-diamino-3,5-dibrombenzen kao reagens, granica detekcije iznosi 10^{-9} g selenija po gramu uzorka [28].

Plinska kromatografija razrjeđivanja izotopa spregnuta s masenom spektrometrijom (IDGC/MS) vrlo je precizna metoda za određivanje selenija u hrani, plazmi i serumu, crvenim krvnim stanicama, majčinom mlijeku i urinu. Minimalna količina uzorka potrebna za ovu metodu je 0,5-10 g, odnosno 0,5-10 mL. Kod ove metode, uzorku se dodaje stabilan izotop selenija prije nego se započne s digestijom. Tim postupkom uklanja se potreba za kvantitativnom pripremom uzorka i vanjskom standardizacijom. Nedostatak ove metode je što su standardi izotopa skupi [28].

2.12.4. Analiza aktivacije neutrona

Metoda analize aktivacije neutrona ima nisku granicu detekcije selenija, a ona iznosi između 10^{-8} i 10^{-9} grama selenija po gramu uzorka. Nedostatak je što je dostupno malo NAA objekata i stručnog osoblja koje zna raditi na metodi. Najčešći NAA postupak za određivanje selenija je proizvodnja dugovječnog ^{75}Se radionuklida. Kada ga se doda u uzorak, njegova količina se određuje nakon 50-100 sati ozračenosti. Brža NAA metoda koristi metastabilni ^{77m}Se izotop.

Uobičajeni standardni referentni uzorak za NAA metodu je goveđe jetreno tkivo. Neka od bioloških tkiva koja se mogu analizirati NAA metodom su kosti, kosa, jetra, pluća, bubrezi, krv, mozak, srce, štitnjača, slezena, mišići i fekalije. Kako bi se izbjegle interferencije prilikom mjerenja često je potrebna destruktivna prethodna obrada uzoraka, koja uključuje radiokemijsko odvajanje. Prednosti ove metode su niske granice detekcije i mogućnost detekcije više elemenata.

2.12.5. Fluorimetrijske metode

Fluorimetrijske metode se, u slučaju određivanja selenija, zasnivaju na nastanku heterocikličkih produkata Se-DAN ili Se-DAB. Ovi spojevi nastaju prilikom reakcije Se (IV) s 2,3-diaminonaftalenom (DAN) ili s 3,3-diaminobenzidinom (DAB). Piazselenol nastao u reakciji s DAN-om ima veću fluorescentnu osjetljivost od piazselenola nastalog u reakciji s DAB-om. Se-DAN kompleks se lako ekstrahira u organska otapala iz kisele otopine. Fluorimetrijske metode zahtijevaju digestiju uzoraka kako bi se razorio organski dio te se selenij reducirao iz Se (VI) oblika u Se (IV) oblik. Međutim, tijekom digestije postoji mogućnost gubitka hlapljivih selenijevih spojeva. Metoda je modificirana u procesu digestije što je rezultiralo smanjenjem potrebne količine uzorka, a mogu se mjeriti i submikrogramske količine selenija u uzorcima [28].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Određivanje selenija

U ovom radu selenij je određivan iz biološkog uzorka, odnosno iz jaja. Određivan je iz žumanjka i bjelanjka. Koncentracija selenija određena je fluorimetrijskom metodom. Kao fluorescentni marker korišten je 2,3-diaminonaftalen (DAN). DAN je veoma osjetljiv na svjetlost te ga je potrebno čuvati u tamnoj bočici, a reakcije izvoditi u što je više moguće mračnijim uvjetima. Koncentracija selenija, odnosno intenzitet fluorescencije Se-DAN kompleksa mjeren je fluorimetrom. Puni naziv uređaja je modularni čitač mikrotitar pločica (Slika 7.). Kao izvor svjetla za mjerenje fluorescencije korištena je ksenonska lampa visoke energije, a detektor su fotomultiplikatorske cijevi. Raspon spektra za eksitaciju iznosi 230-90 nm, a za emisiju 280-900 nm. Granica detekcije uređaja je < 1 ng/µL. Mjerenje traje oko 2 minute, a uređaj ima mogućnost automatizacije.



Slika 7. Modularni čitač mikrotitar pločica

3.2. Kemikalije i instrumentacija

U izradi eksperimentalnog dijela ovog rada koristile su se sljedeće kemikalije:

- koncentrirana dušična kiselina (HNO_3, T.T.T., Hrvatska)

- koncentrirani vodikov peroksid (H_2O_2, Gram-Mol, Hrvatska)

- standardna otopina selenija koncentracije 0,001 g/L (Carlo Erba, Italija)

- metiloranž (Kemika, Hrvatska)

- otopina kompleksa EDTA (BDH Prolabo, UK)

- $HONH_2 \cdot HCl$ (Acros Organics, Belgija)

- otopina amonijaka (NH_3, 25%, Gram-Mol, Hrvatska)

- otopina klorovodične kiseline (HCl, Carlo Erba, Italija)

- univerzalni indikatorski papir (LLG, Njemačka)

- otopina 2,3-diaminonaftalena (DAN, Alfa Aesar, Njemačka)

- cikloheksan (BDH Prolabo, UK)

- heptan (BDH Prolabo, UK)

- smjesa heptana i *n*-butil-acetata (Fisher Scientific, UK)

- standard NCS ZC73016 (*China National Analysis Center for Iron and Steel, Beijing China*)

- jaja

- destilirana voda

- ultra čista voda.

Tijekom izvedbe eksperimenta koristila se slijedeća instrumentacija:

- analitička vaga

- sustav za mikrovalnu digestiju MARS 6 One Touch (CEM)

- kivete Xpress Plus

- falkonice (15mL)

- pipeta za doziranje (10-100 μL)

- pipeta za doziranje (100-1000 μL)

- pipeta za doziranje (5 mL)

- pipeta

- propipeta

- odmjerne tikvice

- lijevak za odjeljivanje

- menzura

- lijevak

- laboratorijske čaše

- vorteks

- kapalice

- vijalice

- folija

- ultrazvučna kupelj

- magnetska miješalica s grijačem

- mikrotitar pločice

- modularni čitač mikrotitar pločica (Instrument Spark 10M) uz pripadajući program Sparkkontrol.

3.3. Priprema otopina

3.3.1. Priprema standardne otopine selenija

U 3-5 mL koncentrirane dušične kiseline otopi se 1 gram krutog selenija. Sadržaj se prelije u tikvicu od jedne litre te nadopuni do oznake ultra čistom vodom. Tako pripremljena otopina ima koncentraciju selenija 1 g/L. Kako bi se dobila potrebna koncentracija od 0,001 g/L, otopina se razrijedi.

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

Odvaže se 1 g EDTA i 2,5 g $HONH_2 \cdot HCl$ te se otope u ultra čistoj vodi. Kada se sadržaj potpuno otopi, otopina u tikvici se nadopuni do oznake. Volumen tikvice je 100 mL.

3.3.3. Priprema otopine 2,3-diaminonaftalena

Pošto je 2,3-diaminonaftalen (DAN) osjetljiv na svijetlost te se prilikom djelovanja iste raspada, pripremu je potrebno izvoditi u što većem mraku. Najprije se odvaže 0,1 gram 2,3-diaminonaftalena te ga se otopi u 50 mL prethodno priređene otopine klorovodične kiseline koncentracije 0,1 M u odmjernoj tikvici od 100 mL. Otapanje se odvija uz grijanje na otprilike 60° C uz mućkanje. Po potrebi koristiti ultrazvučnu kupelj. Kada se cijeli DAN otopi i otopina se ohladi, nadopuni se preostalom kiselinom do oznake. Otopina se zatim prebaci u lijevak za odjeljivanje te se ekstrahira 3 puta s po 20 mL cikloheksana kako bi se uklonile nečistoće (Slika 8). Tijekom ekstrakcije cikloheksanski, organski, sloj je gore. Skuplja se donji dio u kojemu se nalazi DAN, a cikloheksanski sloj se baca u boce za organski otpad. Nakon treće ekstrakcije, sadržaj se direktno iz lijevka ispušta u čistu zatamnjenu tikvicu. Tikvica se još po potrebi omota folijom i čuva na hladnom i u mraku.



Slika 8. Prikaz ekstrakcije DAN-a s cikloheksanom u lijevku za odjeljivanje

3.3.4. Priprema 1 M otopine klorovodične kiseline

w(HCl) = 37%

ρ(HCl) = 1,18 g/cm^3

c_2(HCl) = 1 mol/L

V_2(HCl) = 100 mL

M(HCl) = 36,46 g/mol

$$c_1\,(HCl) = \frac{w \times \rho}{M(HCl)} = \frac{0{,}37 \times 1{,}18\ g/ml}{36{,}46\ g/mol} = 0{,}01197\,\frac{mol}{mL} = 11{,}97\ mol/L \qquad (2)$$

$$V_1\,(HCl) = \frac{c_2(HCl) \cdot V_2(HCl)}{c_1(HCl)} = \frac{1\ mol/L \times 100\ mL}{11{,}97\ mol/L} = 8{,}35\ mL \qquad (3)$$

Otopina klorovodične kiseline koncentracije 1 mol/L pripremi se tako da se odpipetira 8,35 mL koncentrirane klorovodične kiseline, prelije u odmjernu tikvicu te nadopuni destiliranom vodom do oznake (100 mL).

3.3.5. Priprema 0,1 M otopine klorovodične kiseline

c_1(HCl) = 11,97 mol/L

V_2 = 100 mL

$$V_1\,(HCl) = \frac{c_2(HCl)\cdot V_2(HCl)}{c_1(HCl)} = \frac{0{,}1\ mol/L \times 100\ mL}{11{,}97\ mol/L} = 0{,}8354\ mL \qquad (4)$$

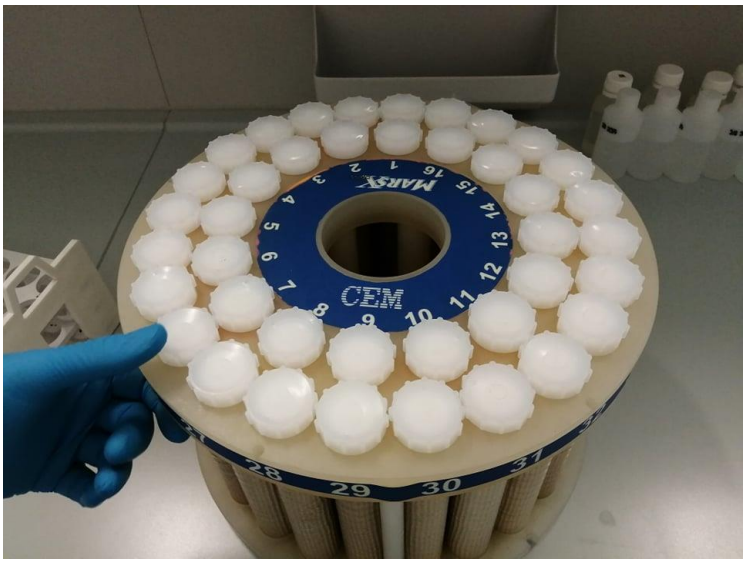
Otopina klorovodične kiseline koncentracije 0,1 mol/L (0,1 M) priprema se da se 0,8354 mL koncentrirane klorovodične kiseline razrijedi sa 100 mL destilirane vode.

3.4. Digestija uzoraka jaja

Ispitivanja koncentracije selenija u ovom radu vršena su na uzorcima jaja. Za mjerenje je korišteno 6 jaja, 3 domaća i 3 kupovna jajeta. Posebno su se u falkonice od 50 mL odvojili žumanjak i bjelanjak te je svaka posebno označena odgovarajućom oznakom. Nakon toga su uzorci vorteksirani kako bi se olakšalo vaganje. Vagano je 1 gram svakog uzorka, te je na kraju bilo 12 uzoraka jaja. Radi usporedbe s podacima, vagan je i standard NCS ZC73016 u kojemu je točno poznata koncentracija selenija, a ona iznosi 0,49 ± 0,06 mg/kg. Izvagani uzorci prebačeni su u kivete za mikrovalnu digestiju. Uzorci su preliveni sa 6 mL dušične kiseline (65%) i 2 mL vodikovog peroksida (30%). Kao instrument za mikrovalnu digestiju korišten je sustav za mikrovalnu digestiju (eng. *Microwave Digestion System*) MARS 6 One Touch (CEM) (Slika 9.). Ovaj sustav za mikrovalnu digestiju ima držač za 40 kiveta (Slika 10.), odnosno može vršiti digestiju na 40 uzoraka istovremeno. Snaga ovog sustava je 1200 W. Digestija se izvodi pri temperaturi od 180-200° C i traje sat i pol uz hlađenje. Nakon što je digestija završena i uzorci ohlađeni, svaki je prebačen u falkonicu od 15 mL uz minimalno razrjeđenje. Konačni volumen uzorka iznosio je 10 mL (Slika 11.).



Slika 9. Sustav za mikrovalnu digestiju MARS 6 One Touch



Slika 10. Držač za kivete za sustav za mikrovalnu digestiju MARS 6^{TM} One Touch



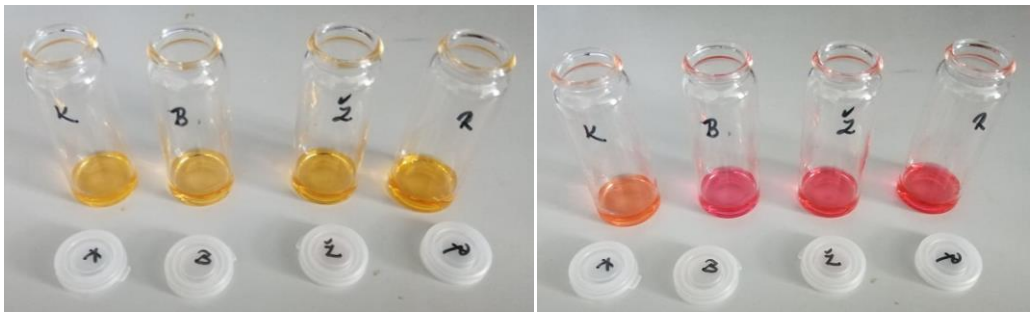
Slika 11. Falkonice od 15 mL

3.5. Kalibracija sa standardnom otopinom selenija i priprema uzoraka za mjerenje

Kalibracija sa standardnom otopinom selenija izvodila se prilikom svakog mjerenja. Kalibracija i mjerenja izvođena su sa tri različita otapala, sa cikloheksanom, heptanom i smjesom heptana s 3%-*n*-butil acetatom. Pri svakom mjerenju, korišten je i referent radi provjere točnosti.

Najprije se priredi i označi sva potrebna aparatura i kemikalije. Zatim se u jednu vijalicu pipetira 0,5 mL standardne otopine selenija (c = 0,001 g/L), a u ostale 0,5 mL uzorka. Zatim se dodaje EDTA-$HONH_2$·HCl kako bi se uklonile moguće zaostale nečistoće. U svaku vijalicu doda se po jedna kap metiloranža. Nakon toga se dodaje kap po kap otopine amonijaka (25%) dok se boja iz narančastog ne promjeni u žuto (Slika 12.), a zatim kap po kap otopine klorovodične kiseline (c = 1 M) do promjene boje u ružičasto (Slika 12.). Nakon ovog postupka pH otopine trebao bi biti oko 3, a to se lako može provjeriti upotrebom univerzalnog indikatorskog papira. Nakon podešavanja pH otopini se dodaje 5 mL DAN-a. Od tog trenutka pa nadalje treba raditi brzo i u polumraku kako ne bi došlo do raspada kompleksa i samim time do dobivanja krivih rezultata o koncentraciji selenija u uzorku. Nakon dodatka DAN-a, vijalicu se stavi na vorteks oko 30 sekundi kako bi se sve dobro izmiješalo. Poslije toga vijalice se omotaju folijom i stave u vodenu kupelj na grijanje. Temperatura vodene kupelji treba biti 60° C te se zagrijava 20 minuta (Slika 13.). Otopina se zagrijava pri toj temperaturi jer je to temperatura na kojoj se stvara kompleks selenij-DAN (Se-DAN). Nakon zagrijavanja, vijalice se izvade iz kupelji i ohlade pod mlazom hladne vode. Zatim se doda 5 mL otapala (cikloheksan, heptan, smjesa heptana s 3%-*n*-butil acetatom) te se smjesa vorteksira 90 sekundi kako bi se kompleks ekstrahirao u otapalo. Nakon vorteksiranja, otopina se ostavi kako bi se razdvojili slojevi (Slika 14.). Kompleks Se-DAN nalazi se u gornjem prozirnom sloju te se iz tog sloja pažljivo odpipetira određeni volumen i prebacuje u jažice mikrotitar ploče (Slika 15.). Preferirano se najprije u jažice dodaje otapalo, pa tek onda uzorak kako bi gubitci uzorka bili minimalni. Svaka jažica ima volumen od 340 μL, a otapalo s uzorkom zauzima volumen od 300 μL. U Tablici 1. prikazani su dodani volumeni otapala i otopine uzorka s kompleksom Se-DAN. Nakon što su jažice popunjene, mikrotitar ploča se poklopi kako bi se spriječilo isparavanje otapala, te je uzorak spreman za mjerenje fluorescencije. Pločica se stavi u uređaj te se odaberu program i uvjeti u kojima se želi mjeriti fluorescencija. Prije mjerenja, uređaj linearno promiješa uzorke.

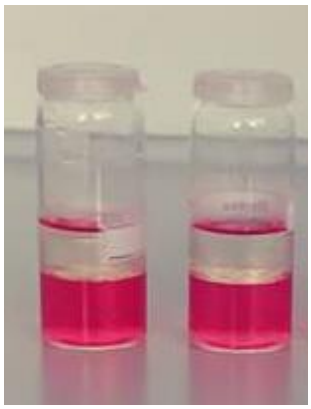
Temperatura u uređaju je između 20-25° C, a valne duljine pri kojima se odvijaju emisija i ekscitacija iznose 522 nm i 382 nm.



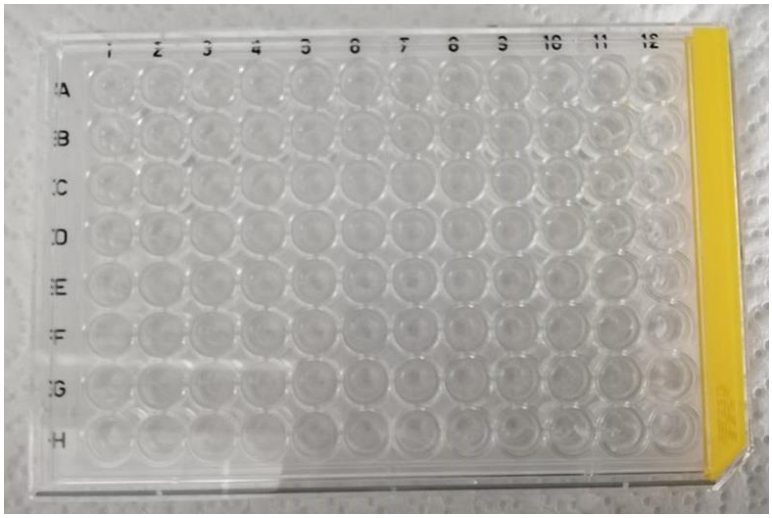
Slika 12. Otopina standardne otopine selenija, uzorka i referenta nakon dodatka amonijaka (žuto) i nakon dodatka klorovodične kiseline (ružičasto)



Slika 13. Prikaz grijanja otopina pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa Se-DAN



Slika 14. Prikaz otopine nakon dodatka otapala. U gornjem prozirnom sloju se nalazi Se-DAN kompleks



Slika 15. Mikrotitar pločica

Tablica 1. Prikaz dodanih volumena otapala i otopine Se-DAN kompleksa u jažice mikrotitar ploče

Oznaka jažice	*c* (Se za kaibraciju) / ng/mL	*V* (Se nakon postupka) / μL	*V* (otapalo) / μL
A	0	0	300
B	10	30	270
C	20	60	240
D	30	90	120
E	40	120	180
F	50	150	150
G	60	180	120
H	70	210	90

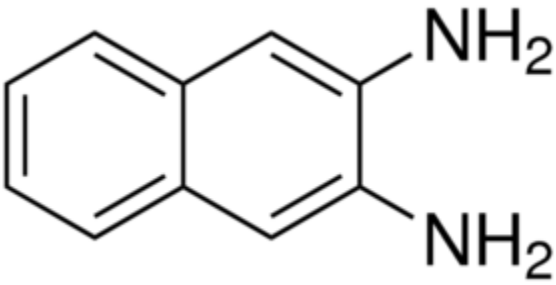
3.6. Ispitivanje utjecaja nitrata na odzive

Priređeno je šest otopina, dvije *blank* otopine koje su sadržavale dušičnu, odnosno nitratnu, kiselinu i četiri koje su sadržavale standardnu otopinu selenija i dodatak dušične kiseline. Pri korištenju otopine dušične kiseline koncentracije koja odgovara stehiometrijskom odnosu i koncentracije 2x veće u odnosu na stehiometrijski odnos, selenij se nije otapao. Stoga su korištene otopine dušične kiseline pripremljene tako da imaju 5x i 10x veću koncentraciju u odnosu na stehiometrijski odnos. Otopina dušične kiseline s 5x većom koncentracijom pripremljena je tako da se 4,32985 mL 65% dušične kiseline razrijedi destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 100 mL, a za pripravu otopine s 10x većom koncentracijom bilo je potrebno na 100 mL razrijediti 8,6597 mL 65% dušične kiseline. Dvije otopine selenija pripremljene su tako da se u jednu dodala otopina s 5x većom koncentracijom dušične kiseline, a u drugu otopina s 10x većom koncentracijom dušične kiseline. Postupak pripreme za mjerenje je isti kao postupak opisan u poglavlju 3.5..

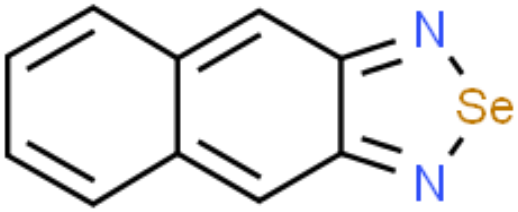
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fluorimetrijsko određivanje selenija

Uzorci u kojima se ispitivala koncentracija selenija su biološkog porijekla. Koncentracija selenija je mjerena u uzorcima jaja. Korištene su dvije skupine jaja, odnosno domaća i kupovna jaja. Mjerenja su vršena posebno na uzorcima žumanjaka i bjelanjaka od svake skupine. Koncentracija selenija određena je fluorimetrijskom metodom. Budući da je fluorimetrijska metoda zasnovana na fluorescenciji uzorka, a selenij nema tu sposobnost, bilo je potrebno vezanje na odgovarajući fluorescirajući marker. Marker koji je korišten za vezanje selenija je 2,3-diaminonaftalen (DAN) (Slika 16.), a spoj koji nastaje vezanjem selenija na DAN naziva se piazselenol (Slika 17.). Na taj način je omogućeno praćenje i određivanje selenija u uzorku. Optimalan pH za stvaranje kompleksa je 3. Tijekom eksperimenta otopini se dodaje EDTA-$HONH_2 \cdot HCl$ kako bi se uklonilo nečistoće, odnosno interferente koji mogu ometati signal mjerenja selenija. Također se provodi zakiseljavanje klorovodičnom kiselinom kako bi se Se^{6+} reducirao u Se^{4+}. Ovaj korak je važan jer DAN selektivno reagira samo sa Se^{4+} te tako tvori kompleks.



Slika 16. Struktura 2,3-diaminonaftalena [29]



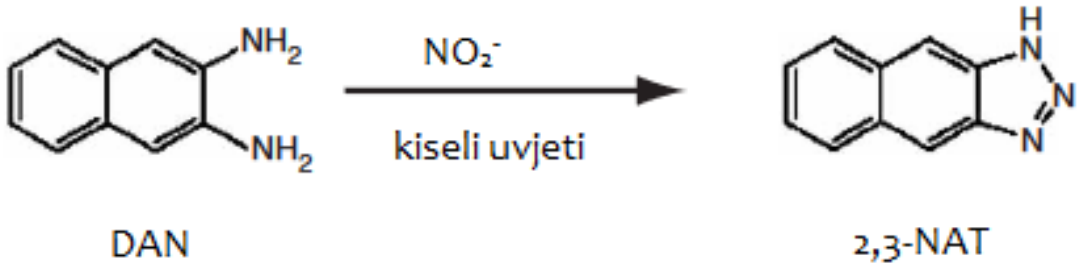
Slika 17. Struktura piazselenola [30]

4.2. Ispitivanje utjecaja nitrata

DAN se koristi kao fluorescentni marker i za određivanje nitrata fluorimetrijskom metodom. S obzirom na to, postojala je mogućnost vezanja nitrata na DAN uz selenij budući da se otopina selenija priređuje u dušičnoj kiselini te se i prilikom digestije koristi dušična kiselina. Fluorescirajući spoj koji nastaje vezanjem nitrata, odnosno nitrita, na DAN naziva se 2,3-naftotriazol (2,3-NAT). Nitrati se najprije reduciraju u nitrite (Slika 18.), a zatim se nitriti vežu na DAN te tvore fluorescentni kompleks 23-NAT (Slika 19.).

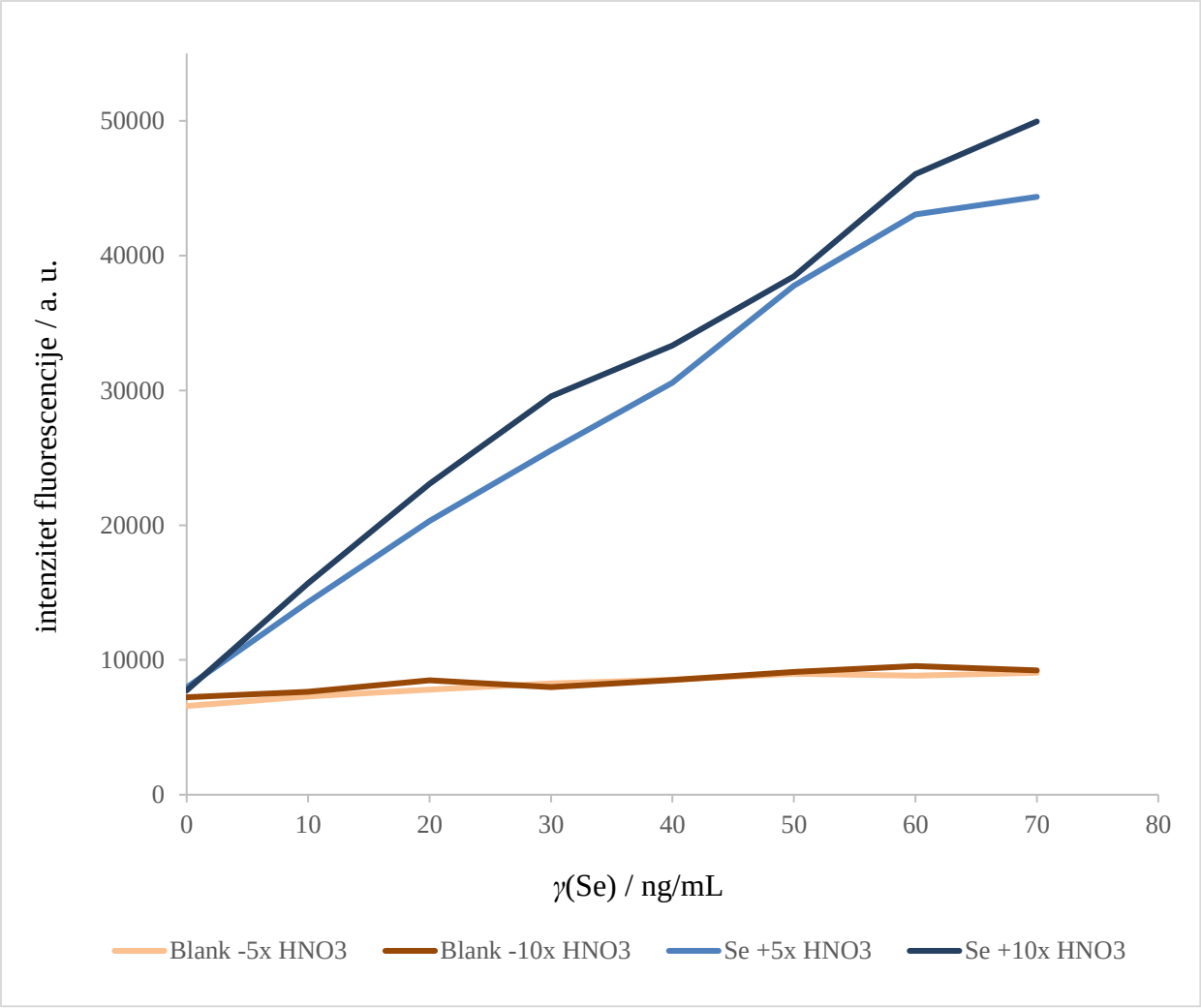


Slika 18. Redukcija nitrata u nitrite [31]



Slika 19. Vezanje nitrita na DAN u kiselim uvjetima te nastanak 2,3-natrotriazola [32]

Na slici 20. prikazan je grafički prikaz mjerenja utjecaja nitrata na određivanje selenija.



Slika 20. Grafički prikaz mjerenja utjecaja nitrata na određivanje selenija

S obzirom na minimalne razlike između kalibracijskih krivulja dobivenih korištenjem otopina selenija s 5x i 10x većom koncentracijom dušične kiseline od one koja odgovara stehiometrijskom odnosu te da nema signala prilikom mjerenja provedenih koristeći samo otopine dušične kiseline (*blank*) za jednu i drugu koncentraciju, utvrđeno je da nitrati nemaju utjecaja pri mjerenju koncentracije selenija.

4.3. Kalibracija

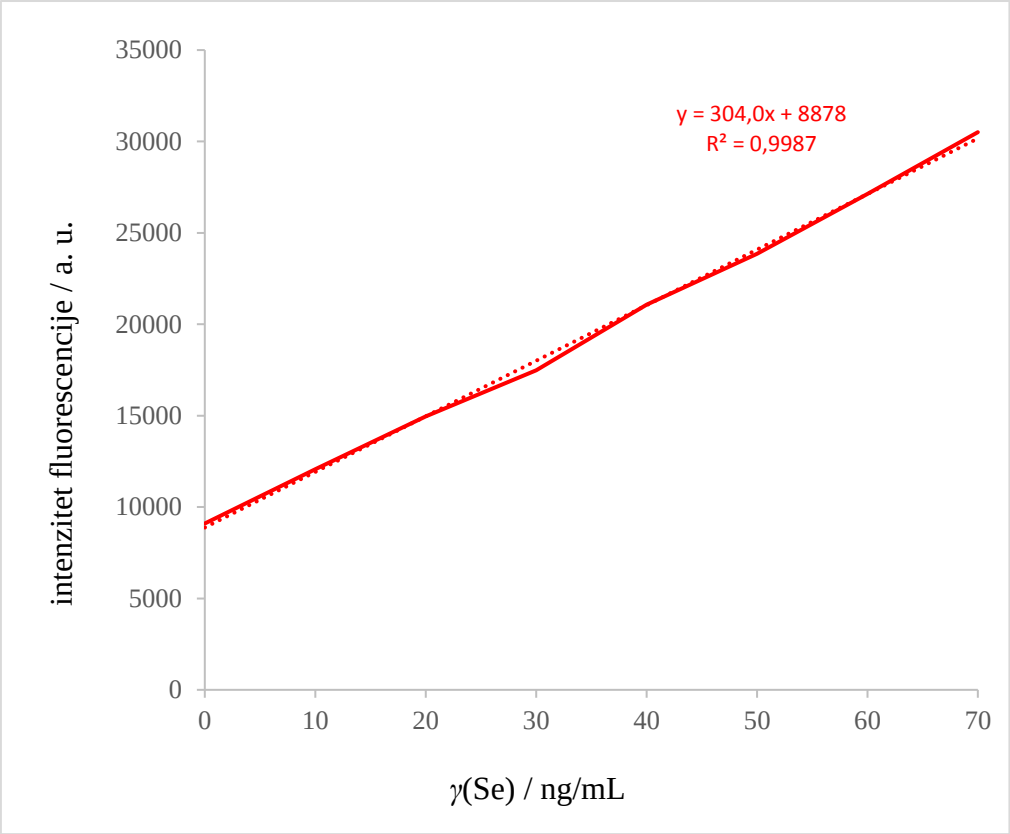
Kalibracije su rađene sa standardnom otopinom selenija i uz tri otapala kako bi se ispitalo koje najmanje isparava te u kojem se kompleks Se-DAN najbolje ekstrahira. Otapala koja su korištena za kalibraciju su cikloheksan, heptan i smjesa heptana s 3%-*n*-butil acetatom. Sva mjerenja odrađena su u tri ponavljanja. Krivulje na grafovima predstavljaju prosjek tri ponavljanja.

4.3.1. Kalibracija standardne otopine selenija s cikloheksanom kao otapalom

Mjerenja su provedena uz cikloheksan kao otapalo. Tablica 2. prikazuje rezultate mjerenja, a slika 21. prikazuje dobivenu kalibracijsku krivulju.

Tablica 2. Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala za standardnu otopinu selenija u cikloheksanu kao otapalu

c (Se) / ng/mL	Intenzitet signala u cikloheksanu / a. u.
0	9099
10	12063
20	14966
30	17482
40	21065
50	23857
60	27126
70	30506



Slika 21. Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN u cikloheksanu kao otapalu

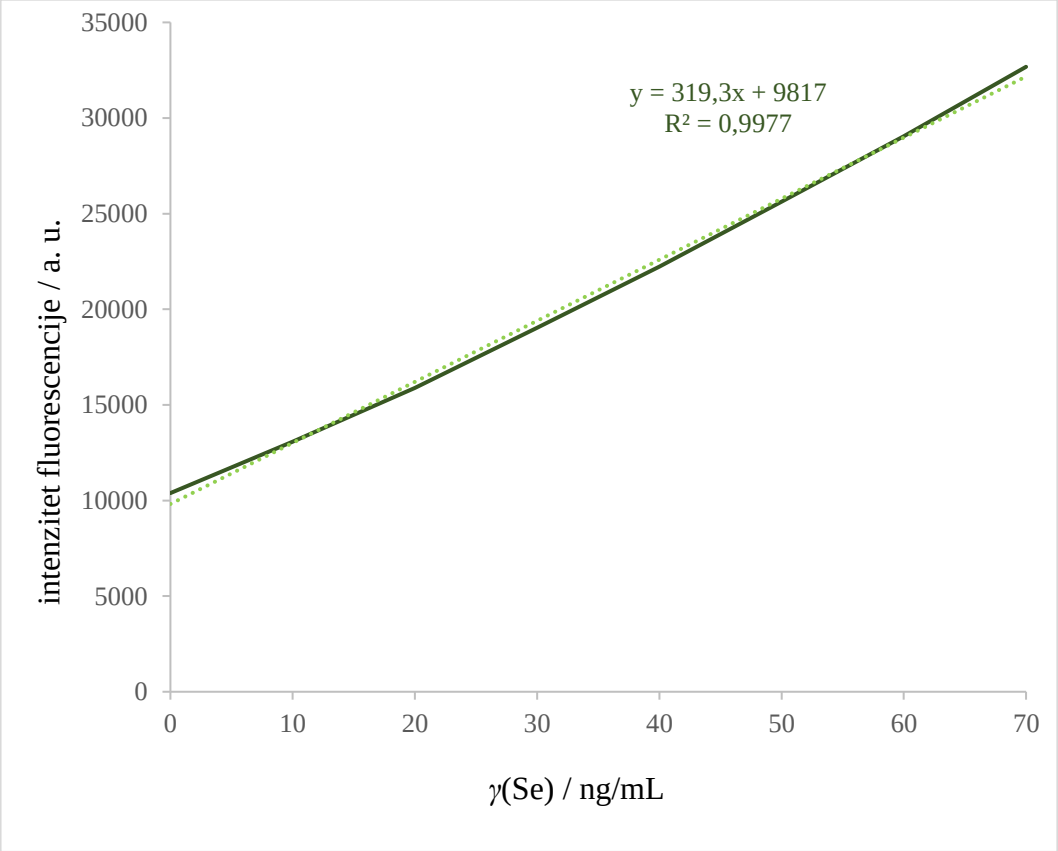
Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je kalibracijska krivulja linearna u cijelom ispitanom području te da je koeficijent korelacije (R^2), koji iznosi 0,9987, zadovoljavajući. Vidljivo je i kako nema većih odstupanja pri mjerenju.

4.3.2. Kalibracija standardne otopine selenija s heptanom kao otapalom

Mjerenja su provedena uz heptan kao otapalo. Tablica 3. prikazuje rezultate mjerenja, a na slici 22. je vidljiva dobivena kalibracijska krivulja.

Tablica 3. Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala za standardnu otopinu selenija u heptanu kao otapalu

c (Se) / ng/mL	Intenzitet signala u heptanu / a. u.
0	10387
10	13080
20	15879
30	19036
40	22227
50	25621
60	29037
70	32677



Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN u heptanu kao otapalu

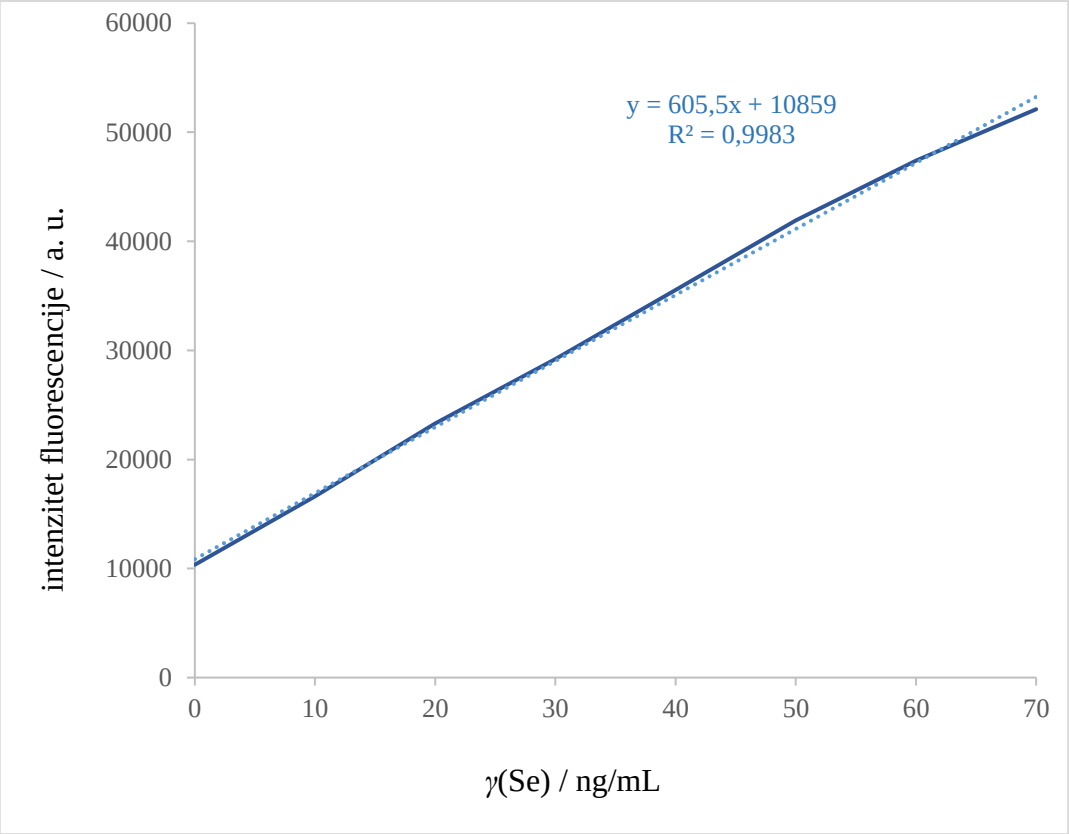
Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je kalibracijska krivulja linearna u cijelom ispitanom području te da je koeficijent korelacije (R^2), koji iznosi 0,9977, zadovoljavajući. Vidljivo je i kako nema odstupanja pri mjerenju.

4.3.3. Kalibracija standardne otopine selenija sa smjesom heptana i 3%-*n*-butil-acetata kao otapalom

Mjerenja su provedena uz smjesu heptana i 3%-butil-acetata kao otapala. Tablica 4. prikazuje rezultate mjerenja, a na slici 23. je vidljiva dobivena kalibracijska krivulja.

Tablica 4. Prikaz dobivenih vrijednosti intenziteta signala za standardnu otopinu selenija u smjesi heptana i 3%-*n*-butil-acetata kao otapalu

c (Se) / ng/mL	Intenzitet signala u smjesi / a. u.
0	10346
10	16601
20	23294
30	29189
40	35540
50	41926
60	47405
70	52113

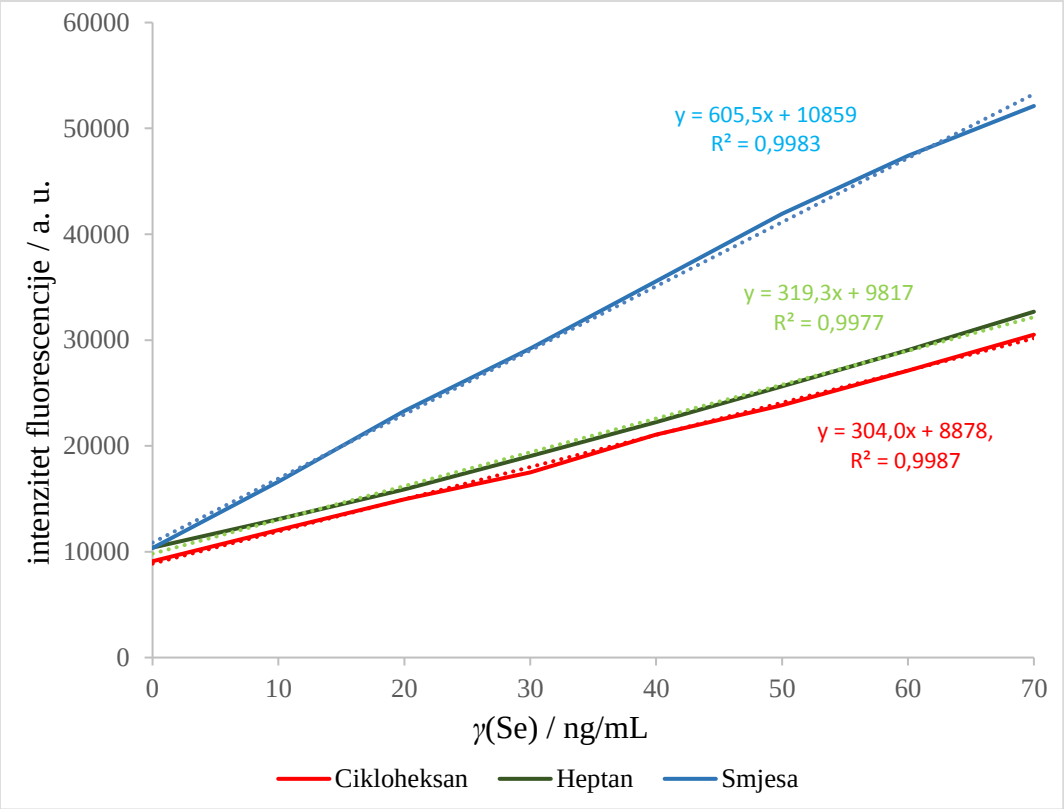


Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN u smjesi heptana i 3%-butil-acetata kao otapalu

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je kalibracijska krivulja linearna u cijelom ispitanom području te da je koeficijent korelacije (R^2), koji iznosi 0,9983, zadovoljavajući. Vidljivo je i kako nema većih odstupanja pri mjerenju.

4.3.4. Usporedba kalibracijskih krivulja standardne otopine selenija u sva tri otapala

Na slici 24. prikazana je grafička usporedba kalibracijskih krivulja selenija dobivenih koristeći sva tri ispitana otapala. Iz grafičkog prikaza je vidljivo da kalibracijski pravac dobiven nakon ekstrakcije u smjesi heptana i 3%-*n*-butil-acetata ima najveći nagib što upućuje na veću osjetljivost metode koristeći to otapalo.



Slika 24. Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji selenija u kompleksu Se-DAN u cikloheksanu, heptanu i smjesi heptana i 3%-*n*-butil-acetata kao otapalu

4.4. Usporedba određivanja selenija u referentu u tri otapala

Kao referentni uzorak korišten je standard NCS ZC73016 u kome je koncentracija selenija poznata, a iznosi 0,49 ± 0,06 μg/g. Referent je korišten radi usporedbe s rezultatima i provjere točnosti metode. Mjerenja su rađena s otapalima s kojima su rađene i kalibracije, odnosno kao otapala su korišteni cikloheksan, heptan i smjesa heptana i 3%-*n*-butil-acetata. Mjerenja su rađena u tri ponavljanja i s tri različita volumena kako bi rezultati bili točniji. Tablice 6., 7. i 8. prikazuju rezultate mjerenja, odnosno volumen uzorka u jažici, intenzitet signala mjerenja, određenu masu selenija u referentu (μg po gramu uzorka referenta), srednju vrijednost mase te postotak pogreške u odnosu na poznatu masu selenija u referentu. Volumeni prikazani u tablicama određeni su na temelju prijašnjih mjerena s većim rasponom volumena jer su rezultati u tom rasponu pokazali najbolju ponovljivost. Odabrani su volumeni od 120, 150 i 180 μL uzorka.

Tablica 6. Prikaz rezultata mjerenja referentnog uzorka ekstrahiranog u cikloheksanu kao otapalu

V (uzorka nakon digestije u jažici) / μL	Intenzitet signala / a.u.	*m* (Se) u referentu / μg/g	$\bar{x}$ / μg/g	% greške
120	11403	0,42	0,46 ± 0,06	6,12
120	11872	0,49		
120	12160	0,54		
150	12268	0,45		
150	12114	0,43		
150	12387	0,46		
180	13126	0,47		
180	13006	0,45		
180	12989	0,45		

Tablica 7. Prikaz rezultata mjerenja referentnog uzorka ekstrahiranog u heptanu kao otapalu

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	Intenzitet signala / a.u.	*m* (Se) u referentu / µg/g	$\bar{x}$ / µg/g	% greške
120	12294	0,39	0,42 ± 0,05	14,29
120	12187	0,37		
120	12407	0,41		
150	13202	0,42		
150	13298	0,44		
150	13321	0,44		
180	14099	0,45		
180	14196	0,46		
180	14132	0,45		

Tablica 8. Prikaz rezultata mjerenja referentnog uzorka ekstrahiranog u smjesi heptana i 3%-*n*-butil-acetata kao otapalu

V (uzorka nakon digestije u jažici) / µL	Intenzitet signala / a.u.	*m* (Se) u referentu / µg/g	$\bar{x}$ / µg/g	% greške
120	13895	0,25	0,27 ± 0,03	44,90
120	14052	0,26		
120	14223	0,27		
150	14985	0,27		
150	15212	0,29		
150	15208	0,29		
180	16029	0,28		
180	15968	0,28		
180	16319	0,30		

Usporedbom navedenih rezultata zaključeno je da se cikloheksan pokazao kao najbolje otapalo iako je ponovljivost rezultata najbolja kada se koriste smjesa otapala ili heptan kao otapalo. Međutim, postotak pogreške najveći je prilikom upotrebe smjese heptana i 3%-*n*-butil-acetata za ekstrakciju kompleksa Se-DAN, dok je najmanji postotak pogreške prilikom upotrebe cikloheksana. Dobra ponovljivost rezultata prilikom upotrebe smjese, ali i heptana, može se pripisati tome što navedena otapala manje isparavaju u usporedbi s cikloheksanom.

4.5. Određivanje selenija u uzorcima jaja

Nakon kalibracije sa standardnom otopinom selenija i mjerenja koncentracije selenija u referentnom uzorku te odabira otapala, mjerile su se koncentracije selenija u uzorcima jaja. Kao otapala za ekstrakciju kompleksa Se-DAN iz uzorka odabrani su cikloheksan i heptan. Mjerenja su rađena po istom principu kao i referent, s tri ponavljanja i tri različita volumena uzoraka i otapala. Također su posebno određivane koncentracije u kupovnim i domaćim jajima, kao i u žumanjku (Ž) i bjelanjku (B). Mjerenja su rađena na tri kupovna i tri domaća jajeta. Kupovna jaja imaju oznaku KŽ i KB, dok domaća imaju oznaku DŽ i DB. Brojevi označavaju iz kojeg jajeta su žumanjak, odnosno bjelanjak. Tablica 9. prikazuje rezultate mjerenja za kupovna jaja, dok tablica 10. prikazuje rezultate mjerenja za domaća jaja.

Tablica 9. Prikaz i usporedba rezultata određivanja selenija u žumanjcima i bjelanjcima kupovnih jaja koristeći cikloheksan i heptan kao otapala

	m (Se) u uzorku / µg/g	
uzorak	cikloheksan	heptan
KŽ1	0,27 ± 0,05	0,25 ± 0,03
KŽ2	0,19 ± 0,05	0,15 ± 0,02
KŽ3	0,36 ± 0,09	0,25 ± 0,06
KB1	0,19 ± 0,04	0,11 ± 0,02
KB2	0,12 ± 0,06	0,17 ± 0,02
KB3	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,03

Tablica 10. Prikaz i usporedba rezultata određivanja selenija u žumanjcima i bjelanjcima domaćih jaja koristeći cikloheksan i heptan kao otapala

	m (Se) u uzorku / μg/g	
uzorak	cikloheksan	heptan
DŽ1	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,01
DŽ2	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,01
DŽ3	0,32 ± 0,02	0,27 ± 0,05
DB1	0,14 ± 0,03	0,20 ± 0,01
DB2	0,14 ± 0,03	0,18 ± 0,01
DB3	0,27 ± 0,03	0,25 ± 0,02

Iz podataka je vidljivo da su rezultati ponovljiviji s heptanom kao otapalom, ali je veća pogreška kao što je objašnjeno u poglavlju 4.4.. Također je vidljivo da nema značajne razlike u koncentracijama selenija između kupovnih i domaćih jaja. Može se uočiti da su rezultati veći za žumanjke što odgovara literaturnim podacima [33].

4.6. Određivanje selenija u uzorcima jaja uz standardni dodatak

Ova mjerenja su, kao i prijašnja, rađena u tri ponavljanja i s tri volumena (120, 150 i 180 μL). Mjerenja uz standardni dodatak rađena su kako bi se provjerila točnost određivanja selenija korištenom metodom. Mjerenja su se pokazala poprilično uspješnima te je iskorištenje unutar ±20% što je prihvatljiv rezultat. Tablica 11. prikazuje rezultate mjerenja koncentracije selenija nakon standardnog dodatka. Ova mjerenja vršena su samo u cikloheksanu kao otapalu.

Tablica 11. Prikaz rezultata određivanja selenija koristeći metodu standardnog dodatka uz cikloheksan kao otapalo

m (Se) ekstrahirana u cikloheksanu / ng	*m* (Se) dodana / ng	*m* (Se) očekivana / ng	Iskorištenje / %
187,16	0		
189,99	40	227,16	83,63
305,34	80	267,16	114,26
296,66	120	307,16	96,58
337,95	160	347,16	97,35
397,29	180	367,16	108,20
481,82	240	427,16	112,78

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu fluorimetrijski se određivao selenij u uzorcima jaja uz pomoć fluorescentnog markera 2,3-diaminonaftalena. S obzirom da selenij nema sposobnost fluorescencije, njegovo određivanje metodom fluorimetrije temelji se na stvaranju kompleksa s fluorescentnim markerom. Intenzitet fluorescencije nastalog kompleksa proporcionalan je koncentraciji selenija. Za razaranje uzoraka korištena je mikrovalna digestija. Kao otapala koristili su se cikloheksan, heptan i smjesa heptana i 3%-*n*-butil-acetata. Uz određivanje selenija u uzorcima, također je ispitano koje otapalo je najpovoljnije za ovu vrstu analize.

Učinkovitost i točnost metode ispitani su određivanjem selenija u referentnom uzorku i metodom standardnog dodatka.

Na temelju rezultata zaključeno je kako je najbolje otapalo za ekstrakciju kompleksa Se-DAN cikloheksan s obzirom da je korištenjem tog otapala najtočnije određen sadržaj selenija u referentu uz grešku od samo 6,12%. Metoda standardnog dodatka je potvrdila točnost metode budući da su se iskorištenja nalazila u području ± 20% što je prihvatljivo.

Određen je selenij u tri domaća i tri kupovna jaja pri čemu nije bilo značajne razlike u sadržaju selenija između domaćih i kupovnih jaja.

Dodatnim istraživanjima moglo bi se naći povoljnije otapalo za ovu metodu. Ono bi trebalo što manje isparavati, što manje se miješati s vodom te bolje ekstrahirati kompleks iz otopine. Također postoji i mogućnost pronalaska boljeg fluorescentnog markera koji bi specifično vezao selenij te usavršavanja metode.

6. LITERATURA

[1] I. Filipović, S. Lipanović, Opća i anorganska kemija, II. dio, Kemijski elementi, njihove elementarne tvari i spojevi, VI izdanje, Školska knjiga,1987.

[2] https://hobart.k12.in.us/ksms/PeriodicTable/selenium.htm (21.09.2019.)

[3] R. Boyd, Seleniumstories, Nature Chemistry 3 (2011) 570-570.https://www.nature.com/articles/nchem.1076#article-info (21.09.2019.)

[4] https://www.britannica.com/biography/Jons-Jacob-Berzelius (21.09.2019.)

[5] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11894747 (23.09.2019.)

[6] 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.

[7]C. D. Thomson, Selenium | Physiology, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (second edition), Benjamin Caballerour., Academic Press,2003.

[8] Ž. Cvrtila, L. Kozačinski, M. Hadžiosmanović, S. Milinović-Tur, I. Filipović, Značenje selena u mesu peradi, Stočarstvo 59 (2005) 281-287.

[9] N. Adler, Istraživanje selena u namirnicama animalnog podrijetla, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1993.

[10] J. D. Latshaw, Natural and Selenite Selenium in Hen and Egg, J. Nutr. 105 (1975) 32-37.

[11] C. A. Swanson, Comparative utilization of selenite, selenomethionine and selenized yeast by the layin ghen, Nutr. Res. 7 (1987) 529-537.

[12] 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.

[13] O. E. Olson, E. N. Novacek, E. I. Whitehead, I. S. Palmer, Investigations on selenium in wheat, Phytochemistry 9 (1970) 1181-1187.

[14] T. K. Virupaksha, S. Shrift, Biochemical differences between selenium accumulator and non accumulator Astragalus species, Biochim. Biophys. Acta 107 (1965) 69-80.

[15] A. Ochoa-Solano, C. Gitler, Incorporation of ^{75}Se-selenomethionine and ^{35}S-methionine in to chicken egg white protein. J. Nutr. 94 (1968) 243-248.

[16] C. B. Anfinsen, D. Steinberg, Studies on the biosynthesis of ovalbumin, J. Biol. Chem. 189 (1951) 739-744.

[17] 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.

[18] https://www.fitness.com.hr/prehrana/nutricionizam/Selen.aspx (21.09.2019.)
[19] M. P. Rayman, Selenium and human health, The Lancet 379 (2012) 1256-1268.
[20] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482260/ (26.09.2019.)
[21] https://www.news-medical.net/health/Selenium-Toxicity.aspx (26.09.2019.)
[22] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, Selenocysteine: the 21st aminoacid, Molecular Microbiology 5 (1991) 515-520.
[23] http://aminoacidosnoesenciales.blogspot.com/2010/08/selenocisteina.html (16.10.2019.)
[24] A. A. Turanov, X.-M. Xu, B. A. Carlson, M.-H. Yoo, V. N. Gladyshev, D. L. Hatfield, Biosynthesis of Selenocysteine, the 21st Amino Acid in the Genetic Code, and a Novel Pathway for Cysteine Biosynthesis, Advances in Nutrition 2 (2011) 122-128.
[25] N. G. Schrauzer, Selenomethionine: A Review of Its Nutritiona lSignificance, Metabolism and Toxicity, J. Nutr. 130 (2000) 1653–1656.
[26]https://www.indiamart.com/proddetail/l-selenomethionine-5784605362.html (16.10.2018.)
[27] http://www.rcsb.org/structure/6ELW (30.09.2019.)
[28] https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp92-c7.pdf (08.10.2019.)
[29]https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d2757?lang=en&region=HR (12.10.2019.)
[30] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.317183.html (12.10.2019.)
[31] C. R. Sawicki, Fluorimetric Determination of Nitrate, Analytical Letters 4 (1971) 761–775.
[32] A. K. Nussler, M. Glanemann, A. Schirmeier, L. Liu, N. C. Nüssler, Fluorometric measurement of nitrite/nitrate by 2,3-diaminonaphthalene, Nature Protocols 1 (2006) 2223–2226.
[33] U. Tinggi, C. Reilly, C. M. Patterson, Determination od Selenium in Foodstuffs Using Spectrofluorometry and Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, Journal of Food Composition and Analysis 5 (1992) 269-280