Određivanje koncentracije selena u jajima pomoću induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije

Antolović, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:272333

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

Dora Antolović

Određivanje koncentracije selena u jajima pomoću induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije

(Determination of selenium concentrations in eggs by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy)

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović

Osijek, 2018.

Sažetak

U ovom radu bavili smo se mikroelementom selenom. U prirodi ga nalazimo u tragovima. Pravomjernom edukacijom o biogeokemijskom ciklusu kruženja selena kroz elemente i tvari ekosustava pružili smo bolji uvid u njegovu rasprostranjenost, ali i biodostupnost. Nadalje, upoznavanjem fizikalnih i kemijskih svojstava selena i širokog spektra formi u kojima se u prirodi može pojaviti upoznali smo se i s kemizmom selena. Analitička kemija nam pruža uvid u metode analize elemenata. Sofisticiranije metode i uređaji su korišteni kako bismo odredili koncentraciju selena u jajima. Koristili smo metodu induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije zajedno s hidridnom tehnikom kako bismo sa što većom preciznošću došli do rezultata. Rezultati su pokazali da je metoda pogodna za određivanje sadržaja selena u jajima.

Ključne riječi: selen, hidridna tehnika, mikroelement, antioksidans, jaja

Abstract

This paper deals with the microelement of selenium. In nature we find it in traces. By providing proper education about the biogeochemical cycle of circulating selenium through the elements and substances of the ecosystem, we gained a better insight into its distribution and bioavailability. Furthermore, by getting acquainted with the physical and chemical properties of selenium and the wide spectrum of shapes in which nature may appear, we have also become familiar with the chemistry of selenium. Analytical chemistry provides insight into element analysis methods. More sophisticated methods and devices were used to determine the concentration of selenium in eggs. We used the inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy method together with the hydride technique in order to achieve as much precision as possible. The results have shown that the method is suitable for determining the content of selenium in eggs.

Key words: selenium, hydride technique, microelement, antioxidant, egg

Zahvala

Ovim putem bih se posebno zahvalila Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Sveučilišta J. J. Strossmayera na ukazanom strpljenju i potrebnoj edukaciji i demonstraciji metode koju smo u radu provodili.

Sadržaj

1. Uvod 6
2. Selen 7
2.2. Otkriće selena 7
2.3. Kemija selena 8
2.4. Biogeokemija selena 11
2.4.1. Selen u atmosferi i zemljinoj kori 11
2.4.2. Selen u hidrosferi 12
2.4.3. Selen u biljkama 12
2.4.4. Selen u životinjama 13
2.5. Selen u prehrani čovjeka 13
2.6. Selen u zdravlju čovjeka 15
3. Analiza selena u biološkim materijalima 18
3.1. Metoda induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije 18
3.2. Kemikalije i priprema reagensa 19
3.3. Priprema uzorka 19
3.4. Provedba ekperimenta 20
4. Rezultati i diskusija 24
5. Zaključak 26
6. Literatura : 27

1. Uvod

Cilj ovog rada je objašnjenje uloge koju selen ima kao mikroelement te detaljno pojašnjenje kako ga što lakše, efikasnije i brže determinirati u danim uzorcima, specifično se bazirajući na metodi induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije. Rad će, osim toga, obuhvatiti teorijsku pozadinu o selenu, od povijesti istraživanja vezana za element, kemiju selena, njegovu distribuciju i biodostupnost te toksičnost, sve s ciljem podrobnije edukacije za buduće analize. Velika važnost leži u prepoznavanju uloge selena kao esencijalnog nutrijenta unutar ljudskog organizma. Kao posljednju stavku prikazat će se rezultati analize nakon koje slijedi diskusija s zaključkom.

2. Selen

2.2. Otkriće selena

Element je 1817. godine otkrio Jöns Jacob Berzelius uz pomoć J. G. Ghana. J.J. Berzelius je bio švedski kemičar, rođen 20. kolovoza 1779. godine. Kada je imao samo 4 godine otac mu je preminuo od tuberkuloze, a par godina kasnije majka mu se preudala. Napisao je i autobiografiju iz koje saznajemo kako mu je i majka preminula kad je imao samo 8 godina. Čovjeka koji ga je odgajao, očuha, A. Ekmarcka, opisuje kasnije u životu kroz svoju biografiju kao čovjeka izuzetne inteligencije i kao inspiraciju. Nakon osnovnog obrazovanja, Berzelius je studirao medicinu te je sa 22 godine primio diplomu. Ubrzo nakon diplome primljen je kao asistent za medicinu i farmaciju u poznatoj kirurškoj školi u Stockholmu gdje je stekao reputaciju izvrsnog profesora kemije radi svojih izrazito demonstrativnih predavanja. Osim rada kao profesor, Berzelius se bavio i istraživačkim radom te je odredio atomske mase gotovo svih do tada poznatih elemenata, i to s iznimnom točnošću. U istom laboratoriju je otkriven i selen [7].

Berzelius i Ghan su posjedovali udjele u postrojenju [25] za proizvodnju sumporne kiseline koje je kao sirovinu koristilo pirit. U ljeto 1817. godine Berzelius i Ghan su radili na tehničkim detaljima vezanim uz proizvodnju sumporne i nitritne kiseline, octa, senfa i raznih pigmenata. Pri raznim pokusima došli su do zaključka da su u sumpornoj kiselini identificirali telurij u malim koncentracijama. Tvrde da je telurij u formi sumpora pomiješan s sumpornom kiselinom [7]. Također navode da u tom postrojenju dio zapaljenog sumpora isparava bez da se oksidira te potom taloži u kiselini i da su upravo u tom talogu pronašli telurij. Osim toga, izražavaju čuđenje činjenicom da je ruda iz koje sve potječe, pirit, iz rudnika gdje telurij nikad nije pronađen. Par mjeseci kasnije, Berzelius je utvrdio da je pretpostavka o tome da su našli telurij bila pogrešna. Pri eksperimentima koje je po povratku iz postrojenja provodio u svom laboratoriju došao je do zaključka da je u pitanju nova tvar. Potom opisuje i navodi zapažanja o elementu koja je uočio [25]. Navodi da sublimira u formi rumenice i da usprkos tome nije oksidiran, pri hlađenju donekle zadržava karakteristike fluida, a pri gorenju daje plamen azurno plave boje. Oštog je mirisa koji asocira na rotkvicu za što navodi da je bio faktor koji ih je krivo naveo na telurij te elementu zbog svih sličnosti teluriju i pronalasku u postrojenju za proizvodnju sumporne kiseline daje ime selen [7]. Samo ime selena potječe od grčke riječi za mjesec „selene“, nasuprot latinskog izraza za

zemlju „tellus“ iz kojeg je izvedeno ime za telurij, element s kojim je selen bio prvotno zamijenjen [25].

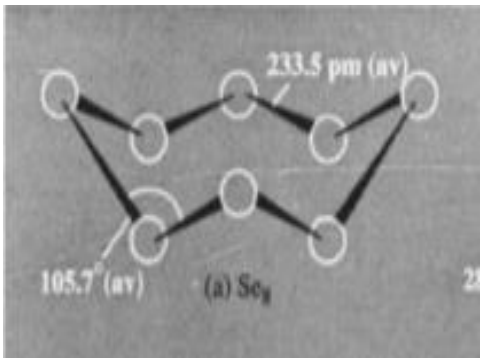
2.3. Kemija selena

Nužno je poznavati selen kao element, sličnosti i razlike unutar pojedinih kemijskih oblika selena, kako bismo mogli razumjeti kemiju selena te na koji način se on ponaša u biogeokemijskom ciklusu Zemlje, ali i kako bismo mogli razumijeti njegovu ulogu u ljudskom organizmu. Selen je nemetal u periodnom sustavu elemenata označen simbolom Se. Atomski broj selena je 34, stoga je lociran u četvrtoj periodi periodnog sustava zajedno s kisikom, sumporom i telurijom. Fizikalna i kemijska svojstva selena upravo ovise o njegovom položaju unutar periodnog sustava elemenata.

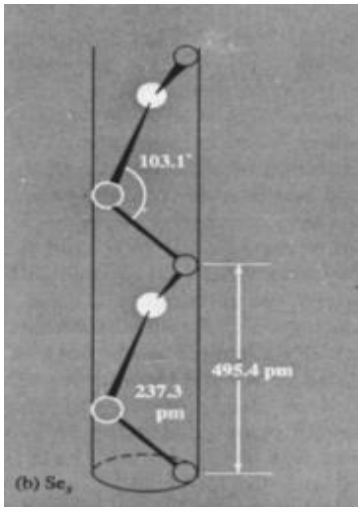
Selen je, kao što znamo, element atomskog broja 34 i atomske mase 78,963 g/mol. Gustoća selena iznosi 4.809 g/cm^3. Nosi elektronsku konfiguraciju [Ar] $3d^{10}$ $4s^2$ $4p^4$ iz čega vidimo da ima dva elektrona manje od sljedećeg plemenitog plina. Selen ima 6 stabilnih izotopa, ^{74}Se, ^{76}Se, ^{77}Se, ^{78}Se, ^{80}Se i ^{82}Se, te 24 nestabilna. Promjera jezgre je 103 pm. Zbog afiniteta prema elektronu od -4.21 eV, elektonegativnosti 2.55 i ionizacijskog stanja, vrelište iznosi 685°C. Talište je na 221°C. U prirodi je selen relativno rijedak element, pronađen u rudama, većinom rudama sumpora. Osim u prirodi i u čovjeku se javlja kao element u tragovima. Po zadnjim procjenama količina selena u ljudskom tijelu iznosi svega 14 mg, što nameće zaključak da u svakoj stanici ljudskog tijela ima više od milijun atoma selena [16].

Selen se može naći u više alotropskih modifikacija što znači da može postojati u različitim molekularnim oblicima koji tada variraju u svojim fizikalnim svojstvima [4]. Alotropske modifikacije se mogu nalaziti u oba oblika, amorfnom i kristalnom. Do sada je pronađeno 8 različitih alotropskih modifikacija selena [4]. Tri od toga su crvena monoklinska polimorfa (alfa, beta i gama) koja su načinjena od prstenova Se_8 (Slika 1), a različitost svojstava proizlazi iz činjenice da se za svaki polimorf ti Se_8 prstenovi različito slažu u konačnu kristalnu strukturu. Nedavno su sintetizirane nove forme Se prstena koji su rezultirali s dva nova crvena alotropa; ciklo-Se_6 i ciklo-Se_7. U formi alotropa selena javlja se i donekle sivkasta, metalnog izgleda polimerna struktura koju čini heksagonalni kristal načinjen od spiralnih polimernih lanaca selena (Slika 2). To je ujedno i termodinamički najstabilniji oblik selena. Posljednju alotropsku modifikaciju čini komercijalni oblik selena, koji kao amorfna alotropska modifikacija dolazi u obliku crvenog praha ili je crnog staklastog oblika. Amorfni selen čine ekstremno gusto i nepravilno pakirani polimerni

prstenovi selena koji sadrže i do 1000 atoma selena po prstenu. Alfa i beta alotropske modifikacije nastaju naizmjenično sporim pa brzim isparavanjem ugljikovog disulfida CS_2 ili benzenskih otopina crnog staklaskog selena. Gama alotropska modifikacija nastaje reakcijom dipiperidinotetraselena $Se_4(NC_5H_{10})_2$ s otapalom CS_2. Sivi, metalni, heksagonalno pakirani selen se može dobiti zagrijavanjem ostalih alotropskih modifikacija, ali i sporim hlađenjem rastaljenog selena ili kondenzacijom para selena na temperaturi tik ispod 220°C. Sivi selen je fotokondukter i jedina alotropska modifikacija sa sposobnošću provođenja električne struje [4]. Strukturu heksagonalnog selena čine nerazgranati spiralni lanci selena karakterizirani s vezama Se-Se dužine 237.3 pm te kutom između Se-Se-Se od 103.1°. Osnovnu gradivnu jedinicu stoga čini blok od 3 atoma selena koji se ponavlja periodički s tim da je udaljenost između pojedinačnih lanaca 343.6 pm. Sivi selen je netopljiv u CS_2 i gustoće je 4.82 g/cm^3 što ga čini najgušćom alotropskom modifikacijom.



Slika 1. Struktura Se_8 jedinice u alfa, beta i gama alotropskim modifikacijama [4].



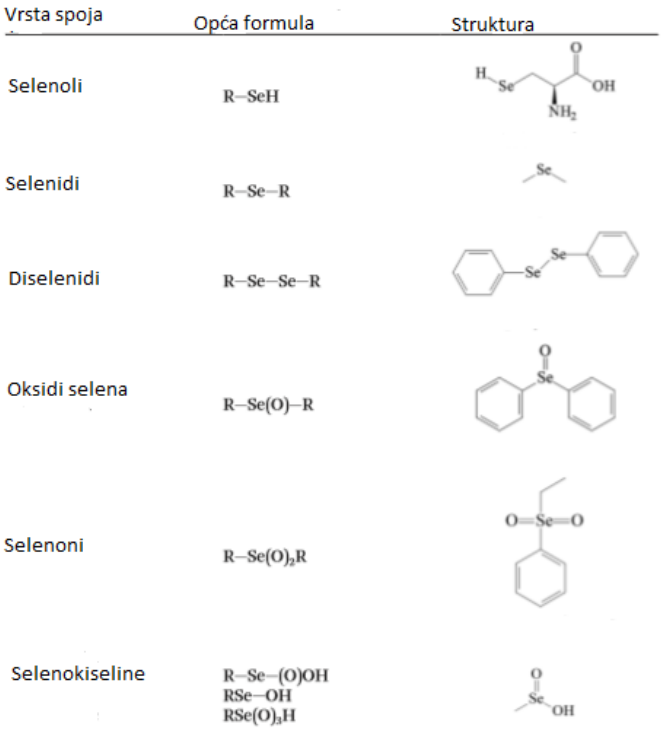
Slika 2. Struktrura spiralnog Se-lanca u sivom selenu [4].

Staklasti crni selen je komercijalna forma selena koja se dobiva naglim hlađenjem rastaljenog selena. Strukturom je krhak. Neproziran je i plavkasto-crne boje. Djelomično je topljiv u CS_2. Pri zagrijavanju na 180°C izrazito brzo prelazi u heksagonalni selen.

Veliki interes za alotropske modifikacije selena proizlazi i velikog potencijala za uporabu u fotoćelijama, ispravljačima i kserografiji [4]. Selen se javlja u više oksidacijskih stanja (-2, 0, +4, +6) i s obzirom na to razlikujemo SeO_4^{2-} selenat, SeO_3^{2-} selenit, SeO elementarni selen i Se^{2-} selenid [16]. Selen lako stupa u reakcije kako s metalima tako i s ne metalima rezultirajući novim spojevima. Često su takvi spojevi nestehiometrijski, posebno oni spojevi s prijelaznim metalima, i mnogi se mogu smatrati metalnim legurama. Mnogi dani spojevi imaju optička, električna i termoelektrična svojstva. H_2Se, vodikov selenid, izrazito je toksičan spoj čija je letalna doza LD_{50} 6ppm za zamorce. Čak štoviše, fizikalna djelovanja selenida usporediva su s štetnim djelovanjem arsena. Selen u oksidacijskom stanju -2 je dominantna forma organoselenidnih spojeva. Sam selenid je važan metabolit mnogih organizama pošto je prekursor selenocisteina , a i nalazi se u aktivnom centru mnogih selenoenzima. Selen se stoga, ovisno o termodinamici reakcija koje prethode glavnoj reakciji koja uključuje selen, pa i termodinamici i brzini same reakcije, ovisno o pH i o redoks potencijalu, može naći u anorganskoj i organskoj formi. Je li selen anorganske ili organske vrste određuje i njegovu biodostupnost, funkciju i toksičnost. Anorganski selen se primarno može naći u mineralima u formi selenita i selenata, dok su primarni organski oblici selena selenoaminokiseline, selenopeptidi i selenoproteini.

Selenoorganske spojeve stoga definiramo kao kemijske spojeve koji sadrže oboje, i selen i ugljik. No to nisu isključivo ugljik-selen spojevi, oni često u svojoj strukuturi sadrže halogene, kisik, sumpor i dušik. Generalno, organske forme selena su biodostupnije i manje toksične nego anorganske vrste. Osim toga, imaju veliku ulogu u biokemijskim procesima ljudskog organizma, poput antioksidansa, antiviralnih agensa te pružaju zaštitu od nekih vrsta raka, na što ćemo se detaljnije osvrnuti malo kasnije kada budemo detaljnije proučavali utjecaj selena na ljudsko zdravlje. Selenoorganske spojeve možemo podijeliti na selenole, diselenide, selenookside, selenone, kiseline selena, selenide, halogenide selena i selenoheterocikličke spojeve (Slika 3). Selen se u mnogočemu ponaša kao analog sumpora pa stoga možemo povući korelaciju između selenola, selenida te selenooksida te ih usporediti s tiolima, sulfidima i oksidima sumpora. Osim strukturne sličnosti, nema baš puno kemijske korelacije između sumpora i selena. Selen ima izraženija metalna svojstva, stoga je C-Se

vezu lakše razoriti pomoću halogena i oksidansa nego C-S vezu. To je jedan od razloga zašto selen relativno lako oksidira i mijenja oksidacijska stanja. Najbitniji spojevi selenoorganske skupine spojeva su upravo selenoli, specifičnije seleno aminokiselina selenocistein koju sadrže mnogi sisavci u sklopu raznih enzimskih kompleksa kao npr. glutation peroksidaze ili tioredoksin reduktaze.



Slika 3. Primjeri struktura najzastupljenijih oblika organskog selena [4].

2.4. Biogeokemija selena

2.4.1. Selen u atmosferi i zemljinoj kori

Mnoge sulfidne rude obiluju selenom. Pronađeno je da je selen jedan od glavnih konstituenata 40 različitih minerala, ali je u tragovima pronađen u još 37 njih. Navedimo kao primjer sulfidne rude srebra, bakra, olova, žive i nikla koje obiluju selenom. Upravo te sulfidne rude, glavne rude vulkanskih stijena, odgovorne su i za glavninu atmosferske koncentracije selena kako selen, kao i sumpor, isparava na visokim temperaturama i na taj način za vrijeme erupcije vulkana dospijeva u atmosferu [22, 26].

U sirovinama tipa ugljen ili sirova nafta te u tlu i sedimentima, selen se pojavljuje u

relativno niskim koncentracijama. Današnje procjene govore o svega par mg/kg selena u tlu i sedimentima, dok su koncentracije u sirovoj nafti i ugljenu nešto veće i mogu dosegnuti i do par stotina mg/kg [21]. Također je bitno spomenuti da su koncentracije selena na nekom području uvelike ovisne o geološkoj prošlosti te regije. Osim geološke prošlosti jako je bitan i sam pH tla/sirovine/sedimenta koji se uzorkuje [14]. Nizak pH uzrokuje slabiju mobilnost i dostupnost anorganskog selena te se on na taj način brže i lakše akumulira u samom uzorku. Na svijetu je trenutno više regija s niskim do umjerenim koncentracijama biodostupnog selena nego onih gdje je tlo obilato selenom i on je lako biodostupan [26]. Osim anorganskog, u tlu i sedimentima mogu se pronaći tragovi organskog selena, no kemija njihove prirode zbog manjkavosti analitičkih dokaza još nije u potpunosti poznata. Smatra se da je organski selen kao esencijalni nutrijent svakog organizma kovalentno kompleksiran s ostalim organskim sastavnicama tla i sedimenata. [22]

2.4.2. Selen u hidrosferi

Koncentracije selena u vodi, kao i kod tla, uvelike ovise o prirodi uzorkovane vode. Tako je prosječna koncentracija selena u ambijentnim vodama < 1 μg/L , dok u morskim vodama ta koncentracija varira u rasponu od 0.02 μg/L do 0.04 μg/L. Pretpostavke za slatkovodne vode se kreću otprilike u istom rasponu kao i za morsku vodu. Koncentracije selena u vodi u korelaciji su s antropogenim efektima pojedinih industrijskih postrojenja koji u proizvodnji koriste selen, kao što su industrijska proizvodnja keramike i stakla te farmaceutska industrija [15]. Nadalje, važno je napomenuti da koncentracije selena direktno ovise o omjeru miješanja isparene vodene pare i vode koja iz industrije pritječe, kao i o samom načinu zbrinjavanja selena nakon što ga industrija odluči označiti kao otpisani materijal. U vodama u kojima se mjere koncentracije selena te se procjenjuje njihova kvaliteta u korelaciji s tim, kvaliteta uvelike ovisi o ekotoksikološkim efektima te vode na ostatak sistema unutar kojeg je. Primarno se promatra hranidbeni lanac i dolazi li pri danim koncentracijama selena do narušavanja istog [21]. Zbog neprilagođenih metoda pouzdano odrađivanje količine selena u vodama još uvijek nije moguće, ali znanstvenici su uspjeli doći do graničnih intervala unutar kojih selen ne bi trebao imati negativne ekotoksikološke efekte na ostatak ekosistema [15].

2.4.3. Selen u biljkama

U prethodnim odlomcima smo se osvrnuli na koncentraciju selena u tlima, sedimentima i vodama te smo spomenuli njihovu biodostupnost ostatku sistema.

Koncentracije selena u biljkama uvelike ovise upravo o njegovoj biodostupnosti; selen ulazi u hranidbenu mrežu na način da ga biljke akumuliraju iz tla u kojem rastu i ugrađuju ga dalje u svoje sastavnice prilikom rasta [26, 5]. Važno je napomenuti da selen u konstituciju biljaka obično ulazi u formi selenom supstitioniranih analoga tiomolekula. Osim mnoštva organskih, prisutne su i razne forme anorganskog selena. S obzirom na to, biljke ga mogu apsorbirati u formi selenata i selenita, gdje onda faktor apsorpcije izravno ovisi o prisutnosti sulfata i fosfata u tlu. Najpoznatija forma selena u biljkama je upravo selenometionin koji je važna sastavnica većine žitarica i mahunarki. Iako biljke nemaju fiziološku potrebu za selenom, one svojom akumulacijom osiguravaju nužnost selena ostalim članovima hranidbenog lanca [14]. S obzirom na sposobnost akumulacije selena biljke možemo podijeliti u tri skupine: primarni i sekundarni akumulatori selena i neakumulacijske biljke [21]. Primarni akumulatori ili hiperakumulatori su biljke sposobne za apsorpciju i do nekoliko tisuća mg/kg selena, rastu većinom na tlima bogatim selenom i sadrže koncentracije selena uglavnom toksične za stoku. Sekundarni akumulatori, poznatiji kao apsorbensi selena, mogu akumulirati do 1000 mg selena po kilogramu mase biljke. Te biljke ne rastu nužno na tlima bogatim selenom, ali imaju veliku sposobnost njegova akumuliranja. Neakumulacijske biljke akumuliraju selen, ali ne u koncentracijama većim od 50 mg Se/kg. U potonju skupinu spada većina žitarica i trava.

2.4.4. Selen u životinjama

Kao i kod biljaka, selen u životinjski organizam ulazi apsorpcijom, u ovom slučaju hrane koja sadrži selen. U visokim količinama, selen je toksičan za životinje. U biljkama se odvija apsorpcija anorganskih formi selena iz tla- selenita i selenata. Za razliku od biljaka koje mogu anoganski selen apsorbirati i u konačnici pretvoriti u formu potrebnu za odvijanje nekog procesa, životinje (a i ljudi) trebaju izravan izvor selena u organizmu. To se ostvajuje unosom određenih biljaka koje sadrže tražene nutrijente. [5] Preko biljaka selenometionin i slične organske forme selena ulaze u životinjski organizam. Pri konzumiranju hrane bogate selenom te potom procesu probave dolazi do dobre apsorbcije organskih oblika selena koji se potom nespecifično ugrađuju u proteine. [5]

2.5. Selen u prehrani čovjeka

Iako je selen element koji se u ljudskom tijelu pojavljuje u tragovima, ima značaju ulogu u održavanju zdravlja pojedinca. Primarni način ulaska selena u ljudski organizam je

putem hrane.

Prosječna koncentracija selena u ljudskom tijelu je < 1 μg/kg. Najviše selena ljudskog tijela je uskladišteno u bubrezima, jetri, slezeni, gušterači, te srcu i mozgu. Optimalna vrijednost unosa iznosi 75 μg/dan, dok je donja granica 30 μg/dan. Toksični efekti javljaju se pri unosu više od 900 μg/dan [3]. Sveukupan unos selena uvelike ovisi o, kako je već rečeno, samoj biodostpnosti selena koja je direktno povezana s tipom hrane koju jedemo. Najveći unos se ostvaruje konzumiranjem kruha i žitarica, mesa i ribe, te jaja i mliječnih proizvoda. Za poboljšanje biodostupnosti selena pri konzumiranju preporučava se unos određenog povrća, kao što su brokula, gljive te češnjak i luk [3, 17]. Unos orašastih plodova poput brazilskih oraha također je poželjan. S ciljem optimalne prehrane, treba poznavati svoju hranu i kombinacijom namirnica unijeti dostatnu količinu makronutrijenata i mikronutrijenata [14].

U prehrani ljudi čiju okosnicu dijete čine namirnice biljnog podrijetla može se pojaviti deficit selena u slučaju da su namirnice za konzumaciju rasle na tlima s manjim koncentracijama selena [5]. S druge strane, može se pojaviti i slučaj unosa prekomjerne količine selena. Stoga je bitno informirati se o podrijetlu hrane koju konzumiramo kako bi se omogućilo namirivanje adekvatne količine selena. Uvriježene koncentracije selena za većinu žitarica su od 1 μg sve do 55 μg po 100 grama namirnice. Za prerađene žitarice, npr kruh, to iznosi oko 16 μg na 100 grama kruha. Što se tiče količine selena u voću i povrću, ono se kreće u rasponu između 0.1 μg i 2.2 μg na 100 grama [20]. Promjenom načina uzgoja, počevši od sadnje, preko dohrane i navodnjavanja, do korištenja što prilagođenijih strojeva i metoda za ubiranje plodova, današnja industrija hrane biljnog podrijetla osigurava što bolju biodostupnost i akumulaciju selena [3].

Prosječne koncentracije za meso, mesne prerađevine (uključujući ribu) te jaja u rasponu su od 42.5 μg do 311.5 μg na 100 g proizvoda. Kao i u agrarnoj industriji i mesna industrija kontrolom proizvodnje utječe na koncentraciju selena u mesnim proizvodima. Suplementacija životinjske ishrane vrši se doziranjem suplemenata selena na način da je životinji potrebno od 0.1 mg do 0.3 mg selena po kilogramu tjelesne mase.

Znamo da je uloga selena u tijelu višestruka, ipak možemo izdvojiti par ključnih formi i uloga selena nužnih za održavanje pravilne funkcije organizma. Najzastupljeniji oblici selena pronađeni u ljudskom organizmu su aminokiseline selenometionin i selenocistein, metilselenocistein i selenat. Izvori selenometionina su žitarice, metilselenocistein možemo pronaći u brazilskim orasima, a selenometionin i selenat dolaze većinom iz namirnica životnjskog podrijetla. Glavna uloga tih aminokiselina je ugradnja u

proteine, selenoproteine koji svaki pojedinačno, nose određenu fiziološku ulogu. U sisavcima je dosadašnjim istraživanjima pronađeno 30-ak selenoproteina dok se pretpostavlja da bi taj broj mogao iznositi čak i preko 100.

Naše istraživanje se baziralo na određivanju koncentracije selena u jajima. Nutritivne vrijednosti jaja su poznate, jaja su namirnica visoke biološke i hranjive vrijednosti [6]. Jedno jaje sadrži između 4 i 6 grama proteina. Proteine u jajetu možemo podijeliti na jednostavne (ovalbumin, konoalbumin i ovoglobulin) i složene (glikoproteini). Osim proteina jaje sadrži značajan udio masti i minerala. Masti u jajima uglavnom su sačinjene od kolesterola, triglicerida masnih kiselina te slobodnih masnih kiselina i fosfatidata. Prava nutritivna vrijednost jaja leži upravo u fosfatidatima koje sačinjavaju lecitin, sfingomijelin i kefalin 6]. Udio ugljikohidrata je u ukupnom nutritivnom profilu zanemariv, a sačinjava se od glukoze, manoze i galaktoze. Posebna se pozornost posvećuje prehrani peradi kako bi jaja bila obogaćena selenom. Prehrana mora biti bogata kvalitetnim proteinima, mastima te ugljikohidratima, a ne smije se zanemariti ni unos minerala i vitamina što se osigurava potrebnom suplementacijom. Osim toga, vodi se računa o optimalnim temperaturnim intervalima te koncentracijama štetnih plinova koji mogu naštetiti proizvodnji. Također, kontrola osvjetljenja je jako bitna zbog utjecaja na hipofizu peradi jer hipofiza kontrolira nesenje jaja [6].

2.6. Selen u zdravlju čovjeka

Kako bi shvatili važnost redovnog i dostatnog unosa selena u organizam moramo shvatiti njegovu biološku važnost. Selen je identificiran kao esencijalni element, što znači da ga ljudsko tijelo ne može samo sintetizirati, nego je potreban njegov unos u organizam kroz prehranu i suplemente [19]. Naveli smo da selen ima višestuke uloge u organizmu. Do početka 50-ih godina prošlog stoljeća selen nije imao dobru reputaciju, smatralo se da je to tvar neugodna mirisa i toksičnih efekata. Kasnije su tek istraženi i potvrđeni pozitivni efekti unosa selena [18]. Dokazano je da selen u formi selenoproteina ima važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima [13].

Zabilježeno je djelovanje selena kao antioksidansa koji uklanja slobodne radikale iz organizma [23, 19]. Slobodne radikale definiramo kao molekule koje su sposobne opstati samostalno te sadrže slobodan elektron. Prisutnost nesparenog elektrona je uzrok njihove nestabilnosti i visoke reaktivnosti. S obzirom na to hoće li slobodni radikal donirati ili prihvatiti elektron, razlikujemo oksidanse i reducense [2]. Radikali za koje je zapaženo da

uzrokuju najviše štete biološki važnim molekulama poput DNA ili proteina su: hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid te singletni kisik. Reakcije slobodnih radikala rezultiraju štetnim posljedicama (srčane bolesti, tumori, pojava raka, kromosomske mutacije...) i uzrokuju oksidativni stres. Terminom oksidativni stres opisujemo pojavu oksidativne štete koja nastaje kada je narušen omjer nastalih slobodnih radikala i efekta antioksidansa koji ih trebaju zbrinjavati [2]. Oksidativni stres rezultira štetom širokom spektru biomolekula, preko proteina, lipida pa sve do nukleinskih kiselina. Antioksidansi su molekule dovoljno stabilne da doniraju elektron slobodnom radikalu tako ga neutralizirajući. Antioksidansi su dovoljno male molekularne težine te stoga mogu reagirati sa slobodnim radikalima na način da prekidaju lančanu reakciju sprječavajući nanošenje konačne štete stanici. Uz opće poznate antioksidanse poput glutationa i ubikvinona koje je ljudsko tijelo sposobno proizvesti, u tijelu su pronađeni i antioksidansi unešeni prehranom, primarno vitamin E, vitamin C i beta-karoten. Poznato je da antioksidansi djeluju pomoću dva glavna mehanizma [2]. Prvi uključuje prekidanje lančane radikalske reakcije na način da antioksidans slobodnom radikalu donira elektron. Drugi mehanizam objašnjava način na koji antioksidansi uklanjaju inicijacijske molekule radikalskih reakcija na način da uklanjaju katalizatore bez kojih radikalska reakcija ne može niti početi. Antioksidativno djelovanje selena objasnit ćemo na primjeru sistema glutationa [23]. On uključuje glutation, glutation reduktazu, glutation peroksidazu i glutation S-transferazu. Jedna od prvih otkrivenih uloga selena jest bila ta da je on dio enzimskog kompleksa glutation peroksidaze čija je uloga razgradnja vodikova peroksida, lipida i fosfolipidnih hidroperoksida u organizmu. Ovaj enzimski kompleks sadrži 4 kofaktora selena koji omogućavaju pravilno smiještanje vodikova peroksida u aktivno mjesto enzima i njegovu katalizu. [19]. Osim toga, postoje mnogi selenoenzimi i selenoproteini koji imaju ulogu održavanja ukupne homeostaze tijela regulacijom hormona, elektronskih prijenosa te kontrolom biosinteze nukleotida [13]. Tako je poznata esencijalna uloga selena pri normalnom funkcioniranju štitnjače, selenoproteini su u ovom slučaju enzimi koji prevode tiroksin u njegov aktivni oblik trijodotironin [12]. Također je dokazan pozitivan efekt na mušku reproduktivnu sposobnost jer je ovojnica spermija upravo selenoprotein. Uz enzimski kompleks glutationa, bitan je i enzim tioredoksin reduktaze koji je također novootkriveni selenoproteinski kompleks koji ima ulogu u redoks regulaciji disulfidnih grupa visokog raspona enzima i transkripcijskih faktora. Osim uloga u organizmu kao antioksidans, novija istraživanja na selenu su pokazala kako ima i anti-kancerogena svojstva, a dokazan je i pozitivan efekt koji ima na imunološki sustav. Suplementacija selenom je pokazala da ima imunostimulirajuće efekte koji uključuju

pojačanje proliferacije aktiviranih T-stanica, učinkovitosti citotoksina limfnog sustava pri borbi protiv tumora i sličnih mutiranih stanica [19, 13]. Postoje podaci koji govore i o neuroprotektivnim svojstvima selena. Istraživanja su još u procesu, ali preliminarni rezultati govore da suplementacijom selena možemo utjecati na smanjenje učestalosti napada kod osoba koje boluju od epilepsije [18]. Osim epilepsije, selen se pokazao kao izvrstan borac protiv apoptoze moždanih stanica djelujući na taj način obećavajuće u kontekstu sprječavanja neurodegenerativnih bolesti živčanog sustava poput Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti te raznih oblika demencije [13]. Potencijalni pozitivni učinci koje selen ima na kardiovaskularni sustav pojedinca proizlaze iz činjenice da selenoproteini spriječavaju oksidativnu modifikaciju lipida[12].

Poznato je da kronični teški manjak selena uzrokuje dvije bolesti [9], Keshan-ovu bolest i Kaschin-Beck-ovu bolest. Keshanova bolest uzrokuje povećanje srčanog mišića, a može uzorokovati i zadebljanje te krutost. Rezultira aritmijom, elektrokardiografskim i radiografskim anomalijama. Kaschinova bolest uzrokuje bolesti kostiju i hrskavice. Bolest se očituje povećanim zglobovima, posebno prstiju na rukama i nogama. U ekstremnim slučajevima može uzrokovati patuljasti rast.

Višak selena u organizmu ima toksične efekte [9]. Bolest povezana s dugotrajno visokim unosom selena je selenoza. Klasični simptomi su kašalj, zadah koji podsjeća na češnjak, plućne tegobe i razni gastrointestinalni problemi poput povraćanja, proljeva te grčeva. Rani simptomi se mogu opaziti u krhkosti noktiju i kose, dok su dugotrajni simptomi neurološke prirode i uključuju umor, razdražljivost i emocionalnu nestabilnost. Osim toga, trovanje može rezultirati potpunim propadanjem jetre i smrću. Prekomjernom dozom se smatraju količine iznad 700 µg/dan. Pored izravnih simptoma koje uzrokuje višak selena, on ima i neizravna djelovanja; ometa apsorpciju cinka, smanjuje efektivnu količinu željeza u krvi i potiče akumulaciju bakra u jetri i srčanom mišiću.

3. Analiza selena u biološkim materijalima

Imajući na umu saznanja o selenu, kemiji selena i njegovoj rasprostranjenosti i biodostupnosti, razvijene su metode specifične određivanju koncentracije selena u raznim biološkim materijalima bez obzira nalazio se on samo u tragovima ili nekim većim količinama [11]. Zbog specifičnosti selena i metode su sofisticiranije. Općenito, uzorkovanje nekog biološkog materijala ne razlikuje se previše od uzorkovanja materijala za bilo koju drugu analitičku metodu. Vodi se računa o tome da je uzeta dovoljna količina biološkog materijala i da su isključene mogućnosti kontaminacije uzorka drugim faktorima. Zbog osjetljivosti selena na promjene u pH vrijednostima i promjene u redoks potencijalu uzorka potrebna je prethodna edukacija o vrsti uzorka selena koji se uzima, je li on anorganskog ili pak organskog podrijetla [1]. Daljnja priprema uzorka većinom se vrši na način da se uzorak otapa u za to pogodnom otapalu jer su metode pri kojima se uzorak žario kako bi se analizirala suha masa uzorka, rezultirale gubitcima selena. Žarenje uzorka kao dio pripreme za daljnju analizu još se uvijek vrši u slučaju da je u uzorku prisutna sumporna kiselina. Najčešća kombinacija otapala jest smjesa otopina dušične kiseline (HNO_3), perklorne kiseline ($HClO_4$), sumporne kiseline (H_2SO_4) i vodikova peroksida (H_2O_2). Najvažniji korak u ovoj proceduri je u tome da se teži minimiziranju isparavanja selena iz uzorka [1]. Izbor pogodne metode pripreme uzorka ovisi o tome kojom metodom analize ćemo se koristiti dalje u postupku. Razni uzorci podvrgavaju se raznim analitičkim metodama za određivanje te se danas razni biološki uzorci analiziraju metodama neutronske aktivacijske analize, atomske apsorpcijske spektroskopije, plinske kromatografije, fluorescencijske analize i slično. Često su mnoge spektroskopske metode, koje su inače vrlo korisne pri determinaciji mnogih metala u okolišu, ograničene nedovoljnom osjetljivošću uređaja na selen jer dolazi do preklapanja rezonancijskih linija selena (196 nm) s onima ultraljubičastog zračenja [1].

3.1. Metoda induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije

Metoda induktivno spregnute plazma atomske emisijske sprektroskopije ICP-AES (Slika 7) koju smo koristili u našem eksperimentu uparena je s hidridnom tehnikom.[24] Ta metoda se pokazala idealnom za određivanje elemenata u tragovima [11] Prijašnje metode induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije zbog ograničenja vezanog uz efikasnost raspršivača nisu bile toliko pouzdane, no uparivanjem ICP-AES s hidridnom tehnikom uzorak u formi plina se može uvesti u plazmu sa gotovo 100% učinkovitoću [8].

3.2. Kemikalije i priprema reagensa

Kemikalije korištene u provedbi eksperimenta su:

- 65% HNO_3 (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

-10% HNO_3

- 30% H_2O_2 (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- uzorak jajeta

- deionizirana voda

- standardi selena u HNO_3 (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- 37% HCl (Carlo Erba, Francuska)

- reducensi $NaBH_4$ (Sigma-Aldrich, Njemačka) i NaOH (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

Standardi selena za provođenje pokusa rađeni su u svrhu kalibracije uzorka i to u koncentracijama od 0.005 mg/L, 0.01 mg/L i 0.05 mg/L.

Reducens se priprema na način da se iz posude sa 10% HNO_3 u kojoj se potrebno posuđe čuva (Slika 4.) izvadimo dvije čaše, dvije odmjerne tikvice, štapić i plastičnu žlicu. Na vagi točnosti i do 4 decimale važemo 2.5 g $NaBH_4$ u za to prethodno pripremljenu čašu. Izvaganu masu $NaBH_4$ prenesemo u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunimo ju deioniziranom vodom do oznake. Otopinu natrijeva borohidrida potom prenesemo u plastičnu špric-bocu od 0.5 L. U drugu čašu koju smo priredili odvažemo, također na 4 decimale, 0.5 g NaOH. Ponovimo postupak kao i s $NaBH_4$ te presenemo odvaganu masu u odmjernu tikvicu od 100 mL te ju nadopunimo deioniziranom vodom do oznake. Dobivenu otopinu natrijeva hidroksida prenesemo u plastičnu špric-bocu koja već sadrži natrijev borhidrid. Špric-bocu tada nadopunimo deioniziranom vodom do oznake.

3.3. Priprema uzorka

Uzorak za analizu se priprema na način da se uzorak jajeta melje i suši do konstantne mase. Nakon toga vrši se odvaga od 0.5 g uzorka jajeta. Uzorak se prenese u kivetu (sve

kivete priređene za analizu prethodno smo označili) za mikrovalnu (Slika 9.) koju prenosimo do digestora. U digestoru se odvija priprema uzorka za razaranje u mikrovalnoj. Uzorak se tada preljeva s 6 mL 65% HNO_3 i 2 mL 30% H_2O_2. Tako pripremljeni uzorak odlažemo u mikrovalnu koju podesimo na 300°C uz okretaje na period od 3 sata kako bi se uzorak razorio. Za to vrijeme priredimo i falkonice koje ćemo trebati u nastavku i to na način da ih označimo isto kako smo i kivete za mikrovalnu označili kako bismo mogli pratiti pojedini uzorak. Nakon tri sata uzorci se izvade iz mikrovalne i stave se hladiti pola sata. Po završetku hlađenja kivete za mikrovalnu premjestimo u digestor gdje prebacujemo razorene uzorke u prethodno pravilno označene falkonice. Uzorak u falkonicama potom razrjeđujemo na 50 mL. Nastavak pripreme uzoraka za hidridnu tehniku uključuje novi set falkonica koje smo prethodno označili kako bismo mogli pratit svaki pojedini uzorak. U priređene falkonice otpipetiramo po 20 mL otopine iz prethodnog seta falkonica te u to dodamo 20 mL dispenzora 37% HCl. Tada tako priređene uzorke zajedno s prethodno priređenim standardima stavljamo na redukciju. Redukcija se provodi sat vremena na 90 °C. Pri završetku redukcije uzorak se stavlja na hlađenje tri sata te se po hlađenju falkonice napune do 50 mL deioniziranom vodom. Sada imamo uzorke u potpunosti spremne za nastavak analize.

3.4. Provedba ekperimenta

Analiza se odvija u prostoriji stalne temperature koja iznosi ne više od 21°C, najčešće pri temperaturi od 17 °C. Sam uređaj čini par komponenti: plinske boce s argonom pod 200 bara, plinska boca s dušikom čija je uloga sprječavanje ulaska nečistoća u analizator, boca s kompresorskim bezvodnim zrakom koji ima ulogu izoštravanja plamena plazme. Osim ventilacije, koja služi za održavanje prostorne temperature konstantnom, uređaj je spojen i na vlastiti hladnjak (Slika 5). Ostali instumentalni dijelovi uređaja su spektrofotometar, generator hidridne tehnike, plamenik, monokromator i polikromator, računalo (program WinLab32 za pokretanje uređaja te *Method editor* za podešavanje podataka koje će uređaj dati o selenu) peristaltičku pumpu (Slika 10) te raspršivač (eng. *Nebulizer*) (Slika 8). ICP-AES sistem kombinira sekvencijalni i simultani spektrofotometar što u kombinaciji s hidridnom tehnikom daje pouzdane rezultate pri mjerenju. Efikasnost hidridne tehnike ovisi o oksidacijskom stanju selena [8]. Ispravnija mjerenja su izvršena s selenom nižih oksidacijskih stanja. Zato se u pripremi uzorka vrši redukcija s HCl-om sat vremena na 90°C (selen prelazi iz VI oksidacijskog stanja u IV oksidacijsko stanje).

Sam mehanizam uređaja je fino razrađen. U sustavu kontinuiranog protoka, zakiseljeni uzorak (Slika 6.), slijepa proba ili standard se konstantno miješaju s mlazom reducensa kako bi se proizveli plinoviti hidridi koji se potom mogu uvesti u plazmu argona (argon zapaljen na 3000°C). U trenutku reakcije reducensa i uzorka, kao nusprodukt se razvija plinoviti vodik. Tada se uvodi tok plazme argona kroz uzorak te dolazi do prevođenja hidrida u potpunosti u plinovitu fazu i tada možemo reći da imamo ionizirani argon. Putem seperatora za plin i tekućinu, faza koja sadržava plinovite hidride može dalje ući u ICP na analizu, a ostatak tekućina su odvedene kao otpadne vode.Temperatura plazme argona s plinovitim hidridima uzorka je u završnoj fazi još uvijek na oko 3000 °C. To uzrokuje termičko gibanje elektrona u vanjskoj ljusci ioniziranog argona, oni su tad pobuđeni. U trenutku kada se ti elektroni vrate u stacionarno stanje, emitiraju fotone svjetla karakteristične za selen. Spektrofotometar tada optičkom ćelijom raspršuje svjetlost i usmjerava fotone emitirane svjetlosti na fotomultiplikacijsku detektorsku cijev. Računalni program potom prevodi elektični signal s fotomultiplikacijske cijevi u koncentracije.[8]



Slika 4. Posuda s 10% HNO_3 za skladištenje potrebnog posuđa.



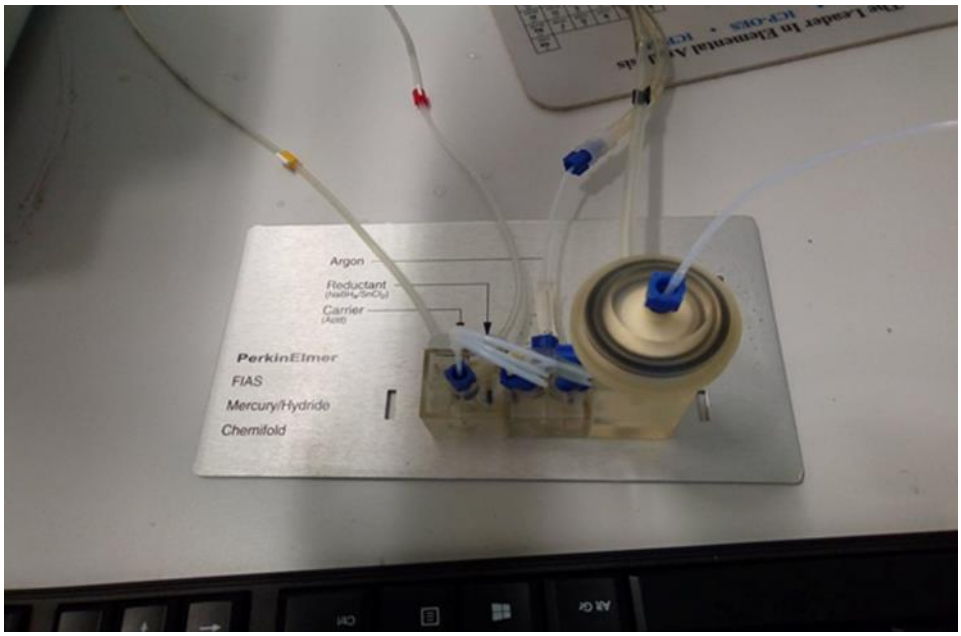
Slika 5. Hladnjak ICP-AES-a.



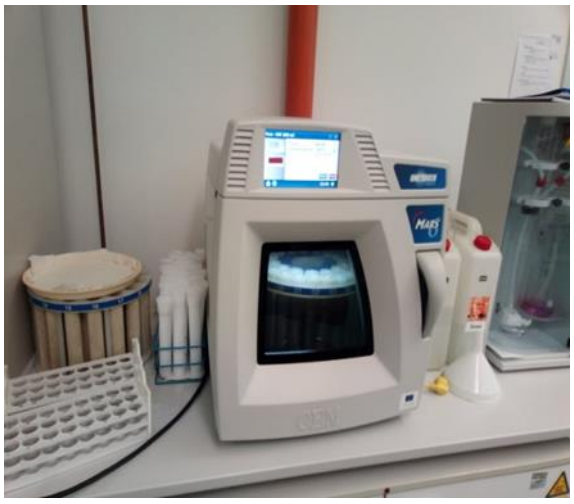
Slika 6. Stalak za uzorke.



Slika 7. ICP-AES.



Slika 8. Raspršivač.



Slika 9. Mikrovalna za pripremu uzoraka.



Slika 10. Injektor uzorka.

4. Rezultati i diskusija

Provedena je analiza sadržaja selena u jajima pomoću induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije zajedno s hidridnom tehnikom. Metode i materijali te način prireme uzorka za samu analizu prethodno su opisani, kao i način na koji se analiza provela. Uzorci jaja podijeljeni su u dvije grupe:

1. grupa: jaja dobivena od nesilica koje su hranjene smjesom koja nije bila obogaćena selenom,

2. grupa: jaja dobivena od nesilica koje su hranjene smjesom koja je bila obogaćena selenom.

Analiza je rađena u bjelanjcima i u žumanjcima a rezultati su prikazani u tablici 1 za 1. grupu uzoraka dok su rezultati za 2. grupu uzoraka prikazani u tablici 2.

Tablica 1: Rezultati analize 1. grupe uzoraka

uzorak broj	**dio jaja**	**Se mg/kg**	**dio jaja**	**Se mg/kg**
1	bjelanjak	0,0665	žumanjak	0,3607
2	bjelanjak	0,0560	žumanjak	0,3832
3	bjelanjak	0,0490	žumanjak	0,3721
4	bjelanjak	0,0638	žumanjak	0,3521
5	bjelanjak	0,0560	žumanjak	0,3767
srednja vrijednost		0,0582		0,3690

Tablica 2: Rezultati analize 2. grupe uzoraka

uzorak broj	**dio jaja**	**Se mg/kg**	**dio jaja**	**Se mg/kg**
1	bjelanjak	0,1451	žumanjak	0,7316
2	bjelanjak	0,1643	žumanjak	0,7219
3	bjelanjak	0,1401	žumanjak	0,5081
4	bjelanjak	0,1314	žumanjak	0,7224
5	bjelanjak	0,1598	žumanjak	0,7317
srednja vrijednost		0,1481		0,6831

Usporedbom rezultata u tablici 1. i 2. vidljivo je da je u obje grupe u istim uzorcima jaja za oko 5 puta veća koncentracija selena u žumanjcima nego u bjelanjcima.

U tablici 3 prikazana je usporedba prosječnih vrijednosti koncentracije selena u bjelanjcima i žumanjcima 1. i 2. grupe uzoraka. Na osnovu dobivenih vrijednosti može se zaključiti da postoji značajno povećanje koncentracije selena u jajima koja su dobivena od nesilica koje su hranjene smjesom obogaćenom selenom.

Tablica 3: Usporedba prosječnih vrijednosti koncentracije selena u uzorcima 1. i 2. grupe

	1. grupa	**2. grupa**
dio jaja	**Se mg/kg**	**Se mg/kg**
bjelanjak	0,0582 ± 0,007	0,1481 ± 0,014
žumanjak	0,3690 ± 0,013	0,6831 ± 0,098

*prosijek 5 mjerenja ± interval pouzdanosti 95%

5. Zaključak

U ovom radu je metodom induktivno spregnute plazma atomske emisijske spektroskopije (ICP-AES) determinirana koncentracija selena u jajima. Metoda ICP-AES je kombinirana s hidridnom tehnikom koja je pomoću unošenja uzorka u analizator u formi plina, omogućila da gubitaka selena u procesu determinacije gotovo ni nema.

Literaturni dio rada nas upoznaje sa selenom kao elementom koji se u prirodi, pa tako i u čovjeku, pojavljuje u tragovima. Biogeokemijski ciklus selena obuhvaća njegovu cirkulaciju kroz sustave biosfere, hidrosfere i atmosfere te njihove moguće interakcije. Za čovjeka, selen je esencijalni nutrijent što znači da ga se u organizam mora unositi jer ga tijelo nije sposobno samo sintetizirati. Unos selena u ljudski organizam je pretežito kroz hranu. Unos iz drugih izvora u atmosferi je gotovo zanemariv. Glavni izvori selena u čovjekovoj prehrani su žitarice, meso i mesni proizvodi, riba, jaja te pojedino povrće, voće i orašasti plodovi.

Jaja su poznata nutritivno visoko vrijedna namirnica. Sa 4 do 6 grama proteina po jajetu, mastima u obliku dobrog kolesterora i fosfatidata, čine kvalitetan energtski obrok. Također su dobar izvor selena. U eksperimentu opisanom u ovom radu uzorak jaja je prethodno, propisano metodi, pripremljen. Tada je uzorak podvrgnut analizi metodom ICP-AES. Rezultati provedene analize pokazuju da je veća koncentracija selena u žumanjcima nego u bjelanjcima, i da se u jajima koja su dobivena od nesilica koje su hranjene smjesom obogaćenom selenom koncentracija selena u žumanjcima i bjelanjcima značajno povećala.

6. Literatura :

[1] E. M. Bem, Environmental Health Perspectives, 37(1981), str. 183-200.

[2] R. Bošnjaković, Selen- Antioksidans ili Prooksidans?

[3] G. F. Combs Jr., British Journal of Nutrition, 85(2001), str. 517-547.

[4] N.N. Greenwood and A. Ernshaw ,Chemistry of the Elements, 2nd edn.,16. chapter; Selenium, Tellurium and Polonium, 1997, str 747-788.

[5] H. Hartikainen, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18(2005), str. 309-318

[6] I. Išasegi, Inovativnom tehnologijom do povećanja sadržaja selena i cinka u jajima kokoši hrvatice, Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivreda,Smjer Zootehnika, Osijek, 2017.

[7] J.E. Jorpes, M.D., Jac. Berzelius; His Life and Work, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 1970.

[8] J. Kardos, K. Zimmer, E. Coni, S. Caroli and A. Stacchini, Ann. Ist. Super. Sanita, 25(1989), str. 505-510.

[9] L.D. Koller and J.H. Exon, Can J Vet Res, 50(1986), str 297-306.

[10] Kralik Z,, Kralik G, Grčević M, Kralik I, Gantner V, Physical-Chemical Characteristics of Designer and Conventional Eggs, Brazilian Journal of Poultry Science, 2018.

[11] S. Kumaraveil, R. Paranthaman and S. Amutha, Asian Journal of Chemistry, 26(2014), str 7259-7261.

[12] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandr, Pharmacognosy Reviews, 4(2010), str. 118-126.

[13] R. Morrill, The history of selenium research.

[14] Natasha, M. Shahid, N. K. Niazi, S. Khalid, B. Murtaza, I. Bibi, M. I. Rashid, Environmental Pollution, 234(2018), str. 915-934.

[15] M. Pettine, T. J. McDonald, M. Sohn, G. A. K. Anquandah, R. Zboril, V. K. Sharma, Trends in Environmental Analiticay Chemistry, 5(2015), str 1-7.

[16] N.V.C. Ralston, J. Unrine, D. Wallschläger, Biogeochemistry and Analysis of Selenium and its Species, North American Metals Council, Washington, D.C.

[17] M. P. Rayman, H. G. Infante and M. Sargent, British Journal of Nutrition, 100(2008), str 238-253.

[18] M. P. Rayman, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK, 379(2012), str.1256-1268.

[19] M. P. Rayman, Lancet, 356(2000), str. 233–24.

[20] C. Reilly, Trends in Food Science & Technology, 9 (1998), str. 114-118.

[21] M. Roman, Selenium: Properties and Determination, Encyclopedia of Food and Health, Institute for the Dynamics of Environmental Processes, Venice, Italy, 2016., str.734 .

[22] V. K. Sharma, T. J. McDonald, M. Sohn,G. A. K. Anquandah, M. Pettine, R. Zboril, Biogeochemistry of selenium. A review, Springer International Publishing Switzerland 2014.

[23] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, Biomedicine & Pharmacotherapy, 57 (2003), str. 134–144.

[24] U. Tinggi, C. Reilly and C. M.Patterson, Journal Of Food Composition And Analysis, 5 (1992), str. 269-280.

[25] M. E. Weeks, Discovery of the Elements, 6th edn., Journal of Chemical Education, Easton, Pa., 1956, str. 303-337.

[26] L. H..E. Winkel, Bas Vriens, G. D. Jones, L. S. Schneider, E. Pilon-Smits and G. S. Bañuelos, Nutrients , 7 (2015), str. 4199-4239