

SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU V ODTUČNĚNÉM ŘEPKOVÉM ŠROTU

JIŘÍ BALÁN^{a*}, MAGDA VOSMANSKÁ^a,
JIŘINA SZÁKOVÁ^b a OTO MESTEK^a

^a Vysoká škola chemicko technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha 6
Oto.Mestek@vscht.cz

Došlo 27.11.13, přijato 9.1.14.

Klíčová slova: selen, speciální analýza, řepkový šrot

Úvod

Selen je esenciální stopový prvek, který hraje v lidském organismu řadu důležitých rolí, uplatňuje se zejména při syntéze thyroidních hormonů, regulaci antioxidantních procesů, produkci prostaglandinů a podpoře růstu a plodnosti. Je např. důležitou složkou antioxidantního enzymu glutathionperoxidasy, enzymů jodothyroninododas a proteinů, jako je třeba důležitý selenoprotein W, jehož nedostatek v kombinaci s nedostatkem vitamínu E může vést k svalové degeneraci¹. Řada nejenom selenoproteinů, ale i nízkomolekulárních látek obsahujících selen, jako je např. aminokyselina Se-methylselenocystein, má protirakovinotvorné účinky².

Česká republika patří mezi oblasti s nedostatkem selenu, což je dáno především složením geologického podloží a omezeným přechodem selenu z půdy do rostlin a následně do zvířecích i lidských organismů. Prokázala to řada studií zabývajících se obsahem selenu v krvi či svalovině jak divokých³ nebo hospodářských^{4,5} pasoucích se zvířat, tak i lidí^{6,7}. Ve všech těchto studiích byla prokázána snížená hladina selenu. Tuto nepříznivou situaci lze řešit fortifikací potravního řetězce selenem. Jednou z rostlin, která dobře selen přijímá po foliární aplikaci, je řepka olejka (*Brassica napus* L.). V semenech řepky je selen koncentrován v neolejnaté frakci⁸ a odtučněný řepkový šrot (ORŠ), který je odpadem z výroby řepkového oleje, pak může být následně využit jako krmivo hospodářských zvířat. V minulosti bylo již např. prokázáno, že takováto selenem obohacená dieta vedla ke zvýšení hladiny selenu v krvi krav⁹.

Pouhá znalost celkové koncentrace prvku v biologických materiálech není pro vyhodnocení jejich

účinku dostatečná, je potřeba znát také distribuci mezi jednotlivé vazebné formy – specíe¹⁰. Data o koncentraci jednotlivých specií se získávají v procesu speciální analýzy¹¹, která se obvykle provádí spojením separačních metod a metod stopové prvkové analýzy¹². Nejčastěji, a to i v případě speciální analýzy selenu, se jedná o kombinaci kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP/MS)¹³. Speciální analýza selenu se nejčastěji provádí na úrovni jednotlivých selenoaminokyselin a dalších nízkomolekulárních látek: seleničitan (Se(IV)), selenan (Se(VI)), selenomethionin (SeMet), selenocystin (SeCys₂), Se-methylselenocystein (MeSeCys) a další, které se do roztoku uvolní enzymatickou hydrolýzou nespecifickými proteasami^{14–21}. Separace těchto látek se provádí pomocí různých módů LC, a to zejména iontově výměnné chromatografie^{14,18–22} a chromatografie na obrácených fázích (RPC)^{15–17,22,23}.

Cílem našeho výzkumu bylo připravit a ověřit metodu speciální analýzy selenu pro plánovaný rozsáhlý výzkum fortifikace řepky olejky selenem a následně využití ORŠ jako krmiva hospodářských zvířat. Základem této metodiky jsou naše předchozí úspěšné experimenty ve speciální analýze metabolitů selenu v lidské moči pomocí spojení ICP/MS a RPC (cit.²⁴). Protože specíe selenu obsažené v rostlinných materiálech se částečně liší od specií obsažených v moči, bylo nutno ověřit a případně modifikovat složení mobilní fáze pro chromatografické dělení a ověřit základní parametry detekce. Vyvinutá metodika byla následně aplikována na vzorky ORŠ z prvních předběžných pokusů fortifikace řepky olejky selenem.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Měření metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem byla realizována na spektrometru Elan DRC-e (PerkinElmer, Concord, Kanada), vybaveném koncentrickým zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou a reakční kolizní celou (DRC) pro eliminaci spektrálních interferencí. Separace specií selenu probíhala technikou HPLC a aparatura se skládala z vysokotlaké pumpy (Series 200, PerkinElmer, USA), injektoru Rheodyne 9010 vybaveného 50 µl dávkovací smyčkou a kolonou RP-C18 (Purosphere Star-C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, SRN). Rozklad vzorků pro stanovení celkového obsahu selenu se prováděl v mikrovlnném mineralizačním zařízení Uniclever BMI-Z (Plazmatronika, Wrocław, Polsko). K úpravě pH mobilní fáze byl použit digitální pH metr pH02 (Labio, Praha, ČR).

* Jiří Balán tuto práci úspěšně prezentoval na soutěži O cenu firmy Merck 2013 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

Reagencie a základní roztoky

Pro stanovení celkové koncentrace selenu byl použit základní kalibrační roztok $1000 \pm 2 \text{ mg l}^{-1}$ Se (Analytika Praha spol. s r.o., ČR), k přípravě roztoků vnitřního standardu byl použit základní roztok $1000 \pm 2 \text{ mg l}^{-1}$ Ge (Merck). Kalibrační roztoky specií selenu byly připraveny ze selenomethioninu (min. 99%), selenocystinu (min. 98%), Se-methylselenocysteinu (min. 99%), seleničitanu sodného (BioReagent) a selenanu sodného (BioXtra), vše Sigma-Aldrich (Steinheim, SRN).

Složení mobilní fáze pro chromatografickou separaci specií selenu bylo následující: 5 mmol l^{-1} 1-butansulfonatan sodný (min. 99%, Merck), 4 mmol l^{-1} kyselina malonová (pro syntézu, Merck), 16 mmol l^{-1} hydroxid tetramethylamonia (min. 99%, Sigma), 1 % (v/v) methanol (Uvasol, Merck) a $100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ Ge (vnitřní standard). Výsledné pH bylo nastaveno přidávkou kyseliny chlorovodíkové (Suprapur, Merck).

Další používané chemikálie byly kyselina dusičná (Suprapur, Merck), proteasa XIV (Sigma), tris (hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Merck) a petrolether (p.a., Lach-Ner, Neratovice, ČR). Všechny roztoky byly připraveny v deionizované vodě (Millipore, Bedford, USA).

Postupy

Stanovení celkového obsahu selenu bylo prováděno po rozkladu vzorků v mikrovlnném rozkladném zařízení.

Tabulka I

Podmínky stanovení Se metodou ICP-MS

Parametr	Stanovení celkového obsahu	Speciační analýza
<i>Obecné parametry</i>		
průtok Ar zamlžovačem, 1 min^{-1}	0,78–0,82 (vždy optimalizováno)	
průtok plazmového Ar, 1 min^{-1}	11	
průtok pomocného Ar, 1 min^{-1}	1	
příkon do plazmatu, W	1 400	
napětí na čočkách	režim Autolens	
režim měření	odečet na vrcholu píku	
sledované nuklidy	^{80}Se , ^{74}Ge	
<i>Parametry DRC</i>		
průtok reakčního plynu (CH_4), 1 min^{-1}	0,6	
RP _a	0	
RP _q	0,15	
<i>Časování měření</i>		
trvání jednoho scanu (Dwell/Time), ms/nuklid	50	50
počet scanů na odečet (Sweep/Reeding)	10	10
počet odečtů na opakování (Reeding/Replicate)	1	1000
Počet opakování (Replicates)	20	1
celková doba měření, s	20	1000

Do 110 ml teflonové rozkladné nádoby se navázilo 0,5–0,6 g OŘŠ a rozkládalo se s 3 ml konc. HNO_3 po dobu 10 min a mineralizát se převedl do 25ml odměrné baňky. Měření metodou ICP/MS probíhalo za podmínek uvedených v tab. I. Kalibrační roztoky (0, 10 až $20 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ Se) i vzorky obsahovaly vnitřní standard Ge o koncentraci $100 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$.

Speciační analýza selenu byla prováděna po enzymatické hydrolýze. K navážce 0,5–0,6 g OŘŠ se přidalo 50 mg proteasy XIV a 10 ml pufru Tris-HCl ($c = 20 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 7,5). Extrakce probíhala za intenzivního třepání při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 h. Suspenze byla následně odstředěna při 14 000 ot/min a supernatant byl přefiltrován přes nylonový filtr s průměrem filtračních pórů $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Objem nástřiku vzorku pro chromatografickou separaci byl $50 \text{ } \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze byl 1 ml min^{-1} . Výstup z chromatografické kolony byl připojen do zmlžovače ICP/MS, který sloužil jako prvkově specifický detektor. Podmínky detekce jsou uvedeny v tab. I.

Vzorky

Pro pokusy byly vybrány dva kultivary řepky olejky, které byly pěstovány v bramborářské oblasti Humpolec. Jednalo se o odrůdu Sitro (středně raná hybridní odrůda s vysokým výnosem semen i v chladnějších oblastech, až 5 t semen z 1 ha, vhodná pro intenzivní agrotechniku) a odrůdu NK Oktans (polopozdní odrůda s vysokým výnosem semen i oleje a dobrou odolností vůči černi řepkové a sclerotinové hnilobě)²⁵. Ve vegetační fázi dlouhivého

růstu byl proveden postřik rostlin seleničitanem sodným v dávce 50 g/ha Se. Souběžně s tím byly pěstovány kontrolní rostliny bez postřiku. Před speciální analýzou byl ze semen připraven OŘŠ: semena byla rozmělněna v nožovém mixeru a odtučněna v Soxhletově extraktoru za použití petroletheru jako extrakčního činidla po dobu 4 h. Poté byl OŘŠ vysušen při 105 °C po dobu 2 h.

Výsledky a diskuse

Chromatografická separace

Výchozí složení mobilní fáze 2,5 mmol l⁻¹ 1-butansulfonan sodný, 8 mmol l⁻¹ TMAH, 4 mmol l⁻¹ kyselina malonová, 0,05 % (v/v) methanol, které sloužilo jako základ pro optimalizaci, bylo převzato ze studie zabývající se speciální analýzou selenu v lidské moči²⁴. Prvním optimalizovaným parametrem byla hodnota pH. Během analýz byl separován roztok obsahující směs Se(VI), Se(IV), SeCys₂, MeSeCys a SeMet o koncentraci každé specie odpovídající 50 µg l⁻¹ Se a hodnota pH mobilní fáze se postupně měnila v rozmezí 3–7. Kritériem optimalizace bylo chromatografické rozlišení dvou po sobě eluovaných složek. Výsledky experimentů jsou uvedeny v tab. II. Obr. 1 ukazuje chromatogram při zvolené optimální hodnotě pH 5. Při této hodnotě pH mobilní fáze dochází i k nejlepší možné separaci Se(IV) a Se(VI), která však přesto bohužel není dokonalá. Všechna následující měření byla prováděna při hodnotě pH 5.

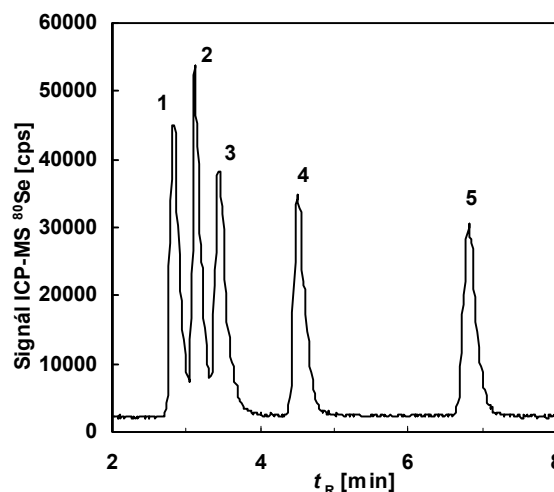
Dalším optimalizovaným parametrem byl obsah methanolu v mobilní fázi. Přítomnost methanolu v mobilní fázi zvyšuje v RPC eluční schopnost. Bez jeho přítomnosti v mobilní fázi dochází ke zborcení alkylového řetězce vázaného na silanolové skupiny silikagelu a tím ke zhoršení separačních vlastností kolony. Vysoký obsah methanolu ale na druhou stranu snižuje stabilitu plazmatu v ICP/MS. Z důvodu lepšího rozkladu methanolu v plazmatu byl použit relativně vysoký příkon 1400 W a byl testován rozsah koncentrací od původních 0,05 % do 1,5 % (v/v). V tomto rozmezí neměla koncentrace methanolu vliv na rozlišení jednotlivých specií, měla však vliv na citlivost měření. Nejvyšší citlivosti bylo dosaženo při koncentraci 1 % (v/v). Tato koncentrace byla použita i ve všech následujících měřeních. Stejně tak na rozlišení specií nemělo vliv ani

zvýšení koncentrace iontově-párových činidel, která mají za úkol vázat disociované molekuly do formy, která ve vodném prostředí nenese náboj. Původní převzaté koncentrace 2,5 mmol l⁻¹ 1-butansulfonátu sodného (kationaktivního činidla) a 4 mmol l⁻¹ hydroxidu tetramethylamonia (anionaktivního činidla) byly zdvojnásobeny, což se projevilo opět pouze zvýšením citlivosti. Další zvyšování koncentrace nebylo testováno z důvodu vysoké koncentrace solí v mobilní fázi, která má opět negativní dopad na stabilitu plazmatu hmotnostního spektrometru.

Těmito experimenty bylo nalezeno optimální složení mobilní fáze pro separaci specií selenu a veškerá další měření byla provedena za použití této mobilní fáze o konečném složení: 5 mmol l⁻¹ 1-butansulfonátu sodného, 16 mmol l⁻¹ TMAH, 4 mmol l⁻¹ kyseliny malonové, 1 % (v/v) methanolu a 100 µg l⁻¹ Ge (IS).

Detekce

Cílem výzkumu bylo maximální možné zjednodušení postupu kalibrace jak v počtu analyzovaných vzorků, tak i v počtu analyzovaných specií. Bylo tedy nutné ověřit jak



Obr. 1. Chromatografická separace specií selenu, pH mobilní fáze 5, 1 – Se(VI), 2 – Se(IV), 3 – SeCys₂, 4 – MeSeCys, 5 – SeMet

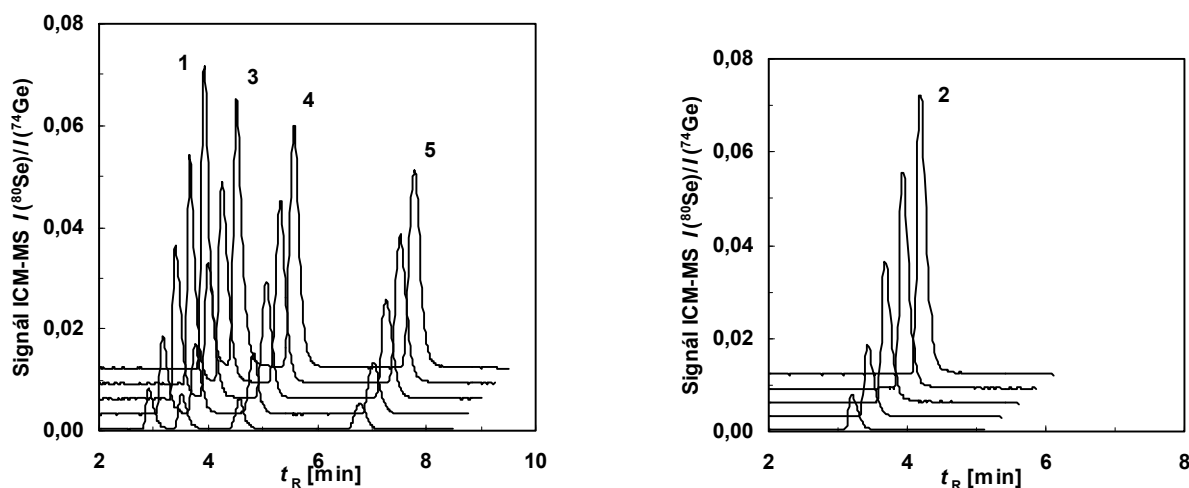
Tabulka II

Vliv pH mobilní fáze na chromatografickou separaci specií selenu

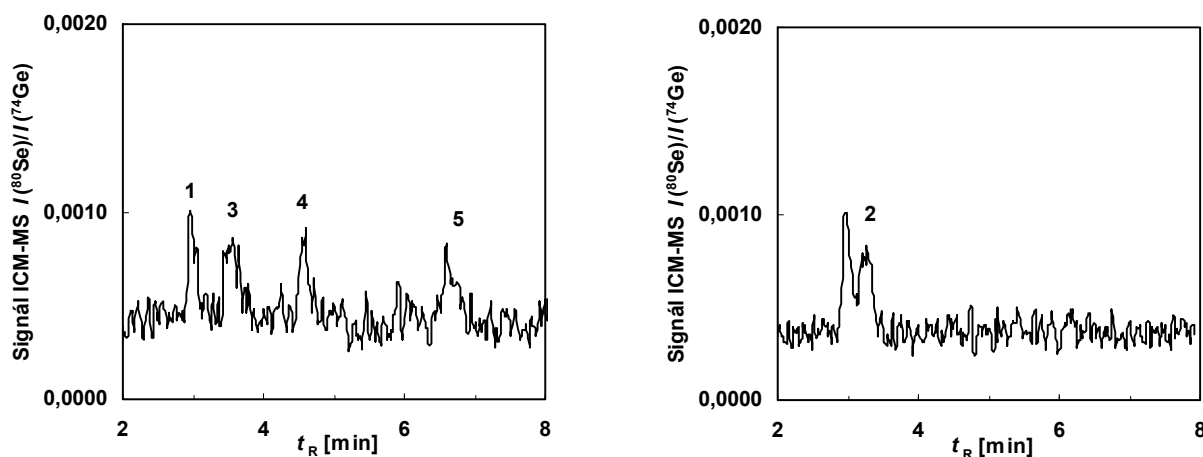
Separované složky	Rozlišení (R_s)				
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Se(VI)-Se(IV)	nerozlišené	0,69	0,92	0,92	0,89
Se(IV)- SeCys ₂	0,52	0,86	0,87	0,87	0,96
SeCys ₂ - MeSeCys	2,52	2,16	2,21	2,21	2,00
MeSeCys-SeMet	6,79	4,25	4,38	4,38	3,89

linearitu, tak shodu směrnic pro všechny specie, jejichž výskyt lze ve vzorcích předpokládat. Požadavek na shodnou citlivost měření pro různé specie metodou ICP/MS se může zdát samozřejmý, avšak v případě sloučenin selenu obsahujících skupinu $-SeH$ může během transportu vzorku do plazmatu dojít ke vzniku plynného selenu, jehož přenos do plazmatu je účinnější, než je tomu v případě iontových sloučenin. Linearita odezvy detektoru byla testována v rozsahu koncentrací specií odpovídající $0-40 \mu\text{g l}^{-1}$ Se (pět koncentračních hladin 5, 10, 20, 30 a $40 \mu\text{g l}^{-1}$ Se, každý roztok analyzován třikrát). Aby se zabránilo zkreslení výsledků způsobenému částečným překryvem pík Se (IV) s Se(VI), byl roztok seleničitanu analyzován samostatně, ostatní specie byly analyzovány ve směsi. Příklady chromatogramů jsou uvedeny na obr. 2. Kalibrační přímky

pro jednotlivé specie byly sestrojeny jako závislost plochy píku signálu Se vztaženého k signálu vnitřního standardu na koncentraci Se. Parametry regresních závislostí včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v tab. III. Linearita závislostí pro všechny specie byla statisticky potvrzena Mandelovým testem²⁶. Z tabulky je také patrné, že pro všechny specie platí, že interval spolehlivosti regresní konstanty a (posun po ose y) $a \pm 2 \cdot s(a)$ obsahuje nulu, tedy že všechny kalibrační závislosti procházejí počátkem. Protože Se(VI) je ze všech testovaných specií selenu nejstabilnější, byly ostatní kalibrační přímky porovnány právě s kalibrační závislostí naměřenou pro tuto specii. Pomocí testu shody dvou regresních závislostí²⁷ bylo potvrzeno, že kalibraci roztokem selenanu lze použít i ke kvantifikaci ostatních specií.



Obr. 2. Chromatogramy kalibračních roztoků, 1 – Se(VI), 2 – Se(IV), 3 – SeCys₂, 4 – MeSeCys, 5 – SeMet, postupně 5 ng ml⁻¹ Se, 10 ng ml⁻¹ Se, 20 ng ml⁻¹ Se, 30 ng ml⁻¹ Se a 40 ng ml⁻¹ Se

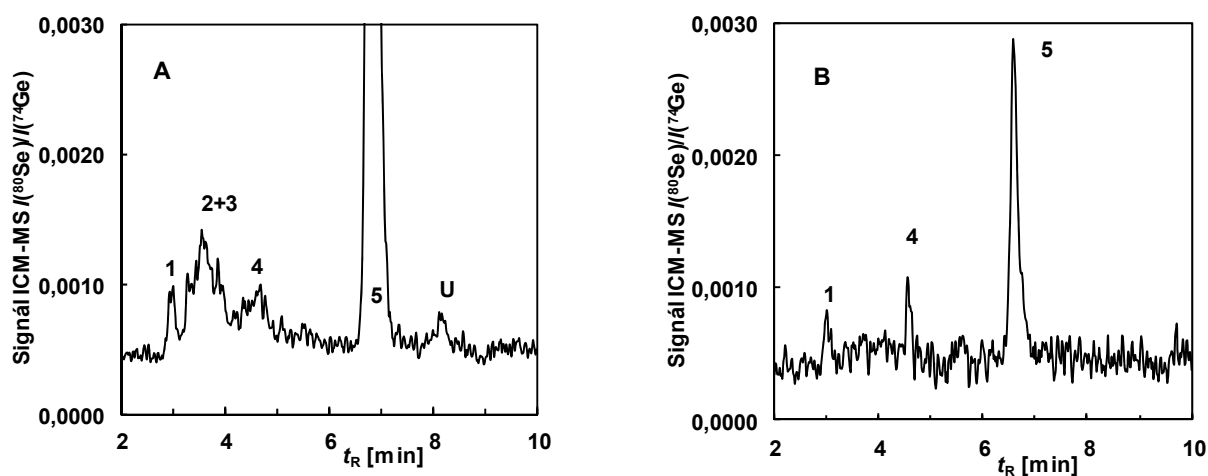
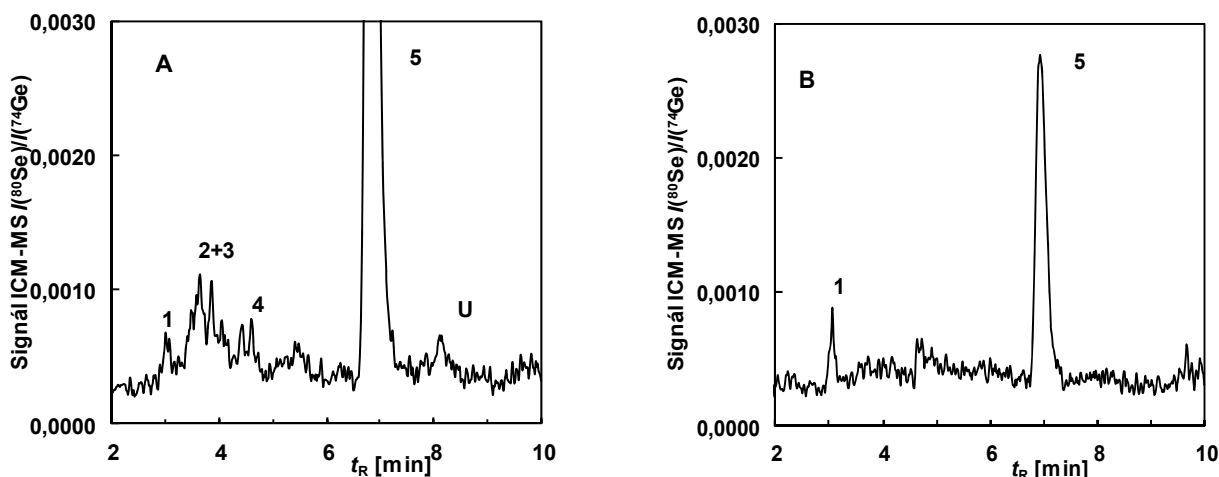


Obr. 3. Chromatogramy roztoků pro stanovení meze detekce, 1 – Se(VI), 2 – Se(IV), 3 – SeCys₂, 4 – MeSeCys, 5 – SeMet

Tabulka III

Parametry lineárního regresního modelu kalibrace pro jednotlivé specie a meze detekce a stanovitelnosti

Parametr	Se(VI)	Se(IV)	SeCys ₂	MeSeCys	SeMet
Posun <i>a</i>	0,00382	-0,00031	0,00134	-0,00021	0,00067
Směrnice <i>b</i> , dm ³ μg ⁻¹	0,01490	0,01455	0,01541	0,01431	0,01420
<i>s(a)</i>	0,00380	0,00190	0,00144	0,00142	0,00108
<i>s(b)</i>	0,00282	0,00218	0,00149	0,01256	0,00120
Mez detekce, μg l ⁻¹ Se	0,12	0,08	0,10	0,09	0,11
Mez stanovitelnosti, μg l ⁻¹ Se	0,41	0,25	0,34	0,29	0,37

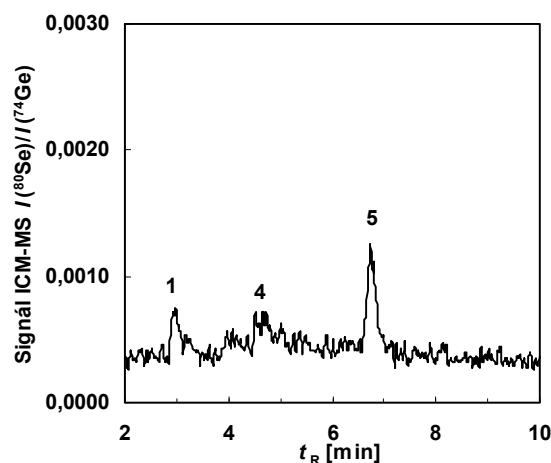
Obr. 4. Chromatogramy extraktů ORŠ, odrůda NK Oktans, A – fortifikovaný vzorek, B – kontrolní vzorek, 1 – Se(VI), 2–3 –Se(IV) + SeCys₂, 4 – MeSeCys, 5 – SeMet, U – neznámá specieObr. 5. Chromatogramy extraktů ORŠ, Sitro. A – fortifikovaný vzorek, B – kontrolní vzorek, 1 – Se(VI), 2–3 – Se(IV) + SeCys₂, 4 – MeSeCys, 5 – SeMet, U – neznámá specie

Meze detekce a stanovitelnosti byly pro jednotlivé specie odhadnuty z variability naměřených ploch píků v chromatogramu roztoku obsahující specie selenu na velmi nízké koncentrační úrovni odpovídající cca $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$ Se, přičemž roztok Se(IV) byl z důvodu nedokonalé separace specií připraven a analyzován opět samostatně. Mez detekce byla odhadnuta jako trojnásobek a mez stanovitelnosti jako desetinásobek směrodatné odchylky ($n=10$) získaných ploch. Příklad chromatografické separace těchto roztoků je na obr. 3. Z výsledků (viz tab. III) lze konstatovat, že meze detekce a stanovitelnosti jednotlivých specií se navzájem příliš neliší a leží na úrovni $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$ Se až $0,3 \mu\text{g l}^{-1}$ Se.

Analýza reálných vzorků

Ověřená metodika byla aplikována na reálné vzorky semen dvou odrůd řepky olejky. Základní charakteristiky sklizených semen a celkový obsah Se v ORŠ jsou uvedeny v tab. IV. Je patrné, že v případě obou odrůd došlo k významnému (cca šestinásobnému) navýšení obsahu Se v ORŠ, to znamená, že Se přijatý listy byl transportován až do reprodukčních orgánů rostlin – semen. Pomocí Studentova testu ($\alpha = 0,05$) bylo prokázáno, že v obou kontrolních vzorcích je obsah Se nerozlišitelný. Na druhou stranu tento test ukázal, že u odrůdy Sitro došlo k vyššímu ná-

růstu obsahu Se po aplikaci postřiku, než u odrůdy NK Oktans. Neméně zajímavým faktem je také to, že v případě odrůdy Sitro byl nárůst obsahu selenu doprovázen významným snížením olejnatosti semen. Tento jev zaslouží další výzkum, protože zlepšení kvality ORŠ je



Obr. 6. Chromatogram specií obsažených ve slepém stanovení, 1 – Se(VI), 4 – MeSeCys, 5 – SeMet

Tabulka IV

Základní parametry zkoumaných semen řepky olejky

Odrůda	Olejnatost ^a [% m/m]	Vlhkost ^a [% m/m]	Se ^b [$\mu\text{g g}^{-1}$]
NK Oktans, kontrolní vzorek	49,7 ($s=0,8$)	5,51 ($s=0,04$)	0,069 ($s=0,018$)
NK Oktans, fortifikováno	48,4 ($s=0,7$)	5,56 ($s=0,06$)	0,428 ($s=0,028$)
Sitro, kontrolní vzorek	57,2 ($s=0,4$)	5,25 ($s=0,03$)	0,082 ($s=0,022$)
Sitro, fortifikováno	51,4 ($s=0,2$)	5,89 ($s=0,05$)	0,528 ($s=0,027$)

^a Surová semena, ^b ORŠ

Tabulka V

Obsah specií selenu v enzymatickém extraktu vzorků ORŠ, výsledky jsou uvedené v $\mu\text{g g}^{-1}$ Se

Vzorek	Se(VI)	Se(IV)+SeCys ₂	MeSeCys	SeMet	neident. spec. ($t_R=8,0$ min)
NK Oktans, kontrolní vzorek	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	0,003 ($s=0,002$)	n.d. ^a
NK Oktans, fortifikováno	0,003 ($s=0,001$)	0,026 ($s=0,006$)	0,003 ($s=0,001$)	0,151 ($s=0,017$)	0,005 ($s=0,001$)
Sitro, kontrolní vzorek	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	0,007 ($s=0,003$)	n.d. ^a
Sitro, fortifikováno	n.d. ^a	0,026 ($s=0,002$)	0,012 ($s=0,002$)	0,143 ($s=0,002$)	0,006 ($s=0,001$)

^a n.d. – signál neodlišený od slepého pokusu

zde bohužel doprovázeno snížením obsahu primární průmyslové složky – oleje.

V enzymatickém extraktu studovaných vzorků OŘŠ byla provedena analýza uvolněných selenosloučenin, ukázky chromatogramů jsou na obr. 4 a 5. Současně s analýzou vzorků byla prováděna slepá analýza, protože se ukázalo, že použitá proteáza také obsahuje určitý podíl selenu, zejména ve formě SeMet, částečně i Se(VI) a MeSeCys, viz obr. 6. Kontrolní vzorky obou odrůd jsou charakteristické malou výtěžností enzymové extrakce na úrovni 7–10 %. Tento údaj je však značně zkreslen tím, že analyzované obsahy Se byly velice malé. V extraktu kontrolních vzorků byl nalezen pouze SeMet, obsah ostatních specií zůstal neodlišen od slepého pokusu. V extraktu fortifikovaného OŘŠ odrůdy NK Oktans (výtěžnost extrakce 43 %) byl nalezen zvýšený obsah Se(VI), Se(IV) a SeCys₂ (z důvodu špatného chromatografického rozlišení je uváděn společný obsah těchto specií) a MeSeCys. Hlavním metabolitem je však SeMet. Kromě těchto specií byla nalezena i zatím neidentifikovaná specie ($t_R = 8,0$ min). V extraktu fortifikovaného OŘŠ (výtěžnost extrakce 36 %) nebyl nalezen Se(VI), obsah Se(IV) a SeCys₂, SeMet a neidentifikované specie ($t_R = 8,0$ min) je podobný jako v případě odrůdy NK Oktans, pouze obsah minoritní specie MeSeCys je statisticky významně vyšší, než v případě odrůdy NK Oktans. Je tedy patrné, že obě odrůdy metabolizovaly přijatý seleničitan podobným způsobem. Podrobnější výsledky speciační analýzy jsou uvedené v tab. V.

Závěr

Česká republika patří mezi evropské země, ve kterých jsou obsahy selenu v půdě velmi nízké. Jednou z možností, jak zabránit deficitu selenu v lidském organismu, je zaručit vyšší obsah selenu v přirozené stravě jejím obohacováním. Pro zabezpečení vstupu selenu do sloučenin, které jsou organismy dobře přijímané, je třeba fortifikaci zařadit na samý počátek potravního řetězce, tedy do rostlin. Při kontrole cesty selenu od aplikace na rostliny až po konečné potravinářské produkty je třeba sledovat nejenom jeho celkový obsah, ale i jeho distribuci mezi jednotlivé sloučeniny – speciace. Během našich výzkumů se podařilo vyvinout a ověřit metodiku speciační analýzy selenu v rostlinných materiálech založenou na spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. Její aplikace na produkt jednoho z možných způsobů provedení fortifikace potravního řetězce, odtučněný řepkový šrot, prokázaly nejenom přeměnu seleničitanu, který do řetězce vstupoval, na selenoaminokyseliny, převážně na SeMet, ale také podobný metabolismus selenu ve dvou sledovaných odrůdách řepky.

Tato práce vznikla za podpory projektu GA ČR 13-04580S.

LITERATURA

- Zima T., Tesař V., Mestek O., Němeček K.: *Blood Purif.* 17, 187 (1999).
- Irons R., Carlson B. A., Hatfield D. L., Davis C. D.: *J. Nutr.* 136, 1311 (2006).
- Kursa J., Herzig I., Trávníček J., Illek J., Kroupová V., Fuksová S.: *Acta Vet.* 79, 403 (2010).
- Ludvíková E., Pavlata L., Vyskočil M., Jahn P.: *Acta Vet.* 74, 369 (2005).
- Pavlata L., Illek J., Pechová A., Matějčík M.: *Acta Vet.* 71, 3 (2002).
- Střítecká H., Hlubík P., Nováková J.: *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 2, 133 (2009).
- Kvíčala J., Zamrazil V., Němeček J., Jiránek J.: *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 278, 537 (2008).
- Seppan M. M., Kontturi J., Heras I. L., Madrid Y., Cámara C., Hartikainen H.: *Plant Soil* 337, 273 (2010).
- Bañuelos G. S., Mayland H. F.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 322 (2000).
- Feldmann J., Salaun P., Lombi E.: *Environ. Chem.* 6, 275 (2009).
- Sanz-Medel A.: *Spectrochim. Acta, Part B* 53, 197 (1998).
- Szpunar J., McSheehy S., Polec K., Vacchina V., Mounicou S., Rodriguez I., Lobinski R.: *Spectrochim. Acta, Part B* 55, 779 (2000).
- Michalke B.: *Trends Anal. Chem.* 21, 154 (2002).
- Cuderman P., Ozbolt L., Kreft I., Stibilj V.: *Food Chem.* 123, 941 (2010).
- Kotrbai M., Birringer M., Tyson F. J., Block E., Uden P. C.: *Analyst* 125, 71 (2000).
- Montes-Bayon M., Molet M. J. D., Gonzales E. B., Sanz-Medel A.: *Talanta* 68, 1287 (2006).
- Kahakachchi C., Boakye H. T., Uden P. C., Tyson J. F.: *J. Chromatogr. A* 1054, 303 (2004).
- Li H. F., Lombi E., Stroud J. L., McGrath S. P., Zhao F. J.: *J. Agr. Food Chem.* 58, 11837 (2010).
- Cuderman P., Kreft I., Germ M., Kovacevic M., Stibilj V.: *J. Agr. Food Chem.* 56, 9114 (2008).
- Pedrero Z., Encinar J. R., Madrid Y., Cámara C.: *J. Chromatogr. A* 1139, 247 (2007).
- Smrkolj P., Stibilj V., Kreft I., Germ M.: *Food Chem.* 96, 675 (2006).
- Slekovec M., Goessler W.: *Chem. Speciation Bioavailability* 17, 63 (2005).
- Montes-Bayon M., LeDuc D. L., Terry N., Caruso J. A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 872 (2002).
- Eichler S., Mestek O.: *Chem. Listy* 105, 200 (2011).
- Bečka D.: *Výsledky odrůd řepky ozimé - poloprovozní pokusy 2010/2011*. ČZU, Praha 2011.
- Funk W., Dammann V., Donnevert G., Iannelli S.: *Quality assurance in analytical chemistry: applications in environmental, food, and materials analysis, biotechnology, and medical engineering*, 2. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
- Anděl J.: *Základy matematické statistiky*, MatfyzPress, Praha 2011.

J. Balán^a, M. Vosmanská^a, J. Száková^b, and O. Mestek^a (^a *Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b *Department of Agroenvironmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague*): **Speciation Analysis of Selenium in the Defatted Rapeseed Meal**

Se is an essential element. Scarce Se contents in food can be remedied by supplementing Se in food and feed. Oilseed rape is a suitable source of Se. The aim of our work was optimization and verification of monitoring Se speciation in plant materials. The methodology included the release of Se compounds using a non-specific protease,

separation of Se species by reverse phase chromatography. The limit of detection ranged between 0.06–0.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se and the limit of determination between 0.19 and 0.43 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se depending on the Se specie. The linearity of calibration was confirmed in the range corresponding to 0–40 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se for each analyzed species. However, only selenate solution was used for final quantification. The method was applied to the samples of the defatted rapeseed meal of the two plant varieties of rapeseed (Sitro, NK Oktans), which were sprayed with a Na_2SeO_3 solution. The conversion of selenite mainly to selenomethionine was confirmed.

BRENTTAG

VÁŠ NEJVĚTŠÍ DISTRIBUTOR CHEMIKÁLIÍ...

Nabízíme téměř všechny druhy standardních chemikálií běžně používaných v různých průmyslových odvětvích:

<p>AdBlue Bytová chemie a kosmetika Barvy, laky a stavebnictví Farmaceutický průmysl Maziva Plasty a guma Výroba krmiv</p>	<p>Polygrafie Potravinářský průmysl Ropa a plyn Standardní chemikálie Úprava a čištění vody Víceúčelové speciální chemikálie Zpracování kovů</p>
---	--

Zveme vás ke spolupráci!

Brenntag CR s.r.o.
Mezi Úvozy 1850
19300 Praha 9
Česká Republika
tel. +420 283 096 111
fax +420 281 920 837
e-mail: office@brenntag.cz
www.brenntag.cz