

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša VOLK

**DOLOČANJE SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH NA
SLOVENSKEM TRŽIŠČU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Saša VOLK

**DOLOČANJE SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH NA
SLOVENSKEM TRŽIŠČU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF SELENIUM IN FISH AND FISH PRODUCTS
OF THE SLOVENIAN MARKET**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu Jožef Stefan na Odseku za znanosti o okolju v Ljubljani, kjer sem ugotavljala vsebnost selena v ribah in ribjih izdelkih, kupljenih na slovenskem tržišču.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Terezijo Golob, za somentorico doc. dr. Vekoslavo Stibilj in za recenzenta prof. dr. Božidarja Žlendera.

Mentorica: prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: doc. dr. Vekoslava Stibilj

Recenzent: prof. dr. Božidar Žlender

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Saša Volk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 637.56+664.95:546.23(043)=863
KG ribe/ribji izdelki/selen/slovensko tržišče
AV VOLK, Saša
SA GOLOB, Terezija (mentorica)/STIBILJ, Vekoslava (somentorica)/ŽLENDER, Božidar (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN DOLOČANJE SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH NA SLOVENSKEM TRŽIŠČU
TD Diplomsko delo
OP XI, 72 str., 26 pregl., 17 sl., 70 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Selen je esencialen element za ljudi in živali, hrana pa je njegov pomemben vir. Namen našega dela je bil uporabiti enostaven in hiter postopek za določanje celotne vsebnosti selena v ribah in ribjih izdelkih z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS). Na podlagi dobljenih rezultatov pa oceniti dnevni vnos selena z ribami in ribjimi izdelki. Za razkroj vzorcev smo uporabili razkrojno mešanico $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-V}_2\text{O}_5$. Pravilnost metode smo preverjali z uporabo ustreznih standardnih referenčnih materialov in z neodvisno metodo, radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA). Ves postopek je potekal v isti teflonski posodi. Meja zaznavnosti je bila nizka ($< 0,04$ ng/g raztopine), obnovljivost postopka je bila pod 5 %, analiza pa enostavna, hitra, relativno poceni in z majhno porabo kemikalij (varstvo okolja). Določili smo vsebnost selena v vzorcih rib in ribjih izdelkov, kupljenih na slovenskem tržišču in ugotovili, da je vsebnost selena v ribah in ribjih izdelkih primerljiva s podatki iz literature. Vsebnosti selena v svežih ribah je bila v območju od 8,5 do 99,7 $\mu\text{g}/100$ g, v ribjih izdelkih pa v območju od 20,6 do 117,9 $\mu\text{g}/100$ g. Ocenili smo, da z jedilno porcijo (100 g) svežih rib vnesemo 22 do 150 %, z jedilno porcijo ribjih izdelkov (ena konzerva) pa 16 do 296 % priporočenega dnevnega vnosa za selen (50 μg).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 637.56+664.95:546.23(043)=863
CX fish/fish products/selenium/Slovenian market
AU VOLK, Saša
AA GOLOB, Terezija (supervisor)/STIBILJ, Vekoslava (co-advisor)/ŽLENDER, Božidar (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI DETERMINATION OF SELENIUM IN FISH AND FISH PRODUCTS OF THE SLOVENIAN MARKET
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 72 p., 26 tab., 17 fig., 70 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Selenium is an essential element for humans and animals and food is the most important source. The purpose of this work was to use a simple and rapid procedure for determination of total selenium content in fish and fish products by hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS). On the basis of our results we estimated daily selenium intake by fish and fish products. For all samples a digestion mixture of HNO₃-H₂SO₄-H₂O₂-V₂O₅ was used. The accuracy of the method was tested by the use of adequate standard reference materials and an independent method, radiochemical neutron activation analysis (RNAA). The complete procedure was carried out in the same teflon vessel, the detection limit was low (< 0,04 ng/g solution), the reproducibility was below 5 %, the analysis was simple, not time-consuming, relatively inexpensive and with a low consumption of chemicals (environment protection). We determined the selenium content in fish and fish products of the Slovenian market. Selenium contents in fish and fish products were in the same range as literature data. Selenium content found in fresh fish covered a wide range, from 8,5 to 99,7 µg/100 g, and in fish products it ranged from 20,6 to 117,9 µg/100 g. We estimated that by edible part of 100 g fresh fish, the intake of selenium ranges from 22 to 150 %, and by consuming one edible part of fish products it ranges from 16 to 296 % of recommended daily intake of selenium (50 µg).

KAZALO VSEBINE

	stran
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SELEN	3
2.2 BIOLOŠKA VLOGA SELENA	3
2.2.1 Metabolizem selena	3
2.2.2 Vloga selenobeljakovin v telesu	6
2.2.3 Vnos in pomanjkanje selena	6
2.2.4 Toksičnost selena	9
2.2.5 Toksičnost selena za ribe	10
2.3 VSEBNOST SELENA V HRANI	11
2.3.1 Selen v morski hrani	13
2.3.1.1 Vsebnost živega srebra v morski hrani	15
2.3.2 Vnos selena s hrano	17
2.3.2.1 Vnos selena z ribami in ribjimi izdelki	18
2.4 METODE ZA DOLOČANJE SELENA V HRANI	22
2.4.1 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)	23
2.4.2 Validacija analizne metode	26
3 MATERIALI IN METODE	28

3.1 MATERIALI	28
3.1.1 Vzorčni material	28
3.1.1.1 Ribe	28
3.1.1.2 Ribji izdelki	30
3.1.1.3 Certificiran referenčni material (CRM)	34
3.1.2 Reagenti	35
3.1.3 Aparature	35
3.2 METODE DE LA	35
3.2.1 Priprava vzorcev	35
3.2.2 Razkroj vzorcev	36
3.2.3 Določitev selena s HG-AFS	37
3.2.4 Določitev selena z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA)	38
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	39
4.1 METODA HG-AFS ZA DOLOČANJE SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH	39
4.1.1 Razkroj vzorcev	39
4.1.2 Meja zaznavnosti	40
4.1.3 Izkoristek celotnega postopka za določanje selena	40
4.1.4 Metoda standardnega dodatka	41
4.1.5 Pravilnost in natančnost postopka	42
4.1.6 Obnovljivost postopka	43
4.1.7 Primerjava rezultatov vsebnosti selena v ribah in ribjih izdelkih dobljenih s HG-AFS in z neodvisno metodo RNAA	45
4.2 VSEBNOST SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH	46
4.2.1 Vsebnost selena v svežih ribah iz istega ribolovnega območja, ulovljenih v različnem časovnem obdobju	46
4.2.2 Vsebnost selena v ribjih izdelkih različnih lotov istega proizvajalca	49
4.2.3 Vsebnost selena v enakih ribjih izdelkih različnih proizvajalcev	52
4.2.4 Vsebnost živega srebra v izbranih ribjih izdelkih	54
4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV Z LITERATURO	56
4.4 OCENA VNOSA SELENA Z RIBAMI IN RIBJIMI IZDELKI	59
5 SKLEPI	65
6 POVZETEK	66
7 VIRI	67
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	stran
Preglednica 1. Ocenjene vrednosti za priporočene dnevne vnose selena	7
Preglednica 2. Vsebnost selena v različnih osnovnih živilih v nekaterih državah	12
Preglednica 3. Vsebnost topnega selena v želodčni in gastrointestinalni tekočini ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ribe) (Cabañero in sod., 2004)	14
Preglednica 4. Primerjava vsebnosti nekaterih elementov v ribjih tkivih iz province Guizhou in iz province Beijing (Zhang in sod., 2004)	15
Preglednica 5. Celokupna vsebnost selena in živega srebra ($\mu\text{g}/\text{g}$) v vzorcih rib (Cabañero in sod., 2004)	17
Preglednica 6. Dnevno zaužite količine selena na odraslo osebo v nekaterih državah	18
Preglednica 7. Vnos selena z ribami ($\mu\text{g}/\text{dan}$) v nekaterih državah (Selenium, 2002)	19
Preglednica 8. Seznam vzorcev svežih rib, kupljenih maja 2005 v ribarnici na ljubljanski tržnici	28
Preglednica 9. Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih marca 2005 v Ljubljani	30
Preglednica 10. Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih aprila 2005 v Ljubljani	32
Preglednica 11. Vsebnost selena v standardnem referenčnem materialu in nekaterih vzorcih ribjih izdelkov z razkrojem s koncentrirano in kadečo HNO_3 , v zaprtih teflonskih posodah in detekcijo s HG-AFS	39
Preglednica 12. Izkoristek celotnega analiznega postopka za razkroj selena v zaprti teflonski posodi	40
Preglednica 13. Primerjava rezultatov dobljenih z metodo standardnega dodatka in z umeritveno krivuljo	41
Preglednica 14. Določanje selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1	43
Preglednica 15. Obnovljivost določanja selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1	44

Preglednica 16.	Določanje selena v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2	44
Preglednica 17.	Obnovljivost določanja selena v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2	44
Preglednica 18.	Vsebnost selena v nekaterih vzorcih rib in ribjih izdelkov in v standardnem referenčnem materialu TORT 2, dobljenega s HG-AFS in z neodvisno metodo RNAA	45
Preglednica 19.	Vsebnost selena v svežih ribah iz istega ribolovnega območja, kupljenih na ljubljanski tržnici v obdobju treh mesecev	46
Preglednica 20.	Vsebnost selena v ribjih izdelkih istih proizvajalcev, različnih lotov	49
Preglednica 21.	Vsebnost selena v ribjih izdelkih različnih proizvajalcev	53
Preglednica 22.	Vsebnost selena in živega srebra v ribjih izdelkih najbolj zastopanih proizvajalcev C (Tajska), A (Italija) in E (Španija) na slovenskem tržišču	55
Preglednica 23.	Vsebnost selena v ribah in ribjih izdelkih iz naše raziskave in podatki iz literature	57
Preglednica 24.	Povprečna vsebnost selena v ribah iz nekaterih držav (Wyatt in sod., 1996), v primerjavi z rezultati naše raziskave	58
Preglednica 25.	Delež vnosa selena z jedilno porcijo svežih rib (100 g) glede na dnevni vnos 50 μg	59
Preglednica 26.	Delež vnosa selena z ribjo konzervo glede na dnevni vnos 50 μg	61

KAZALO SLIK

	stran
Slika 1. Presnovna pot anorganskega selena in selen vsebujočih aminokislin (Windisch, 2002)	4
Slika 2. Vrste beljakovin, ki vsebujejo selen (Suzuki, 2005)	5
Slika 3. Vnos selena s posameznimi živili (Foster in Sumar, 1997)	11
Slika 4. Pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov pri Slovencih (%) (Koch, 1997)	20
Slika 5. Pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov glede na regijo (%) (Koch, 1997)	20
Slika 6. Oskrba z ribami in morskno hrano v različnih državah na prebivalca v letu 2002 (povzeto po Marin, 2005)	21
Slika 7. Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra (Vandecasteele in Block, 1993)	26
Slika 8. Shema sistema HG-AFS	37
Slika 9. Primerjava umeritvene krivulje in krivulje dobljene s standardnim dodatkom za vzorec 85	41
Slika 10. Kontrolni diagram določanja selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1	42
Slika 11. Kontrolni diagram določanja selena v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2	43
Slika 12. Shematski prikaz povprečne vsebnosti selena za posamezne vrste svežih rib iz istega ribolovnega območja, kupljenih na ljubljanski tržnici v obdobju treh mesecev	47
Slika 13. Prikaz vsebnosti selena v ribjih izdelkih različnih lotov	51
Slika 14. Prikaz vsebnosti selena v enakih ribjih izdelkih različnih proizvajalcev	54
Slika 15. Pregled vsebnosti selena in živega srebra v ribjih izdelkih najbolj zastopanih proizvajalcev C (Tajska), A (Italija) in E (Španija) na slovenskem tržišču	56
Slika 16. Vnos selena z jedilno porcijo svežih rib (100 g) glede na priporočen dnevni vnos 30 – 70 µg	60

Slika 17. Vnos selena z zaužitjem konzerve glede na priporočen dnevni vnos 30 - 70 μg

63

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CV-AFS	atomska fluorescenčna spektrometrija hladnih par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EPA	Agencija za varovanje okolja (Environmental Protection Agency)
FAO	Mednarodna organizacija za hrano (Food and Agriculture Organization)
GSHP _x	glutation peroksidaza
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
HG-AAS	hidridna tehnika atomske absorpcijske spektrometrije
lot	serijska številka izdelka
NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat hidrogen
RDA	priporočen dnevni vnos (Recommended Dietary Allowance)
RSD	relativni standardni odmik
RNAA	radiokemična nevtronska aktivacijska analiza
SD	standardni odmik
SeCys	selenocistein
SeMet	selenometionin
SRM	standardni referenčni material
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

1 UVOD

Selen je življenjsko pomemben element v sledovih za ljudi in za živali. Njegovo pomanjkanje vodi do fizioloških in strukturnih sprememb, pri vnosu visokih koncentracij pa se pojavijo težave, ker je toksičen (Schrauzer, 1998).

V organizmih ga je večina vključenega v beljakovine. Najpomembnejše med njimi so selenocistein vsebujoče beljakovine (selenobeljakovine), ki so biološko aktivne in fiziološko regulirane. Selenobeljakovine sodelujejo pri antioksidativni zaščiti pred delovanjem reaktivnih kisikovih spojin (ROS), pri razstrupljanju toksičnih kovin in pri regulaciji redoks procesov v celici (Tinggi, 2003). Najprej sta Schwarz in Foltz odkrila antioksidativno vlogo selena prek encima glutation peroksidaze leta 1957 (Foster in Sumar, 1995), kasneje so odkrili njegovo vlogo v presnovi hormonov žleze ščitnice prek encima jodotironindejodinaze (Behne in sod., 1990). V selenoencimih je selen prisoten v obliki selenocisteina, ki je prepoznan kot enaindvajseta aminokislina in sodeluje pri sintezi proteinov v ribosomih (Atkins in Gesteland, 2000).

Primarni vir selena je hrana. Priporočljiv dnevni vnos selena je 55 µg/dan za odrasle ženske in moške (Dietary reference intakes, 2000), v Referenčnih vrednostih za vnos hranil (2004) pa navajajo ocenjeno vrednost za primeren dnevni vnos selena 30 – 70 µg. Pod spodnjo mejo, za katero na Kitajskem navajajo 13 µg/dan za ženske in 19 µg/dan za moške (RDA, 1989), se že pojavijo znaki pomanjkanja, zgornja meja, ki še ne povzroči težav pa je 400 µg/dan (Dietary reference intakes, 2000). Dnevni vnos selena je pogosto manjši od priporočenega, saj njegova vsebnost v zemlji in posledično tudi v hrani niha glede na posamezna geografska področja. Vsebnost selena v rastlinah je odvisna od njegove vsebnosti v tleh, na katerih rastejo, vsebnost v živilih živalskega izvora pa kaže količino selena v prehrani živali (Mc Naughton in Marks, 2002). Več selena vsebujejo predvsem živila z veliko vsebnostjo beljakovin, zato so bogat vir predvsem drobovina, meso mišičnine in jajca. Tudi morski sadeži vsebujejo več selena, saj ga bioakumulirajo iz vodnega okolja. Precej manj selena pa vsebujejo mleko in mlečni izdelki ter sadje in zelenjava (Kadragova in sod., 1997).

Ugotavljanje selena v živilih postaja zaradi boljšega razumevanja vloge selena v okolju in za zdravje ljudi, vedno pomembnejše (Pyrzynska, 1996). Vsebnost selena v vzorcu je odločilen dejavnik pri odločitvi, katero metodo naj bi uporabili (Foster in Sumar, 1995). Za določanje selena v hrani so primerne analizne metode z nizko mejo zaznavnosti, ker živila večinoma vsebujejo nizke vsebnosti selena (večinoma od 10 do 300 ng/g). Najpogosteje se uporabljajo fluorimetrična metoda, radiokemična nevtronska aktivacijska analiza (RNAA) ali atomska absorpcijska spektrometrija s hidridno tehniko (HG-AAS) (Combs in Combs, 1986).

V zadnjem času se za določanje selena uporablja tudi atomska fluorescenčna spektrometrija s hidridno tehniko (HG-AFS), ker se zaradi ločitve selena od osnove zmanjša vpliv interferenc, analiza pa je preprosta, hitra in relativno poceni (Foster in Sumar, 1996).

4.4 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen našega dela je bil:

- uporabiti metodo določanja selena v ribah in ribjih izdelkih, ki naj bo enostavna, dokaj hitra in naj bi bila poraba kemikalij čim manjša (varstvo okolja),
- ugotoviti vsebnost selena v ribah in ribjih izdelkih, z različnimi loti, z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS),
- primerjati naše rezultate z literaturnimi podatki,
- oceniti dnevni vnos selena z ribami in ribjimi izdelki.

Predvidevali smo, da ribe in ribji izdelki, kupljeni na slovenskem tržišču vsebujejo velike vsebnosti selena. Pričakovali smo, da vsebnost selena med vrstami rib niha. Nihanja v vsebnosti selena smo pričakovali tudi pri ribjih izdelki različnih proizvajalcev in pri enakih ribjih izdelkih, različnih lotov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SELEN

Jöns Jacob Berzelius je bil švedski kemik, ki je leta 1817 v usedlinah, na dnu svinčenih komor v tovarni žveplove kisline, odkril selen (Foster in Sumar, 1997). Njegovo toksično delovanje pa je verjetno omenjal že Marco Polo, ko je leta 1295 na svojih potovanjih po Kitajski, poročal o strupeni rastlini iz goratega območja blizu Tibeta, ki povzroča odpadanje kopit pri živalih (Reilly, 1996).

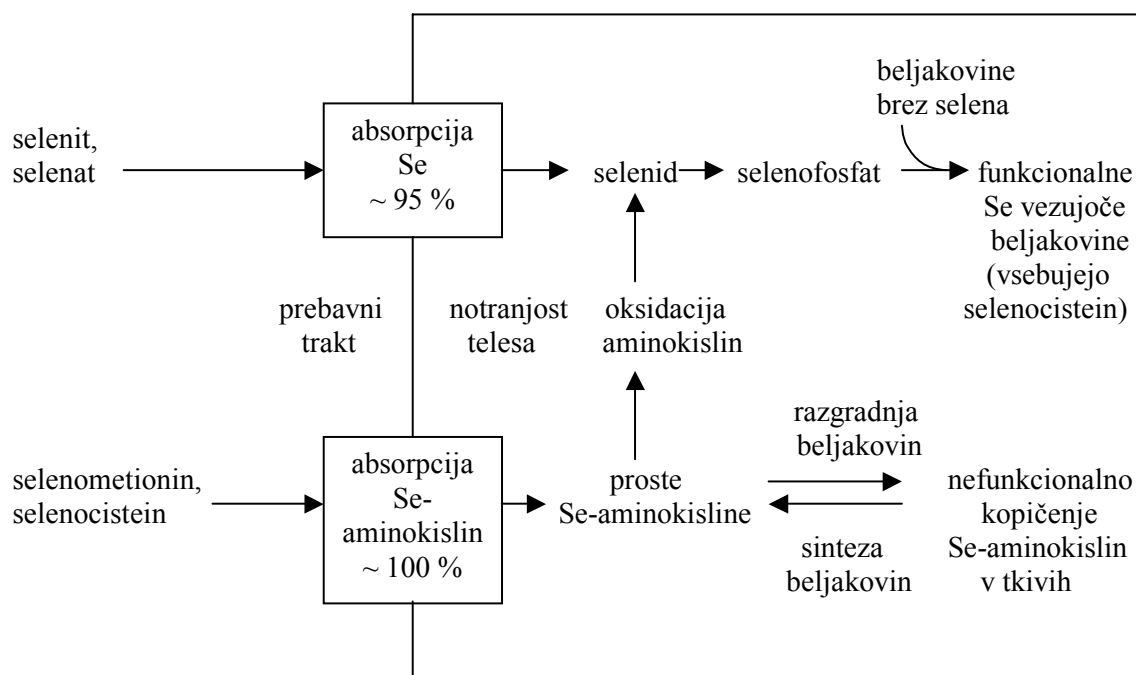
Selen je element, ki se nahaja v šesti skupini periodnega sistema med žveplom in telurjem in sodi med metaloide, saj nosi tako lastnosti kovin, kot nekovin. V naravi je prisotnih 6 naravnih izotopov selena (^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se), od katerih največji delež predstavlja ^{80}Se (Selenium in nutrition, 1983). Selen je sestavni del mnogih anorganskih spojin, v katerih nastopa v različnih oksidacijskih stanjih: -2 (selenid), 0 (elementarni Se), +2 (tioselenat), +4 (SeO_3^{2-} - selenit), +6 (SeO_4^{2-} - selenat). V naravi je vezan tudi v organskih spojinah: selenocistein, selenocistin, Se-metilselenocistein, selenometionin, Se-metilselenometionin, selenosečnina, dimetil selenid, dimetil diselenid, selenoholin, selenobetain, selenohomocistin, selenocistationin, itd. (Reilly, 1996; Foster in Sumar, 1997).

2.2 BIOLOŠKA VLOGA SELENA

2.2.1 Metabolizem selena

V organizem pridejo selenove zvrsti večinoma s hrano, do mesta absorpcije pa prispejo kvantitativno in kvalitativno nespremenjene, saj vzdolž intestinalnega trakta ne reagirajo z drugimi hranilnimi komponentami. Absorpcija selena v intestinalnem traktu je zelo dobra, poteka pa predvsem v dvanajstniku, slepiču in debelem črevesu. Na splošno se organske zvrsti selena absorbirajo bolj učinkovito kot anorganske (Reilly, 1996). Poskusi z radioaktivnimi sledilci so pokazali, da se iz intestinalnega trakta absorbira okoli 95 % selena v anorganski obliki; organski obliki (selenocistein in selenometionin) vstopita v telo po aminokislinski absorpcijski poti z izkoristkom skoraj 100 % (slika 1) (Windisch, 2002). Na samo absorpcijo vplivajo še druge komponente hrane, kot so vitamini A, C in E, pa tudi vrsta hrane (selen se iz rastlinske hrane bolje absorbira kot iz živalske) (Reilly, 1996).

Človek s hrano zaužije selen predvsem v obliki selenoaminokislin (selenometionina in selenocisteina), ki so v telesu podvržene različnim metabolnim potem in pri tem nastanejo različne spojine, ki vsebujejo selen (slika 1).

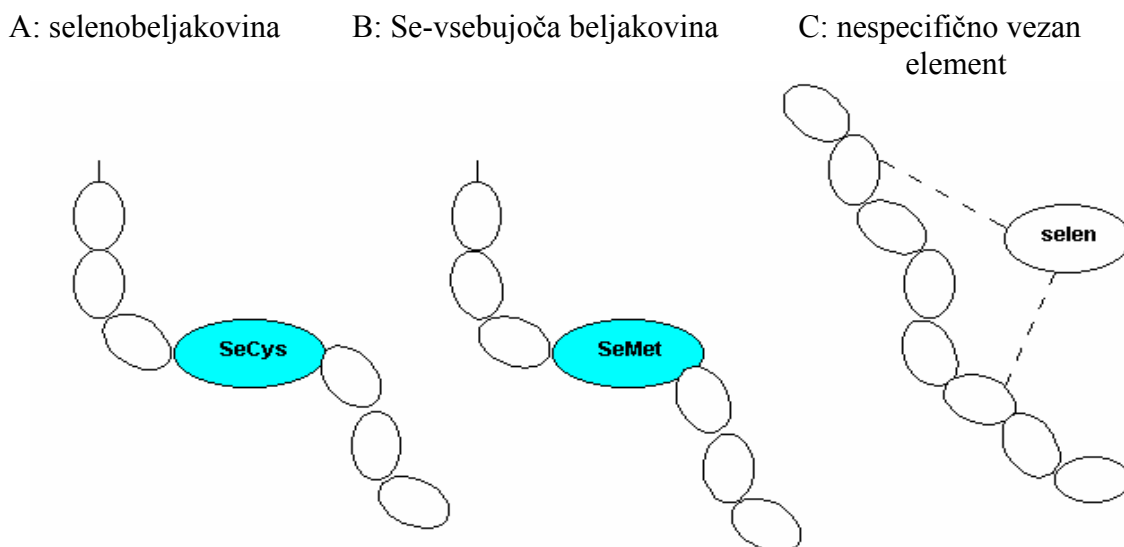


Slika 1. Presnovna pot anorganskega selena in selen vsebujočih aminokislin (Windisch, 2002)

Selenocistein se razgradi do vodikovega selenida (H_2Se), selenometionin pa se lahko encimsko pretvori do selenocisteina ali se v organizmu vgradi v beljakovine, kjer nadomesti metionin, zato ga najdemo predvsem v beljakovinah, ki so bogate z metioninom (Foster in Sumar, 1997). Če hrana ne vsebuje dovolj metionina, se večji del selenometionina namesto metionina nespecifično vgradi v telesne beljakovine (Whanger, 2002). Selenometionin se zato tudi dlje zadržuje v organizmu, kot ostale selenove zvrsti in predstavlja nekakšno rezervo selena v organizmu (Navarro-Alarcon in Lopez-Martinez, 2000).

Reilly (1996) navaja, da se več kot 80 % absorbiranega selena vključi v beljakovine, ki jih razdelimo na tri skupine (slika 2):

- specifične selenocistein – vsebujoče beljakovine (selenobeljakovine: A),
- specifične selen vezujoče beljakovine (B) in
- beljakovine, ki vsebujejo nespecifično vezan selen (C).



Slika 2. Vrste beljakovin, ki vsebujejo selen (Suzuki, 2005)

Različen je tudi metabolizem selenata in selenita. Selenat (SeO_4^{2-}) se direktno transportira do jeter, selenit (SeO_3^{2-}) pa se v krvi najprej reducira do selenida in se nato vezan na albumin transportira do jeter. Tu se porabita za sintezo selenobeljakovin ali se izločita iz organizma v metilirani obliki (Suzuki, 2005).

Selenove zvrsti se torej prenašajo po telesu s krvjo, večinoma vezane na beljakovine-albumine in β -lipoproteine, ter se nato odlagajo v telesnih organih. Pri zadostni preskrbljenosti organizma s selenom, največ selena vsebujejo ledvice, manj pa jetra, vranica in trebušna slinavka (Reilly, 1996). Selen se kopiči tudi v ščitnici, saj je sestavni del encima jodotironin dejodinaze (Behne in sod., 1990).

Biorazpoložljivost selena, ki je definirana kot delež hranila, ki se lahko uporabi za vzdrževanje normalnega ravnovesja v telesu, je torej odvisna od vrste faktorjev: količine selena, topnosti, absorpcije, vrste živila, kemijske oblike selena, fiziološkega stanja organizma, ... Splošno lahko povzamemo, da je biorazpoložljivost selena večja v primeru organskih selenovih zvrsti (Reilly, 1996; Navarro – Alarcon in Lopez – Martinez, 2000).

Če v telo vnesemo preveč selena, se presežene količine izločijo iz telesa. Gre predvsem za produkte metilacije selena: trimetil selenonijev ion, ki se iz telesa izloči po primarni poti izločanja preko ledvic (z urinom), dimetilne oblike selena, ki se izločijo z izdihanim zrakom (vonj po česnu) ter monometilne oblike, ki se iz telesa sprostijo s presnovo selenometionina. En del selena se izloči tudi z blatom (Foster in Sumar, 1997).

Ledvice igrajo pomembno vlogo tudi pri regulaciji količine selena v organizmu, saj pri nizkih prehranskih vnosih zmanjšajo njegovo izločanje z urinom, pri visokih vnosih pa povečajo (Reilly, 1996).

2.2.2 Vloga selenobeljakovin v telesu

Vse do sedaj identificirane selenobeljakovine so encimi. V skupino selenobeljakovin z znano funkcijo v organizmu sodijo beljakovine iz družin (Behne in Kyriakopoulos, 2001):

- glutation peroksidaz, ki katalizirajo pretvorbo (redukcijo) vodikovega peroksida in drugih organskih peroksidov v prisotnosti glutaciona in s tem preprečijo oksidativne poškodbe celic.
- jodotironin dejodinaz, ki katalizirajo aktivacijo in inaktivacijo ščitničnih hormonov. Ščitnica pri človeku vsebuje največ selena/g tkiva. Dolgotrajno pomanjkanje selena lahko vodi do raka ščitnice. Zmanjšan vnos selena hkrati z zmanjšanim vnosom joda pa lahko povzroči razvoj miksedema.
- tiodredoksin reduktaz, ki katalizirajo NADPH-odvisno redukcijo oksidirane tioredoksina. Reduciran tioredoksin je ključen dejavnik pri regulaciji redoks procesov v celici (sinteza DNA,...). V študiji so dokazali, da ima sprememba gena za tioredoksin za posledico zgodnjo umrljivost zarodka.
- selenofosfat sintetaz, ki katalizirajo reakcijo selenida z AMP. Pri tem nastane selenofosfat, ki je donor selena pri biosintezi selenocisteina.

Vloge ostalih selenobeljakovin (selenoprotein P, selenoprotein W, 15-kDa selenoprotein, 18-kDa protein, itd.) pa do sedaj še niso dokončno znane (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2001).

Znano je le, da ima selenoprotein P (Sel-P) pomembno vlogo pri detoksifikaciji težkih kovin, in sicer že v krvi. Z živim srebrom (Hg) in drugimi kovinami (Cd, Ag) lahko namreč tvori komplekse, ki delujejo detoksifikacijsko (Selenium, 2002). Poleg tega rezultati nekaterih študij kažejo tudi na to, da sodeluje pri ekstracelularni antioksidativni zaščiti in pri transportu selena, saj je več kot 60 % selena v plazmi vezanega v Sel-P (Behne in Kyriakopoulos, 2001).

Selenometionin in glutation naj bi sodelovala pri zaščiti celic pred oksidanti, kot so peroksinitriti. Selenometionin ima tudi radioprotektivne lastnosti in ščiti kožo pred poškodbami z UV-žarki, kar so ugotovili pri miših (Schrauzer, 1998).

2.2.3 Vnos in pomanjkanje selena

Selen sodi med elemente v sledovih, ki je esencialen za živali, človeka in mikroorganizme (Foster in Sumar, 1997). Danes je znano, da ima selen dvojno, včasih prav nasprotujočo si vlogo. Ker je selen bistven za nekatere življenjske procese, je bil na podlagi raziskav določen priporočen dnevni vnos (RDA – Recommended Daily Allowance) za selen, ki znaša minimalno 55 µg/dan (DRI – Dietary reference intakes, 2000), z ustreznimi večjimi vrednostmi za nosečnice in doječe matere ter manjšimi za dojenčke in otroke (preglednica 1). Po priporočilih Mednarodne zdravstvene organizacije (WHO), naj bi bil za odraslega človeka varen in zadosten vnos selena v organizem v območju 50 – 200 µg/dan (WHO, 1996), Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004) pa ocenjujejo, da je primeren dnevni vnos selena 30 – 70 µg, kar velja tudi za Slovenijo.

Preglednica 1. Ocenjene vrednosti za priporočene dnevne vnose selena

Starostna skupina	Ocenjene vrednosti za priporočene dnevne vnose selena ($\mu\text{g}/\text{dan}$)			
	Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004)	Selenium (2002)	Reilly (1996)	DRI (2000)
Dojenčki				
0 do manj kot 4 mesece	5 – 15			
0 – 6 mesecev		6	15	
4 do manj kot 12 mesecev	7 – 30			
7 – 12 mesecev		10	20	
Otroci				
1 – 3 leta	10 – 40	17	20	
4 – 6 let		22		
4 – 7 let	15 – 45			
4 – 8 let			30	
7 – 9 let	20 – 50	21		
9 – 13 let			40	
10 do manj kot 13 let	25 – 60			
Mladostniki				
Deklice 10 – 18 let		26		
Fanti 10 – 18 let		32		
13 do manj kot 15 let	25 – 60			
14 – 18 let			55	
Mladostniki in odrasli				
15 do manj kot 19 let	30 – 70			
19 do manj kot 25 let	30 – 70			
19 do 30 let				55
19 do manj kot 51 let	30 – 70			
Ženske 19 – 65 let		26		
Moški 19 – 65 let		34		
25 do manj kot 51 let	30 – 70			
31 do 50 let				55
51 do manj kot 65 let	30 – 70			
51 do 70 let				55
Ženske nad 65 let		25		
Moški nad 65 let		33		
Nosečnice				
	30 – 70			
2. trimester		28		
3. trimester		30		
Doječe matere				
	30 – 70			
0 – 6 mesecev po rojstvu otroka		35		
7 – 12 mesecev po rojstvu otroka		42		

V študiji, ki so jo izvedli na Kitajskem leta 1998, so ocenili, da je dosežena največja aktivnost glutation peroksidaze pri povprečnem dnevnem vnosu $41 \mu\text{g Se}/\text{dan}$ za moškega, težkega 60 kg. V ZDA pa je priporočen dnevni vnos $55 \mu\text{g Se}$ za odraslega (76 kg) moškega (Dietary reference intakes, 2000).

Za oceno preskrbljenosti s selenom se uporablja merjenje koncentracije selena v različnih tkivih in izločkih. Najpogosteje se uporablja za oceno preskrbljenosti organizma s selenom

njegova koncentracija v celotni krvi ali v posameznih frakcijah, plazma, eritrociti (Wyatt in sod. 1996).

Uporabljajo se tudi analize drugih tkiv, kot so lasje in nohti, vendar so ta tkiva pokazatelj zgolj dolgoročne preskrbljenosti s tem elementom (Reilly, 1996).

Pri človeku sta znani predvsem dve bolezni, povezani s pomanjkanjem selena, in sicer Keshanova bolezen (kardiomiopatija) in Kashin – Beckova bolezen (bolezen povečanih sklepov – osteoartropatija). Obe bolezni so najprej zasledili na Kitajskem, v predelih kjer zemlja in voda vsebujeta zelo malo selena (Foster in Sumar, 1997). Keshanova bolezen tako najpogosteje prizadene otroke med 2. in 10. letom starosti in ženske po porodu, ki uživajo le doma pridelano hrano. Znaki bolezni se kažejo v rahli omotičnosti, vrtoglavici, izgubi apetita, občutku slabosti; nadaljnje v akutni in srčni insuficienci, povečanju srca, kongestivni srčni odpovedi in srčnih aritmijah (Reilly, 1996).

Kashin – Beckova bolezen prizadene predvsem otroke, stare od 5 do 13 let in se pojavlja v severni Kitajski, severni Koreji in vzhodni Sibiriji. V večini teh območij pa je tudi malo selena v tleh. Začetni simptomi te bolezni vključujejo šibkost udov, okornost, otekanje in bolečine v prstnih členkih, ki postopno napredujejo do osteoartritisa komolcev, kolen in gležnjev, povečanje sklepov in atrofije nekaterih progastih mišic. To pa privede do zaostanka v rasti in pohabljenosti otrok.

Razvoj obeh bolezni pa naj bi bil odvisen tudi od drugih dejavnikov, predvsem drugih sestavin živil, vendar največji del prispeva pomanjkanje selena (Reilly, 1996; Trace elements in nutrition and health, 1996; Foster in Sumar, 1997).

Pomanjkanje selena povezujejo še s številnimi drugimi boleznimi: cistično fibrozo, distrofijo mišic, Downovim sindromom, multiplo sklerozo, golšavostjo, alkoholizmom, zobnim kariesom, hemofilijo, nočno slepoto, oslABLJENO odpornostjo na poškodbe zaradi radiacije in zastrupitve s težkimi kovinami, vendar mehanizmi delovanja še niso povsem jasni (Reilly, 1996; Schrauzer, 1998).

V zadnjih letih je zanimanje za selen močno naraslo zato, ker sodeluje pri različnih procesih:

- ima zaščitno vlogo pri ljudeh s hepatitisom (B ali C), kjer se lahko razvije jetrni rak. Ščiti jetra tudi pred toksini kot je na primer alkohol, ki povzroča povečano nastajanje prostih radikalov,
- dopolnila s selenom povečajo odgovor imunskega sistema, pomanjkanje selena pa lahko vodi do oslABLITVE imunskega sistema,
- ima protivnetno delovanje, ker zmanjšuje sintezo prostaglandinov in levkotrienov,
- pomemben je v prehrani pacientov okuženih z virusom HIV. In vitro je močan inhibitor replikacije tega virusa,
- sodeluje pri biosintezi testosterona, pri produkciji in normalnem razvoju spermijev, zato je esencialen za plodnost moških,

- vpliva na normalno delovanje centralnega živčnega sistema. Pri nizkih koncentracijah selena v telesu se hitreje pojavi depresija in druge negativne spremembe razpoloženja (anksioznost, zmedenost, sovražnost),
- vpliva na metabolizem ščitničnih hormonov,
- ima antioksidativno in protektivno vlogo pri razvoju različnih kardiovaskularnih bolezni, ker glutation peroksidaza ščiti celice pred oksidativnimi poškodbami, zmanjšuje pa tudi agregacijo trombocitov,
- v večjih koncentracijah (200 µg/g) preprečuje, da bi kisikovi radikali poškodovali celično DNA, povzročili mutacije in oksidativno aktivacijo kemičnih karcinogenov. Pri tem sodelujejo glutation peroksidaze, tioredoksin reduktaze in ostale selenobeljakovine in spojine, ki vsebujejo selen (metiliran selen,...),
- pri bolnikih s sladkorno bolezenijo zmanjšuje koncentracijo glukoze v krvi s stimulacijo glikolize, sintezo maščobnih kislin in v nekaterih primerih s stimulacijo sinteze glikogena. Pri tem naj bi imel pomembno vlogo predvsem pri ekspresiji ključnih encimov v omenjenih metabolnih poteh (Navarro – Alarcon in Lopez – Martinez, 2000).

Selen se uporablja tudi v obliki selenovega disulfida (SeS₂), ki se nahaja v medicinskih šamponih, kot sredstvo proti prhljaju (Reilly, 1996).

2.2.4 Toksičnost selena

Pri ugotavljanju toksičnih doz selena, različni avtorji navajajo različne podatke o maksimalnem dnevnem vnosu selena, ki še ne povzroča selenoze: 550 µg/dan (Combs in Combs, 1986), 450 µg/dan (Reilly, 1996) in 400 µg/dan (Dietary reference intakes, 2000).

Zastrupitve s selenom se pojavljajo v vseh stopnjah, od blagih kroničnih, do letalnih zastrupitev, ki v najhujših primerih vodijo v smrt. Značilni znaki kronične humane selenoze so predvsem zadah po česnu zaradi izločanja hlapnih selenovih spojin (dimetil selenid), morfološke spremembe nohtov in izguba las (Foster in Sumar, 1997). Lahko se pojavijo tudi slabost in bruhanje, poškodbe kože, gnili zobje in bolezenske spremembe živčnega sistema (periferna anestezija, zbadanje in bolečine v ekstermitetah, ohromelost). Glavni simptomi letalne zastrupitve so nekrotična degeneracija jeter, fibroza ledvic in miokardialna kongestija (Reilly, 1996 in Tinggi, 2003).

Zastrupitve so v veliki meri odvisne od količine in kemijske oblike selena, rase, starosti, fiziološkega stanja organizma, predvsem pa od uživanja toksične hrane iz predelov z močno povečanimi koncentracijami selena (npr. v nekaterih predelih Kitajske in Združenih držav Amerike) (Foster in Sumar, 1997; Goenaga – Infante in Sargent, 2005).

2.2.5 Toksičnost selena za ribe

Toksični učinki prevelikih koncentracij selena se lahko pojavijo ne le pri ljudeh, temveč tudi pri ribah in ostalih živalih, ki se hranijo z ribami. Za povečano vsebnost selena v naravnem okolju prispeva več dejavnikov: izgorevanje goriv trdne oblike, namakanje ozemelj bogatih s selenom namenjenih kmetovanju, odlaganje odpadkov nastalih pri predelavi premoga, spuščanje s selenom obremenjenih voda v reke, jezera, ... Vse te dejavnosti prispevajo k mobilizaciji in bioakumulaciji nevarnih koncentracij selena v naravnem okolju (Lemly, 1999).

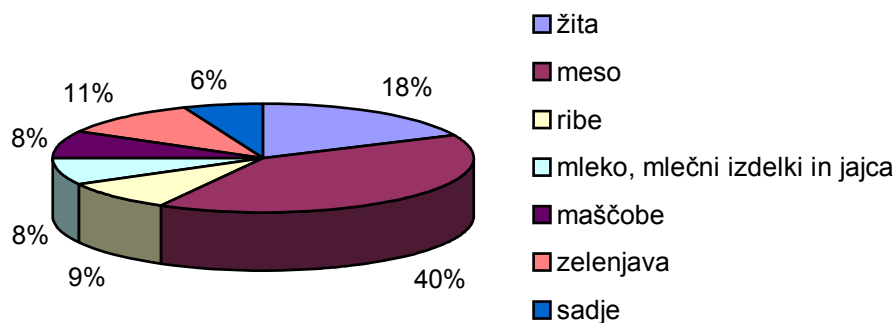
Selen je po svojih kemijskih in fizikalnih značilnostih, kot so valenca in tvorba analogov (hidrogenega sulfida, tiosulfata, sulfita in sulfata), zelo podoben žveplu. Zaradi tega celice organizmov ne razlikujejo popolnoma med tema dvema elementoma (če je selen v prebitku) med procesom proteinske sinteze. V tem primeru se lahko selen pomotoma zamenja z žveplom in posledica tega je tvorba triselenske verige (Se – Se – Se) ali selenotrisulfidne verige (S – Se – S). Tvorba takih verig prepreči nastanek "normalne" in za pravilno delovanje proteinov potrebne disulfidne verige (S – S), kar vodi v tvorbo izkrivljenih, nefunkcionalnih encimskih in proteinskih molekul, ki škodujejo celičnim biokemijskim procesom (Sunde, 1984). Te selensko inducirane napake pri sintezi proteinov imajo vrsto posledic. Najbolj očitna posledica toksičnega učinka selena je reproduktivna teratogeneza. Selen, ki ga preko hrane zaužijejo odrasli ribji osebk, se nalaga na jajčecih, kjer se vključi v metabolizem zaplojene ribje ličinke. V razvijajoči se ribi tako pride do letalnih in subletalnih deformacij trdih in mehkih tkiv (Lemly, 1993). Substitucija žvepla s selenom lahko tudi poškoduje formacijo proteinov v odraščajoči ribi, tako da se lahko veliko notranjih organov in tkiv razvije s patološkimi spremembami, ki so posledica kronične selenoze (Lemly, 1997). Največji teratogeni učinki prizadenejo jetra, ledvice, srce, oči (le-te so večje, izbuljene), razvijejo se poškodovane osti ter deformira se glavna telesna kost. Zaradi tega se zmanjša sposobnost plavanja, kar poveča dovzetnost za napad plenilcev in s tem prezgodnjo smrt (Palace in sod., 2003).

Poleg povezave med velikostjo rib in koncentracijo selena kot že omenjeno, obstajajo povezave oziroma razlike tudi med koncentracijami selena pri toplovodnih in hladnovodnih ribah (Hamilton, 2003). Hamiltonova raziskava je pokazala, da imajo hladnovodne in toplovodne ribe zelo podoben prag občutljivosti na vnos selena s hrano. Mejna koncentracija s hrano zaužitega selena, pri kateri še ne pride do toksičnih učinkov pri ribah, je 3 µg/g. Vse koncentracije, ki presegajo 3 µg/g, v daljšem obdobju povzročajo poškodbe pri ribah, ki velikokrat vodijo v smrt (Hilton, 1980; Hamilton, 2003). Ne glede na vrsto rib, velikost rib in njihovo prebivališče (v hladnih ali toplih vodah) pa velja, da koncentracije selena od 4.6 do 6,5 µg/g zagotovo povzročijo usodne poškodbe (Hamilton, 2003).

Zastrupitev s selenom pri ribah je lahko tudi "nevidna", saj primarno prizadene ribje jajčece, ki dobiva selen preko hranjenja odrasle ribe. Tako lahko odrasli osebk preživijo in izgledajo zdravi, kljub masivnim reproduktivnim napakam. Posledično se lahko ribja populacija zmanjša ali celo izumre v obdobju nekaj let zaradi nevidnih razlogov, kar je posledica zahrbtno oblike toksičnosti selena (Lemly, 2001).

2.3 VSEBNOST SELENA V HRANI

Selenove spojine pridejo v organizem večinoma s hrano – delež vnosa selena s posameznimi živali prikazuje slika 2 (Foster in Sumar, 1997).



Slika 3. Vnos selena s posameznimi živali (Foster in Sumar, 1997)

Vnos selena s hrano je zelo različen in variira tako med državami, pokrajinami, kot tudi časovno, v odvisnosti od agronomskih dejavnosti in prehranskih navad (Goenaga- Infante in Sargent, 2005).

Največ selena najdemo v drobovini in morski hrani (0,4 – 1,5 mg/kg), manj pa v mesu in mlečnih izdelkih (0,1 – 0,4 mg/kg) (Trace elements ..., 1996). Živila rastlinskega izvora vsebujejo malo selena (< 0,1 mg Se/kg) (Trace elements, 1996). To sta ugotavljali tudi Smrko in Stibilj (2004) v svoji raziskavi, kjer sta določali selen v rastlinski hrani – v solati, korenju, zelju, čebuli, peteršilju in krompirju. Od preiskovanih vzorcev je največ selena vsebovalo zelje ($20 \pm 27,0$ ng Se/g), najmanj pa krompir ($1,5 \pm 0,3$ ng Se/g). Razpoložljivost selena za rastline je odvisna od več faktorjev, kot so pH zemlje, temperatura, koncentracija soli v zemlji in vsebnost CaCO_3 v zemlji (Kabata Pendias, 2001). Z rastlinsko hrano pokrijemo le okrog 11 % dnevnih potreb po selenu, največji delež dnevnega vnosa selena pa pokrijemo z uživanjem mesa (okrog 40 %) in žiti (18 %) (Foster in Sumar, 1997) (slika 3).

Tudi gobe in stročnice, z visoko vsebnostjo beljakovin, vsebujejo veliko selena, saj lahko selen zamenja žveplo v aminokislinah (cistein in cistin) (Trace elements, 1996).

V živilih živalskega izvora nastopa selen predvsem v obliki selenocisteina, v živilih rastlinskega izvora pa v obliki selenometionina. Anorganske oblike selena so prisotne v nizkih koncentracijah (Reilly, 1996).

Koncentracija selena v živilih pa je tudi zelo odvisna od prisotnosti elementa v zemlji in vodnem okolju. Tako poznamo predele po svetu, ki so bogati s selenom in tiste, kjer zemlja, voda vsebujeta zelo malo selena in s tem posledično tudi živila (preglednica 2) (Foster in Sumar, 1997; Navarro – Alarcon in Lopez – Martinez, 2000).

Preglednica 2. Vsebnost selena v različnih osnovnih živilih v nekaterih državah

Država	Živilo	Vsebnost Se (mg/kg)	Vir
Velika Britanija	žita, žitni izdelki	0,11	Foster in Sumar (1997: 221)
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,12-0,6	
	mleko in mlečni izdelki	0,01-0,085	
	sadje in zelenjava	0,005-0,01	
ZDA	žita, žitni izdelki	0,3-0,56	
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,06-1,33	
	mleko in mlečni izdelki	0,006-0,3	
	sadje in zelenjava	0,004-0,07	
Kanada	žita, žitni izdelki	0,01	
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,06-1,22	
	mleko in mlečni izdelki	0,005-0,01	
	sadje in zelenjava	0,005-0,01	
Finska	žita, žitni izdelki	0,02	
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,05-0,48	
	mleko in mlečni izdelki	0,002-0,025	
	sadje in zelenjava	0,002	
Nova Zelandija	žita, žitni izdelki	0,035	
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,03-0,38	
	mleko in mlečni izdelki	0,004-0,025	
	sadje in zelenjava	0,003	
Kitajska	žita, žitni izdelki	0,01-3,88	
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,025-0,48	
	mleko in mlečni izdelki	0,002-0,02	
	sadje in zelenjava	0,001-0,01	
Hrvaška	meso, drobovina, ribe, jajca	0,76	Klapec in sod. (2003)
	mleko in mlečni izdelki	0,29	
	zelenjava	0,0063-0,015	
Slovenija	žita, žitni izdelki	0,012	Smrkolj in sod. (2004)
	meso, drobovina, ribe, jajca	0,033-1,55	
	mleko in mlečni izdelki	0,012-0,03	
	zelenjava	0,003-0,081	

2.3.1 Selen v morski hrani

Vsebnost selena v morski hrani je posledica vsebnosti selena v morju. O porazdelitvi selena v morju je bilo do sedaj narejenih malo raziskav; posredno pa lahko selen v morju določimo z določanjem vsebnosti selena v morskih organizmih, ki imajo veliko sposobnost bioakumulacije tako selena kot tudi težkih kovin (Cabañero in sod., 2004).

Raziskave selena v ribah iz različnih vodnih ekosistemov so pokazale, da je selen v vodnih organizmih najden v koncentracijah, ki naraščajo sorazmerno glede na pozicijo rib na trofičnem nivoju. Manjše ribe in plankton, postavljene na dnu prehranskega trofičnega nivoja vsebujejo najmanjše koncentracije selena, tiste višje ležeče, večje ribe, ki se hranijo z ribami iz nižjega trofičnega nivoja, pa vse večje koncentracije. Za mesojede vrste so Souza Lima in sod. (2004) ugotovili $487,5 \pm 275,3$ ng Se/g, pri nemesojedih vrstah pa le $379,1 \pm 198,9$ ng Se/g, kar potrjuje dejstvo, da manjše in nemesojede ribe vsebujejo nekoliko manj selena.

Leta 2005 je bila tudi v Sloveniji opravljena biološka raziskava o vsebnosti selena in živega srebra v ribah iz reke Idrijce. Podatki so zbrani v diplomskem delu Mihe Nagliča (2005). V reki Idrijci so na štirih mestih: izliv Belce, Idrijca Kolektor, Kozarska Grapa in Bača pri Modreju določali vsebnost selena in živega srebra v mišicah, jetrih in škrgah šestih vrst rib: šarenke, mreniča, lipana, križanca, soške in rečne postrvi. Vsebnost selena je bila pri vseh vrstah svežih rib največja v jetrih (4000 – 7000 ng Se/g), najmanjša pa v mišicah (500 – 600 ng Se/g).

Pri vsebnostih selena v ribah prihaja včasih do problemov in neskladnih rezultatov. Nekateri rezultati so namreč dobljeni z analizo celih rib, brez odstranjene drobovine, kosti in lusk, medtem ko so drugi rezultati dobljeni le z analizo čiste ribje mišičnine. Ihnat (1989) priporoča, da glede na to, da se selen v vodnih organizmih koncentrira v določenih organih, bi bilo najbolj primerno analizirati celoten organizem.

O velikih razlikah o vsebnosti selena v ribah iz Nove Zelandije je poročal Vlieg (Vlieg, 1990). Rezultati za selen v 55 morskih ribah, 13 morskih školjkah in v 6 sladkovodnih ribah so se gibal od 11 do 97 μg Se/100 g. Razloge za široko območje je iskal v geografsko in sezonsko spremenljivih pogojih. O podobni situaciji poročajo tudi francoski znanstveniki, ki so opazili veliko večjo vsebnost selena v mehkužcih v obdobju od februarja do junija, kot v ostalih mesecih (Reilly, 1996). Kadrabova in sod. (1997) pojasnjujejo, da je vsebnost selena v ribah odvisna od biodiverzitete rib, variacij metabolizma, prehranskih navad, sposobnosti migracij in ostalih spremenljivih dejavnikov vodnega okolja.

Splošno pa lahko zapišemo, da so ribe, poleg mesa zanesljiv in stalen vir selena v človekovi prehrani, saj z uživanjem rib zagotovimo 40 – 50 % dnevnih potreb po selenu (Cabañero in sod., 2004). Pri tem pa je zelo pomembna oblika selena, saj se iz prebavnega trakta, natančneje iz črevesja absorbira in izkoristi le topen selen. Topnost selena torej določa v kolikšni meri je selen biorazpoložljiv v ribah, kar predstavlja tudi naslednja enačba:

$$\text{BIORAZPOLOŽLJIVOST} = \frac{[\text{Se ali Hg v biološko dosegljivi frakciji}]}{[\text{Se ali Hg v ribi}]} \times 100 \quad \dots(1)$$

Biorazpoložljivost selena iz rib je tako definirana kot razmerje med selenom (ali Hg), razpoložljivim za absorpcijo v intestinalnem traktu in selenom (ali Hg) v ribi (Cabañero in sod., 2004). V preglednici 3 je predstavljena vsebnost topnega selena v nekaterih ribah, določena na podlagi simulacije želodčne in gastrointestinalne predelave v *in vitro* pogojih. Vidimo, da večji del topnega selena nastane z encimsko razgradnjo proteinov že v želodcu, nekaj ga nastane tudi s predelavo v gastrointestinalni tekočini. Sardine vsebujejo največ topnega, biološko aktivnega selena, zato je uživanje le-teh iz prehranskega vidika najbolj primerno, koristno. Vzroki za različno biorazpoložljivost selena so lahko sestava rib, vsebnost beljakovin in maščob, ki lahko vplivajo na topnost selena in prisotnost encimov, ki so sposobni sprostiti selen iz zaužite hrane (to so proteinaze, peptidaze) (Cabañero in sod., 2004).

Preglednica 3. Vsebnost topnega selena v želodčni in gastrointestinalni tekočini ($\mu\text{g/kg}$ ribe) (Cabañero in sod., 2004)

Vzorec	Celokupna vsebnost selena v suhi snovi ($\mu\text{g/kg}$)	Vsebnost topnega selena v želodčnem soku ($\mu\text{g/kg}$)	Vsebnost topnega selena v gastrointestinalni tekočini ($\mu\text{g/kg}$)
tuna	1570 \pm 60	761 \pm 23	763 \pm 15
kuhana tuna	870 \pm 20	406 \pm 8	477 \pm 5
mečarica	1130 \pm 40	525 \pm 5	840 \pm 25
sardina	1580 \pm 20	1107 \pm 33	1331 \pm 27

Biorazpoložljivost selena so proučevali tudi Yoshida in sod. (2002) in sicer v mišičnini tune. Ker mišičnina tune vsebuje visoko vsebnost selena, so želeli preveriti koliko selena se iz nje dejansko izkoristi. Mišičnino so obdelali z organskimi topili, da so odstranili maščobo in vonjave. Biorazpoložljivost selena pa so ocenili s pomočjo merjenja aktivnosti glutation peroksidaze (v nadaljevanju GSHPx) v jetrih miši, ki so jih izmenično 3 tedne hranili s selenom bogato in 3 tedne s selenom revno dieto. Vsebnost selena in aktivnost GSHPx sta v jetrih zelo narastla pri dieti s povečano vsebnostjo selena, pri majhnih vnosih selena pa je imel selen iz mišičnine tune majhen vpliv na aktivnost GSHPx. Ugotovili so tudi, da je biorazpoložljivost selena, ki temelji na vsebnosti selena v jetrih 87 %, biorazpoložljivost selena, ki temelji na aktivnosti GSHPx pa 168 %. Ugotovili so, da na biorazpoložljivost hranil vpliva kemijska oblika hranila in sočasno prisotnih substanc. Proteinsko vezan selen (oblika, ki prevladuje v mišičnini tune), naj bi tako bil visoko biorazpoložljiv, kar je tudi dokaz visoke prebavljivosti v *in vitro* pogojih. Izmed ostalih substanc, prisotnih v mišičnini tune, je metilno živo srebro tisto, ki zmanjšuje biorazpoložljivost selena s tvorbo nepolarnih kompleksov s selenom.

2.3.1.1 Vsebnost živega srebra v morski hrani

Ribe z visoko prehransko vrednostjo, vsebnostjo pomembnih mineralov (P, I, K), nenasičenih maščobnih kislin (oleinska, linolna in omega 3 maščobne kisline), fosfolipidov, vitaminov (A, D) in proteinov z visoko biološko vrednostjo, predstavljajo idealno komponento zdrave in uravnotežene prehrane. Poleg omenjenih hranil, pa lahko ribe akumulirajo v svojih tkivih znatne količine težkih kovin (npr. Hg) in tako predstavljajo glavni vir teh elementov za človeka. Ribe so živilo, kateremu moramo posvečati veliko pozornosti pri ugotavljanju težkih kovin, z namenom preprečitve morebitnih toksičnih tveganj ob njihovem zaužitju, saj živo srebro že od nekdaj predstavlja enega glavnih onesnaževalcev okolja (Cabañero in sod., 2004; Souza Lima in sod., 2004).

Po drugi strani pa, kot že omenjeno, ribe akumulirajo tudi selen, ki je znan po svojih pozitivnih učinkih na zdravje, med katere prištevamo tudi antagonistično vlogo proti živemu srebru. Odkrivanje povezave med toksičnimi elementi, kot je Hg in esencialnimi elementi, kot je Se v ribah, je zato zelo pomembno, saj nam ta informacija lahko prinese veliko odgovorov na vprašanja, kako se živo srebro akumulira v ljudeh glede na prebivališče, prehranske navade, način življenja in kako selen deluje proti živosrebrovim toksičnim učinkom (Souza Lima in sod., 2004).

Raziskava iz province Guizhou na Kitajskem, ki velja za z živim srebrom onesnaženo območje, je pokazala, da obstajajo interakcije med Hg in Se v organizmih, vključno z ribami, ki so izpostavljene visokim koncentracijam Hg. Poleg Hg in Se so določali tudi vsebnost ostalih elementov v ribah (preglednica 4). Vsebnost selena, živega srebra in ostalih elementov se je razlikovala po razporeditvi v mišicah in jetrih. Splošno lahko zapišemo, da se težke kovine in ostali elementi bistveno bolj akumulirajo v jetrih, kot v mišicah, z izjemo Ca in K (preglednica 4) (Zhang in sod., 2004).

Preglednica 4. Primerjava vsebnosti nekaterih elementov v ribjih tkivih iz province Guizhou z ribjimi tkivi iz province Beijing (Zhang in sod., 2004)

Element	Provinca Guizhou		Provinca Beijing	
	Vsebnost elementov v ribjih jetrih ($\mu\text{g/g}$)	Vsebnost elementov v ribjih mišicah ($\mu\text{g/g}$)	Vsebnost elementov v ribjih jetrih ($\mu\text{g/g}$)	Vsebnost elementov v ribjih mišicah ($\mu\text{g/g}$)
Hg	$0,181 \pm 1,101$	$0,312 \pm 0,293$	$0,031 \pm 0,016$	$0,050 \pm 0,012$
Se	$4,41 \pm 3,06$	$0,58 \pm 0,47$	$5,02 \pm 3,29$	$0,99 \pm 0,23$
Au	$0,0044 \pm 0,0041$	$0,0015 \pm 0,0006$	$0,0030 \pm 0,0017$	$0,0015 \pm 0,0016$
Ca	370 ± 230	1700 ± 1140	410 ± 140	1470 ± 1000
Cd	$1,12 \pm 0,54$	$< 0,2$	$4,96 \pm 3,92$	$< 0,3$
Fe	678 ± 401	23 ± 11	509 ± 471	17 ± 8
K	12270 ± 2880	18140 ± 1260	10850 ± 1370	18720 ± 1490
Na	3580 ± 1020	1320 ± 270	2470 ± 620	1110 ± 170
Zn	229 ± 129	19 ± 6	208 ± 114	16 ± 5

Avtor ne navaja vrste rib, starosti in števila vzorcev rib iz province Guizhou, onesnažene z živim srebrom in ne v neonesnaženi provinci Beijing. Raziskava je pokazala, da se vsebnosti Hg v izbranih vzorcih bistveno razlikujejo od kontrolnih vzorcev, vzeti iz področja brez onesnaževanja, kar ne bi mogli trditi za selen. Z naraščajočo koncentracijo Hg je namreč naraščala tudi koncentracija Se, oziroma njuno molarno razmerje (Hg : Se). Pri zelo visoki koncentraciji Hg pa je to razmerje doseglo konstantno vrednost in se ni več povečevalo. Rezultati so tako potrdili zadrževanje in akumulacijo Hg delcev v ribjem tkivu. Ugotovili so tudi, da edino v primeru, ko so ribe izpostavljene visoki koncentraciji Hg, lahko Se delno prepreči toksičnost Hg, torej so v takih vzorcih najdene tudi večje koncentracije Se v tkivu (Zhang in sod., 2004).

Čeprav je akumulacija Se in Hg v ljudeh in drugih organizmih znana, mehanizem interakcije med njima še ni popolnoma raziskan. Chen in sod. (2004) domnevajo, da se med selenom in živim srebrom oblikuje Hg-Se kompleks, ki se nato veže s plazemskim selenoproteinom P in tako dobi antioksidativno vlogo.

Cabañero in sod. (2004) so postavili hipotezo o načinu delovanja selena na metilno živo srebro, ki velja za najbolj toksično obliko živega srebra, in sicer:

- pomagal naj bi pri prenosu metilnega živega srebra iz občutljivih organov v manj občutljive (npr. mišice),
- tekmoval naj bi za enake receptorje kot živo srebro,
- z živim srebrom naj bi tvoril komplekse (npr. tiemanit),
- pospeševal naj bi pretvorbo metilnega živega srebra v manj toksično obliko in tako preprečil njegove oksidativne učinke.

Selen naj bi torej deloval detoksifikacijsko proti metilnem živem srebru, ki ima zelo dolgo razpolovno dobo, se kopiči v ribah ob filtriranju vode in neposredno z uživanjem rib deluje tudi na človeka, kjer ima teratogeno, imunotoksično in nevrotoksično funkcijo (Cabañero in sod., 2004).

Zelo pomembno je, da so porabniki obveščeni o visokem tveganju pri prevelikem vnosu živega srebra s hrano. Ne smejo pa biti napačno obveščeni, da ne smejo več uživati rib in ribjih izdelkov, saj so zelo pomembno hranilo, z visoko biološko vrednostjo. V preglednici 5 so prikazane koncentracije živega srebra in selena v nekaterih vzorcih rib.

Preglednica 5. Celokupna vsebnost selena in živega srebra ($\mu\text{g/g}$) v vzorcih rib (Cabañero in sod., 2004)

Vzorec	Voda (%)	Hg v svežem vzorcu ($\mu\text{g/g}$)	Hg v suhi snovi ($\mu\text{g/g}$)	Se v svežem vzorcu ($\mu\text{g/g}$)	Se v suhi snovi ($\mu\text{g/g}$)	Molarno razmerje Se:Hg
skuša	80	$0,033 \pm 0,001$	$0,172 \pm 0,007$	$0,26 \pm 0,01$	$1,28 \pm 0,02$	18
hobotnica	79	$0,024 \pm 0,001$	$0,111 \pm 0,005$	$0,13 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,02$	13
mečarica	78	$0,47 \pm 0,02$	$2,05 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,02$	$2,09 \pm 0,04$	3
sardine	76	$0,048 \pm 0,002$	$0,21 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02$	$1,81 \pm 0,02$	22
tuna	60	$0,31 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,01$	$2,32 \pm 0,03$	8

Vidimo, da se vsebnosti selena niso bistveno razlikovale med seboj, kot pri vsebnostih živega srebra. Vsebnosti selena so se gibale v območju od $0,13 \mu\text{g/g}$ v hobotnici do $0,92 \mu\text{g/g}$ v tuni. Mečarica in sardina sta vsebovali podobno vsebnost selena. Najboljše razmerje med molarno koncentracijo selena in živega srebra imajo sardine, zato naj bi bilo priporočljivo uživati čimveč rib te sorte (Cabañero in sod., 2004).

2.3.2 Vnos selena s hrano

V preglednici 6 so prikazane dnevno zaužite količine selena pri odraslih ljudeh, v nekaterih državah. Combs in Combs (1986) in Foster in Sumar (1997) ne navajajo, kako so ocenjevali dnevni vnos selena, medtem, ko je podatek za Slovenijo dobljen na podlagi raziskave narejene v domovih za starejše. Pokorn in sod. so v letih 1988 – 1989 (Pokorn in sod., 1991) in 1992 (Pokorn in sod., 1998) v domovih za starejše določali vsebnost nekaterih esencialnih elementov v celodnevni obroki hrane. Leta 1988 – 1989 je bilo v raziskavo vključenih 7 domov za starejše občane v Ljubljani, leta 1992 pa 51 domov po Sloveniji. Leta 1988 – 1989 so določili povprečen vnos $40 \mu\text{g}$ selena pri povprečni kalorični vrednosti celodnevnega obroka $8,12 \text{ MJ}$, leta 1992 pa $30 \mu\text{g}$ selena pri povprečni kalorični vrednosti 7 MJ (kot je razvidno iz preglednice 6). Obe raziskavi sta pokazali, da je selena v hrani starejših občanov premalo.

V letu 2005 pa so Smrkoj in sod. (2005) ocenjevali dnevni vnos selena v vojaških obrokih hrane. Analizirali so 20 celodnevni obrokov iz 4 različnih slovenskih vojašnic. Določili so povprečen dnevni vnos $87 \mu\text{g}$ selena pri povprečni kalorični vrednosti obroka $15,8 \text{ MJ}$. Raziskava je pokazala, da vojaki z zaužitjem celodnevnega obroka pokrijejo priporočene dnevne potrebe po selenu (torej $50 \mu\text{g/dan}$). Le 10 % vojaških obrokov je vsebovalo manj kot $50 \mu\text{g}$ selena. Vidimo, da je povprečen dnevni vnos $87 \mu\text{g}$ selena večji od povprečnih vnosov 40 in $30 \mu\text{g}$ selena, dobljenih z raziskavami Pokorna in sodelavcev v letih 1988-1989 in 1992. Smrkoj in sod. (2005) pojasnjujejo, da lahko priporočen dnevni vnos selena dosežemo samo z zaužitjem količinsko in kalorično dovolj velikega obroka. Vojaki, ki potrebujejo visokokaloričen obrok, z uživanjem celodnevni obrokov zadostijo dnevnim

potrebam po selenu, starejši občani, ki potrebujejo manj kalorično hrano, pa bi morali izbirati živila z visoko vsebnostjo selena, da bi zadostili dnevnim potrebam po selenu.

Preglednica 6. Dnevno zaužite količine selena na odraslo osebo v nekaterih državah

Država	Zaužita količina Se (µg/osebo/dan)	Vir
ZDA (normalna / mešana hrana)	60-168	Combs in Combs (1986)
Kanada	168	
Japonska (tipična hrana)	100	
Japonska (z ribami bogata hrana)	500	
Kitajska (območje s selenozo)	4490	
Kitajska (območje s Keshanovo boleznijo)	11	
Švedska (normalna / mešana hrana)	10-95	
Finska	30-60; 125	Combs in Combs (1986), Foster in Sumar (1997)
Švica	70	Foster in Sumar (1997)
Španija	32,2	Diaz-Alarcon in sod. (1996)
Velika Britanija	44,7	Foster in Sumar (1997)
Poljska	30-40; 19-32	Wasowicz (2002), Ratkovska in sod. (2003)
Italija	25; 141	Combs in Combs (1986)
Hrvaška	27,3; 33,9	Klapec in sod. (1998), Matek in sod. (2000)
Slovenija	40; 30	Pokorn in sod. (1991), Pokorn in sod. (1998)
	87	Smrkolj in sod. (2005)

Iz preglednice 6 je razvidno, da primanjkuje selena v prehrani na Finskem, v severovzhodni in južni Kitajski, preveč selena pa zaužijejo predvsem v določenih predelih Kitajske. Zmerno pomanjkanje selena je opazno za nekatere evropske države. Na splošno je dnevni vnos selena v večjem delu Evrope znatno nižji kot v Združenih državah Amerike (Selenium, 2002).

2.3.2.1 Vnos selena z ribami in ribjimi izdelki

O vnosu selena z ribami in ribjimi izdelki je v literaturi zelo malo podatkov. Selenium (2001) navajajo podatke o vnosu selena z ribami za Kitajsko (področje s Keshanovo boleznijo in področje brez bolezni), Indijo, Finsko ter za Anglijo v primerjavi z vnosom selena z drugo vrsto hrane (preglednica 7). Avtorji ne navajajo kalorične vrednosti in ne mase obroka.

Preglednica 7. Vnos selena z ribami ($\mu\text{g}/\text{dan}$) v nekaterih državah (Selenium, 2002)

	Vnos selena ($\mu\text{g}/\text{dan}$)				
	Kitajska		Indija	Finska	Anglija
	Področje s Keshanovo boleznijo	Področje brez bolezni			
celoten obrok	7,7	16,4	52,5	30	31
žita, žitni izdelki	5,4	11,6	21,1	2,8	7
meso, jajca	3,7	9,2	10
ribe	> 0,6	> 2,2	18,4	9,5	4
mlečni izdelki	4,8	6,5	3
sadje, zelenjava	1,7	2,6	0,9	0,5	6
drugo	3,6	3,2	3

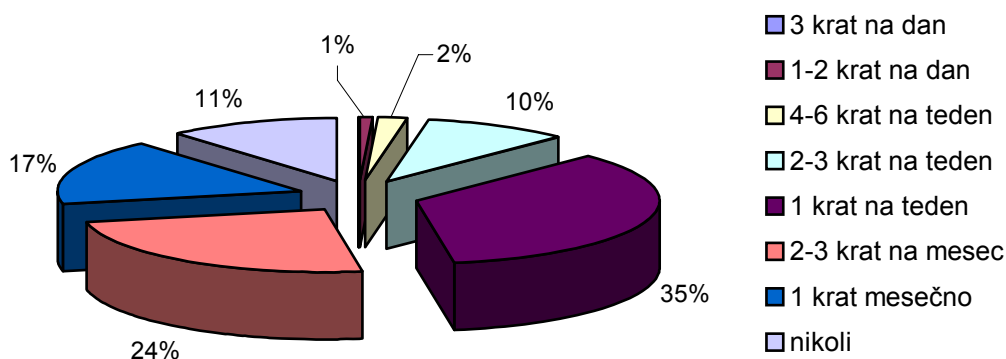
.. – ni naveden podatek

Iz podatkov vidimo, da veliko selena vnesemo z uživanjem mesa, jajc, žit in rib. Ne glede na to, koliko selena na dan zaužijemo, pa je prava količina selena, ki se dejansko izkoristi v našem telesu odvisna od oblike selena, ki se nahaja v živilih in njegove biorazpoložljivosti. Combs in Combs (1986), poročata, da vrsta dodatkov živilom ali sama sestava živila, vpliva na biorazpoložljivost selena in s tem na stopnjo biološke aktivnosti selena v telesu, z vplivom na presnovo selena (na absorpcijo ali na faze izločanja selena). Pomanjkanje vitaminov B₆, E, C in A, zmanjša biološko aktivnost selena v telesu, medtem ko zadostna količina vitaminov poveča zaščitno vlogo selena proti prostim radikalom. Biološko aktivnost selena pa zmanjšuje prisotnost žvepla in težkih kovin.

In, čeprav ribji izdelki veljajo za živila z visoko vsebnostjo selena, Combs in Combs (1986) trdita, da sodijo med živila s slabo izkoristljivostjo selena. Cabañero in sod. (2004) pa v svoji raziskavi o biorazpoložljivosti selena in živega srebra navajajo, da je selen dobro izkoristljiv, in sicer 50 % pri tuni in 83 % pri sardinah.

V Sloveniji še ni bila analizirana vsebnost selena v ribah s prehranskega vidika. Vnos selena lahko ocenimo z določanjem vsebnosti selena v posameznih vrstah rib glede na jedilno porcijo (100 g), oziroma v neto masi mesa različnih vrst ribjih izdelkov.

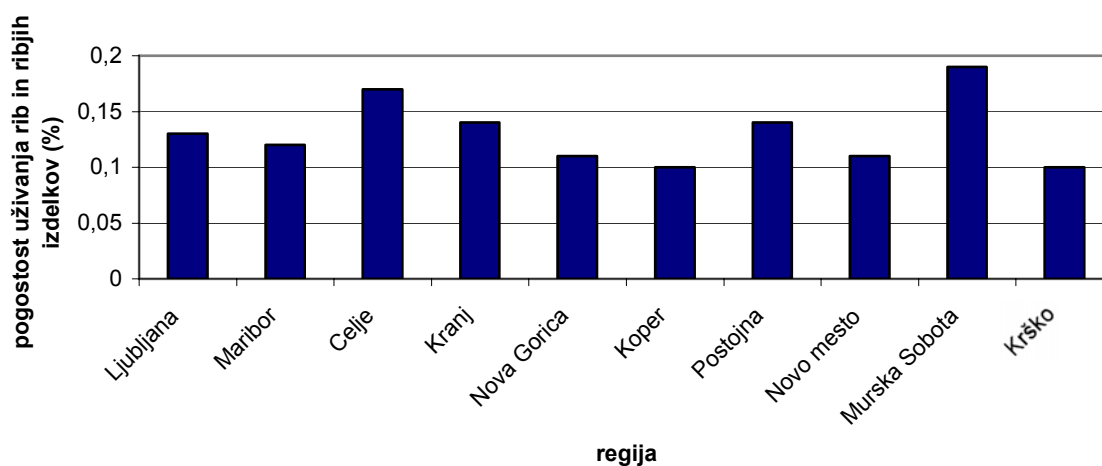
O pogostosti uživanja rib in ribjih izdelkov v Sloveniji poroča Koch (1997) v svoji doktorski disertaciji. Raziskava je bila narejena na podlagi anketiranja gospodinjstev po Sloveniji in navaja, da pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov niha glede na izobrazbo ljudi, družbeni sloj in glede na regijo. Slovenci najpogosteje (35 %) uživamo ribe 1 krat na teden, kar 11 % pa nikoli (slika 4).



Slika 4. Pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov pri Slovencih (%) (Koch, 1997)

Pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov je odvisna od izobrazbe Slovencev, pri čemer najpogosteje (0,14 %) ribe uživajo Slovenci s poklicno, srednjo in visoko oziroma višjo izobrazbo. Slovenci z osnovno izobrazbo imajo manj pester jedilnik, saj bolj redko (0,12 %) uživajo ribe. Tudi družbeni sloj vpliva na pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov. Višji sloj najpogosteje (0,17 %) uživa ribe in ribje izdelke, sledi mu srednji sloj (0,14 %), najredkeje (0,12 %) pa ribe in ribje izdelke uživa nižji sloj Slovencev.

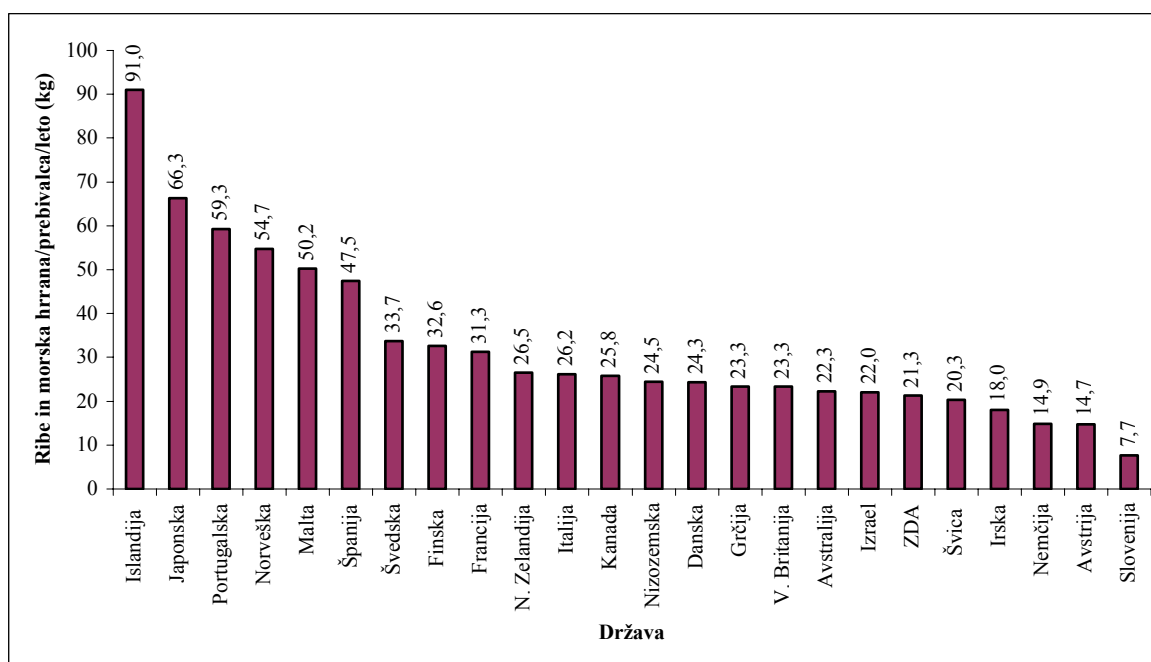
Pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov niha tudi med različnimi slovenskimi regijami (slika 5). Ribe in ribje izdelke najpogosteje uživajo v Murski Soboti, Celju, Kranju in Postojni, kar kaže na dobro ponudbo rib in ribjih izdelkov po celotni Sloveniji (Koch, 1997).



Slika 5. Pogostost uživanja rib in ribjih izdelkov glede na regijo (%) (Koch, 1997)

V statističnem letopisu Slovenije za leto 2003 ni podatkov o porabi rib oziroma ribjih izdelkov na prebivalca. So pa podatki o ulovu, porabi ter o oskrbi z ribami, o čemer poroča Marin (2005) v svojem magistrskem delu. V Sloveniji in Evropski uniji je že dalj časa opaziti rahlo upadanje ulova rib, kar je posledica onesnaženosti voda, slabšega razmnoževanja rib in omejenega ulova zaradi prelova, ki lahko poruši naravno ravnovesje med naravnim prirastom in ulovom. V letu 2001 smo v Sloveniji priredili 17,4100 ton mesa in ulovili le 3,089 ton rib, kar pomeni, da ribe v prireji mesa predstavljajo le 1,74 % od vsega mesa. Posledično je manjša tudi poraba rib, ki je v začetku 80. let prejšnjega stoletja znašala v povprečju 2,3 kg rib na Slovenca v enem letu. To je v primerjavi z drugimi evropskimi državami, na primer Portugalsko s povprečno porabo rib 90,6 kg, Italijo s 17,9 kg, Nemčijo z 11,9 kg in Hrvaško s 5,7 kg, malo.

Poraba rib pa je odvisna tudi od ponudbe rib ter od oskrbe z ribami in morskno hrano. Na sliki 6 je prikazana oskrba z ribami na prebivalca v različnih državah (Marin, 2005). Oskrba z ribami v Sloveniji je za leto 2002 najmanjša od prikazanih držav. Tradicionalno imajo države, kot so Islandija, Japonska, Portugalska in Norveška največjo oskrbo z ribjim mesom na svetu, kar je odvisno tudi od klime, socialne kulture in kupne moči prebivalstva. Večina evropskih držav ima oskrbo z ribami in morskno hrano na prebivalca med 20 in 30 kg.



Slika 6. Oskrba z ribami in morskno hrano v različnih državah na prebivalca v letu 2002 (Marin, 2005)

2.4 METODE ZA DOLOČANJE SELENA V HRANI

Z leti vse bolj narašča zanimanje za določitev selena v različnih materialih, predvsem v bioloških vzorcih, zaradi njegove toksikološke in fiziološke vloge. Pri tem je pomembno, da imamo na voljo različne metode za določitev selena v širokem koncentracijskem območju. Pri izbiri metode je meja detekcije pomemben faktor. Medtem ko so ostali pomembni dejavniki še: hlapnost elementa, prisotnost motečih zvrsti, zahteva za natančnost in zanesljivost, razpoložljivost opreme, čas in stroški (Ihnat, 1989).

Večina metod zahteva tudi specifično pripravo vzorca pred določitvijo selena, kjer pa lahko pride do nezaželenih kontaminacij in izgub elementa. Prva kritična faza je že samo vzorčenje, saj je težko pridobiti čisto mišičnino rib, oziroma zelo homogen vzorec. V naslednji stopnji pa je pomembno, da dosežemo popoln razkroj vzorcev in pri tem preprečimo izgube zaradi nastanka hlapnih selenovih spojin (Combs in Combs, 1986).

Razkroj vzorcev je torej ena najbolj kritičnih stopenj določanja selena. Večina metod zahteva razkroj organskih snovi v vzorcu, element pa ostane v topni obliki v raztopini. Oksidacija lahko poteka na dva načina: s suhim postopkom, ko se vzorec upepeli s segrevanjem pri visoki temperaturi ob prisotnosti zraka, ali z mokrim postopkom z uporabo različnih kislin ali njihovih mešanic pri povišani temperaturi v odprtih ali zaprtih sistemih. Za določanje selena je najbolj primeren moker razkroj v zaprtih sistemih, ker tako zmanjšamo možnost izgub zaradi hlapnosti spojin elementa. Uporaben je za različne tipe vzorcev z različnimi osnovami. Najpogosteje se za moker razkroj uporabljajo razne mešanice kislin (HNO_3 , H_2SO_4 , H_2O_2), ki z oksidacijo razkrojijo organski del vzorca in tako zmanjšajo ali odstranijo nekatere interference. Ima pa pomanjkljivost, da se lahko uporablja le za majhne odtehte vzorca, ker je pri večjih odtehtah velika poraba kislin in s tem tudi visoka vrednost slepega vzorca (Combs in Combs, 1986; Hoenig in de Kersabiec, 1996; Reilly, 1996).

Določitev selena v ribjih izdelkih, še posebej pa v svežih ribah predstavlja poseben izziv zaradi kompleksne sestave ribjega mesa, prisotnosti maščob in beljakovin. Za določanje selena v literaturi omenjajo fluorimetrično metodo, induktivno sklopljeno plazmo z masno spektrometrijo (ICP-MS), hidridno tehniko atomske absorpcijske spektrometrije (HG-AAS), instrumentalno nevtronsko aktivacijsko analizo (INAA), radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA), masno spektrometrijo z izotopskim razredčenjem (IDMS), atomsko emisijsko spektroskopijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-AES), elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo (ET-AAS) (Combs in Combs, 1986; Stibilj in sod., 1996; Sabe in sod., 2001).

2.5.1 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)

Hidridna tehnika v povezavi z AFS je bila prvič predstavljena leta 1991 kot metoda z visoko občutljivostjo, saj hidridna tehnika vključuje ločitev analita od osnove. S tem, ko se analit loči od osnove, se izognemo interferencam, pri tem pa se izboljša meja zaznavnosti metode, poveča se natančnost in točnost rezultatov (Dedina, 1995; Sabe in sod., 2001).

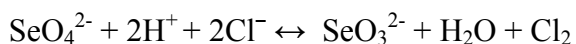
Hidridna tehnika

Hidridna tehnika loči elemente, ki tvorijo hlapne hidride, od osnove vzorca. Sestavljena je iz dveh procesov:

- sprostitvev hidrida iz raztopine vzorca (pretvorba analita v nakisanem vzorcu do hidrida in pretvorba v plinsko fazo),
- transport sproščenega hidrida s tokom nosilnega plina do atomizerja (Dedina, 1995).

Selenove spojine prisotne v vzorcu je potrebno najprej pretvoriti v anorgansko obliko, potem pa izvesti še redukcijo, ker le reducirana oblika selena, selenit (Se(IV)), tvori hlapne hidride (H₂Se). Kot reducent za predhodno redukcijo Se(VI) do Se(IV) se pri tem največkrat uporablja HCl, z optimalno koncentracijo med 4 in 7 mol/L. Reakcijo pa je potrebno izvajati pri visoki temperaturi (90 – 100 °C), saj je prisotno redoks ravnotežje močno odvisno od temperature (Dedina, 1995).

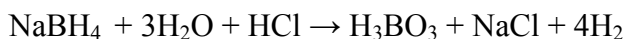
Redukcija Se(VI) v Se(IV):



Za tvorbo hidridov se najpogosteje uporablja raztopina NaBH₄, ki pa je nestabilna, zato jo je potrebno pripravljati dnevno in stabilizirati z NaOH. V kislem, pH ≤ 1, NaBH₄ razpade v nekaj mikrosekundah in pri tem reducira Se(IV) do H₂Se (Dedina, 1995):



Hidrid ločimo od raztopine v plinsko-tekočinskem separatorju, nato pa nosilni plin odnese nastali hidrid v atomizer, hkrati pa pomaga tudi pri sproščanju hidrida iz raztopine vzorca. Najpogosteje se kot nosilni plin uporablja argon, manj pa dušik, mora pa biti inerten do nastalega hidrida. Pri prenosu pomaga tudi vodik, ki nastane iz presežka reagenta (Dedina, 1995):



Pred vstopom plina v plamen je potrebno odstraniti vlago, ker le-ta vpliva na občutljivost določitve. Kot sušilni plin se pri tem najpogosteje uporablja zrak, dušik ali argon. Hidrid nato atomiziramo v plamenu vodika. Vzburjeni atomi pri prehodu v osnovno stanje oddajajo svetlobo, ki jo zazna fotopomnoževalka (Dedina, 1995).

Pri hidridni tehniki se zaradi ločitve analita od osnove izognemo spektralnim motnjam. Pogoste so tudi nespektralne motnje, ki nastanejo zaradi vpliva sestavin vzorca na signal. Delimo jih na:

1. **motnje v plinasti fazi**, ki jih povzročajo hlapne zvrsti (hidridi in druge spojine) in kapljice v toku plina hidridnega generatorja. Lahko imajo neposreden in zakasnel vpliv na analit, opazne pa so zlasti, ko se raztopina vzorca in referenčna raztopina razlikujeta v koncentraciji analita.
2. **motnje v tekoči fazi**, ki nastanejo zaradi sprememb v hitrosti prehoda hidrida iz tekoče v plinasto fazo in/ali zaradi manjše učinkovitosti sproščanja hidrida. To so lahko moteče komponente osnove vzorca ali pa motnje zaradi drugačne oblike analita (drugačno oksidacijsko stanje ali organsko vezan analit zaradi nepopolnega razkroja). Moteče komponente osnove vzorca delimo naprej na interference heterogene faze (analit se na to fazo veže ali pa se hidrid ujame vanjo), raztopljene organske spojine (vpliv zmanjšamo z učinkovitim razkrojem) in raztopljene anorganske spojine (Dedina, 1995).

Interference ionov so najbolj raziskane. Mehanizmi delovanja so lahko naslednji:

1. Ion-ion: analizirani in interferenčni ion v raztopini vzorca reagirata pred dodatkom NaBH_4 , nastala spojina se ne reducira ali pa se reducira manj učinkovito.
2. Ion-produkt: analizirani ion se ujame ali veže na spojino (produkt), nastalo pri reakciji med motečo komponento in NaBH_4 .
3. Hidrid-ion: hidrid reagira z interferenčnim ionom.
4. Hidrid-produkt: hidrid se ujame na spojino (produkt), nastalo pri reakciji med motečo komponento in NaBH_4 .
5. Moteča komponenta ima večjo afiniteto do NaBH_4 kot analit, zato se NaBH_4 porabi in hidrid analita ne nastane.

Določanje selena motijo elementi, ki tvorijo hidride ($\text{As}^{3+} > \text{As}^{5+}$, $\text{Sb}^{3+} > \text{Sb}^{5+}$, $\text{Sn}^{2+} > \text{Sn}^{4+}$, Bi^{3+} , Te^{4+} , Hg^{2+}), nekateri kovinski ioni (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{4+}), močni reducenti, ki reducirajo Se^{4+} v Se^0 (I^- , Sn^{2+} , $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, askorbinska kislina, L-cistein), močni oksidanti, ki oksidirajo Se^{4+} v Se^{6+} oziroma H_2Se v Se^0 (Cl_2 , NOCl , NO^{2-} , NO_x , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, NO_3^- , Cr^{6+} , MoO_4^{2-} , VO_3^-) in organske spojine, ki ostanejo v raztopini, če je razkroj nepopoln; povzročajo tudi penjenje (Dedina, 1995).

Navedene motnje lahko tudi zmanjšamo na več načinov, in sicer:

1. Z razredčitvijo vzorca:
Teža večkrat ne moremo narediti, ker se na ta način zmanjša občutljivost.
2. S tehniko standardnega dodatka.
3. Z odstranitvijo motečih komponent:
Separiranje je dodaten korak, ki poveča možnost kontaminacije, poleg tega je separiranje specifično za določeno kombinacijo moteča komponenta/analit.
4. S pravilno izbiro kemijskih in instrumentalnih pogojev pri tvorbi hidrida na osnovi poznavanja mehanizma delovanja motečih komponent:
Interferenčni mehanizem ion-ion se razlikuje od drugih, ker deluje že pred tvorbo hidrida. Tako delujejo močni oksidanti. Vpliv odstranimo z izbiro primernejšega razkroja ali z dodatkom ustreznega reagenta. Od ostalih mehanizmov je najpomembnejši hidrid-produkt. Vpliv le-tega zmanjšamo tako, da preprečimo redukcijo in obarjanje kovinskih ionov (tvorba kelatov in drugih kompleksov) ter zmanjšamo kontaktni čas med hidridom in reducirano obliko moteče komponente (Dedina, 1995). To dosežemo s hitrim prenosom hidrida iz tekoče v plinasto fazo (z

učinkovitim plinsko/tekočinskim separatorjem). Ena od možnosti je združevanje vzorca in reagenta v razpršilcu in ne v klasični obliki mešanja dveh tekočin (Dedina, 1995).

Občutljivost hidridne tehnike lahko še povečamo z dodatnimi predkoncentracijskimi in separacijskimi tehnikami on-line. Za selen najpogosteje uporabljamo pasti v tekočem dušiku, zbiranje in-situ v grafitni kiveti in separacije z ionskimi izmenjevalci (Dedina, 1995).

Atomska fluorescenčna spektrometrija (AFS)

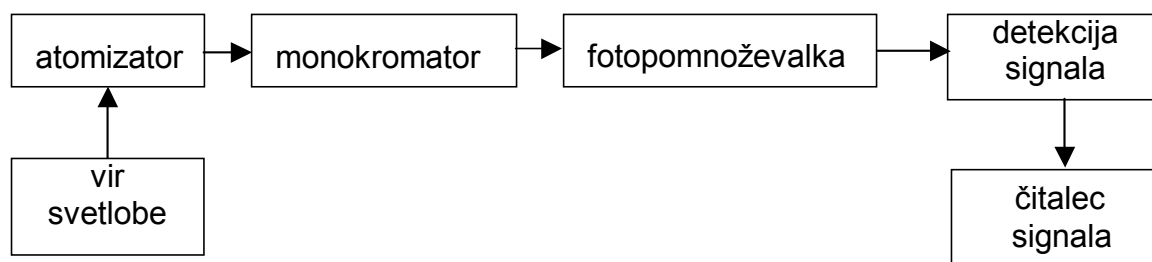
AFS združuje atomsko emisijsko spektrometrijo s širokim linearnim območjem in atomsko absorpcijsko spektrometrijo z dobro selektivnostjo. AFS se uporablja za analizo okoli 25 elementov, najpogosteje pa za analizo As, Cd, Hg, Pb in Se. Ti elementi morajo izpolnjevati tri pogoje:

- element mora tvoriti lahko hlapne derivate,
- imeti mora atomsko fluorescenčno črto v dosegljivem območju,
- na voljo mora biti zelo intenziven izvor za vzbujanje (Hill in sod., 1999).

Pri AFS najprej poteka mehanizem atomizacije hidrida z interakcijami hidridov z vodikovimi radikali:



Princip AFS je absorpcija svetlobe, ki jo prosti atomi absorbirajo iz črtastega ali kontinuirnega izvora. Pri prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje pa fluorescirajo. Poznanih je več vrst fluorescence, ki imajo različen način vzbujanja in oddajanja svetlobe. Za kvantitativno analizo se najpogosteje uporablja resonančna fluorescenca, pri kateri je valovna dolžina oddane svetlobe enaka absorbirani. Intenziteta emitirane svetlobe je zato proporcionalna absorbirani svetlobi in atomom analita. Pri AFS se fluorescirana svetloba širi na vse strani in jo merimo z detektorjem, ki je nameščen pravokotno na smer svetlobe iz vira za vzbujanje. Detektorski sistem je ponavadi fotopomnoževalka. Atomski fluorescenčni spektrometer je sestavljen iz enakih komponent kot atomski absorpcijski spektrometer, le da fluorescirano svetlobo merimo pravokotno na vstopno svetlobo. Shema AFS je prikazana na sliki 7. Meja detekcije se lahko izboljša z namestitvijo intenzivnega izvora za vzbujanje (Vandecasteele in Block, 1993).



Slika 7. Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra (Vandecasteele in Block, 1993)

Večina AFS meritev poteka v plamenskem atomizatorju s pretočnim vnosom vzorca. Učinkovitost atomizacije in emisija ozadja sta odvisni od vrste plamena (Ar, H₂, zrak-C₂H₂, N₂O-C₂H₂, N₂, ...). Primeren izvor v AFS mora biti stabilen in mora predstavljati dovolj intenziven izvor svetlobe, katere valovna dolžina je značilna za element. Kot izvor za vzbujanje se najpogosteje uporabljajo žarnice z votlo katodo (HCL), brezelektrodne žarnice z radiofrekvenčnim napajanjem (EDL), laser (LIF), v zadnjem času pa tudi žarnice z votlo katodo z dodatnim napajanjem (BHCL), ki imajo dodatno razelektritev med anodo in izvorom elektronov (dodatna katoda), ki poteka prek primarnega področja atomov, zato se vzbudi večina atomov s površine katode. Za BHCL je značilna izredna stabilnost in intenziteta oddane svetlobe, široko območje linearnosti, večji naklon umeritvene krivulje in višje razmerje signal/šum (Bezur, 1998).

2.5.2 Validacija analizne metode

Za validacijo analiznih metod uporabljamo naslednje parametre:

- Pravilnost (točnost) metode pove, kako je rezultat dobljen z razvito metodo blizu prave oziroma sprejete vrednosti. Določamo jo s pomočjo certificiranih referenčnih materialov ali s primerjavo z neko drugo neodvisno metodo.
- Natančnost metode pove, za koliko rezultati med seboj nihajo. Lahko jo podamo na dva načina, odvisno od tega, kako jo določimo:

Ponovljivost določimo, ko primerjamo rezultate, izmerjene pri ponovljivih pogojih (ista metoda, isti reagenti, isti analitik, ista laboratorij in oprema, kratek čas med meritvami). Ponovljivost največkrat izrazimo s standardnim odklikom ponovljivosti (SD) in relativnim standardnim odklikom ponovljivosti (RSD).

Obnovljivost določimo, ko primerjamo rezultate, izmerjene pri obnovljivih pogojih (ista metoda, isti vzorec, drug analitik, različna laboratorij in oprema, daljši čas med meritvami). Obnovljivost največkrat izrazimo s standardnim odklikom obnovljivosti (SD_R) in z relativnim standardnim odklikom obnovljivosti (RSD_R) po naslednjih enačbah (Smrkolj, 2003):

$$N = \sum n_i \quad \dots(4)$$

N – skupno število meritev

n_i – število ponovitev

$$n_0 = \frac{1}{p-1} \left(N - \frac{\sum n_i^2}{N} \right) \quad \dots(5)$$

n_0 – povprečno število meritev

p – število serij

$$GM = \frac{\sum \sum x_i}{N} \quad \dots(6)$$

GM – skupno povprečje

x_i – posamezna meritev

$$M_i = \frac{\sum n_i (X_i - GM)^2}{p-1} \quad \dots(7)$$

X_i – srednja vrednost ene serije

M_i – parameter

$$SD_{wi}^2 = \frac{\sum (n_i - 1) SD_i^2}{\sum (n_i - 1)} \quad \dots(8)$$

SD_{wi} – standardni odmik merjenja znotraj ene serije

SD_i – standardni odmik ponovljivosti

$$SD_{be}^2 = \frac{M_i - SD_{wi}^2}{n_0} \quad \dots(9)$$

SD_{be} – standardni odmik merjenja med serijami meritev

$$SD_R = \sqrt{SD_{be}^2 + SD_{wi}^2} \quad \dots(10)$$

SD_R – standardni odmik obnovljivosti

$$RSD_R = \frac{SD_R}{GM} \quad \dots(11)$$

RSD_R – relativni standardni odmik obnovljivosti

- Območje linearnosti določimo tako, da izmerimo standardne raztopine različnih koncentracij in izračunamo regresijsko premico po metodi najmanjših kvadratov. Če je koeficient korelacije vsaj 0,99, je metoda linearna.
- Meja zaznavnosti je enaka koncentraciji analita, katere signal je enak povprečnemu signalu slepega vzorca plus trem standardnim odkrom slepega vzorca (Farrant, 1997).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorčni material

Naš vzorčni material so bile sveže ribe in ribji izdelki, skupaj 128 vzorcev, ki so predstavljeni v preglednicah 8-10. Vzorce smo vzorčili v letu 2005, in sicer v obdobju štirih mesecev. Vzorca svežih rib so bili kupljeni na ljubljanski tržnici, vzorca ribjih izdelkov pa v večjih trgovskih centrih v Ljubljani.

V preglednici 8 tako navajamo vse podatke, ki smo jih pridobili v ribarnicah za sveže ribe, v preglednicah 9 in 10 pa vse podatke, ki smo jih lahko pridobili iz deklaracij, na embalažah ribjih izdelkov. V naši raziskavi smo imena proizvajalcev ribjih izdelkov označili s črkami.

3.1.1.1 Ribe

Preglednica 8. Seznam vzorcev svežih rib, kupljenih maja 2005 v ribarnici na ljubljanski tržnici

Št. vzorca	Vrsta sveže ribe / kos	Latinsko ime	Poreklo ribe	Ribolovno območje
40	Ameriška postrv / file	<i>Onchorhynchus mykiss</i>
79	Tuna Filon	<i>Thunnus thynnus</i>	Indonezija	FAO 41
80	Losos / file	<i>Salmo salar</i>	Norveška	FAO 27
81	List Panga / file	<i>Platichthys flesus</i>	Nizozemska	FAO 27
82	Oslič / file	<i>Gadus morhua</i>	Holandija	FAO 27
83	Lignji mediteranski	<i>Loligo vulgaris</i>	Francija	FAO 27
84	Ugor	<i>Conger conger</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
85	Hobotnica Mariva d.o.o.	<i>Octopus vulgaris</i>	Filipini	..
86	Romb	<i>Psetta maxima</i>	Španija	..
87	Morska žaba / rep	<i>Lophius piscatorius</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
88	Škarpna	<i>Scorpaena scrofa</i>	Maroko	FAO 34
89	Oslič / file	<i>Gadus morhua</i>	Danska	FAO 27
90	Oslič	<i>Gadus morhua</i>	Hrvaška	..

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 8: Seznam vzorcev svežih rib, kupljenih maja 2005 v ribarnici na ljubljanski tržnici

Št. vzorca	Vrsta sveže ribe / kos	Latinsko ime	Poreklo ribe	Ribolovno območje
91	Trilja	<i>Mullus</i>	Hrvaška	..
92	Ribon	<i>Pagellus erythinus</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
93	Cipelj	<i>Mugil chepalus</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
94	Slanik	<i>Clupea harengus</i>	Danska	FAO 27
95	Postrv / file	<i>Salmo trutta</i>	Slovenija	FAO 34
96	Ostriž / file	<i>Lates niloticus</i>	Tanzanija	FAO 51 in 57
97	Skua	<i>Scomber scomber</i>	Slovenija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
98	Brancin	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
99	List file	<i>Solea vulgaris</i>	Danska	FAO 27
100	Zobatec / file	<i>Dentex dentex</i>	Maroko	..
101	Losos	<i>Salmo salar</i>	Norveška	FAO 27
102	Orada	<i>Sparus aurata</i>	Turčija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
103	Tuna	<i>Thunnus thynnus</i>	Indonezija	FAO 41
104	Ovčica	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
105	Kovač	<i>Zeus faber</i>	Maroko	FAO 34
106	Morska žaba / rep	<i>Lophius piscatorius</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
107	Orada	<i>Sparus aurata</i>	Hrvaška	..
108	Sardela	<i>Clupea pilchardus</i>	Slovenija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
109	Cipelj	<i>Mugil chepalus</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
110	Ostriž / file	<i>Lates niloticus</i>	Tanzanija	FAO 51 in 57
111	Zobatec / file	<i>Dentex dentex</i>	Maroko	..
112	Losos	<i>Salmo salar</i>	Norveška	FAO 27
113	Orada	<i>Sparus aurata</i>	Turčija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
114	Sardela	<i>Clupea pilchardus</i>	Slovenija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
115	Oslič / file	<i>Gadus morhua</i>	Danska	FAO 27
116	Postrv / file	<i>Salmo trutta</i>	Slovenija	FAO 34
117	List / file	<i>Platichrus flesus</i>	Danska	FAO 27
118	Mečarica / file	<i>Xiphias gladius</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
119	Tuna / file	<i>Thunnus thynnus</i>	Indonezija	FAO 41
120	Morska žaba / rep	<i>Lophius piscatorius</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
121	Ribon	<i>Pagellus erythinus</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
122	Slanik	<i>Clupea harengus</i>	Danska	FAO 27
123	Oslič / file, Jadran	<i>Merluccius merluccius</i>	Hrvaška	..
124	Orada	<i>Sparus aurata</i>	Turčija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
125	Brancin	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
126	Skua	<i>Scomber scombrus</i>	Slovenija	FAO 37.1, 37.2, 37.3
127	Škarpena	<i>Scorpaena scrofa</i>	Maroko	FAO 34
128	Ovčica	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Hrvaška	FAO 37.1, 37.2, 37.3
129	Trilja / file	<i>Mullus</i>	Hrvaška	..

.. ni navedena država porekla in ni navedeno ribolovno območje

3.1.1.2 Ribji izdelki

Preglednica 9. Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih marca 2005 v Ljubljani

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec/država	Poreklo izdelka
1	Tuna, kosi tunov v rastlinskem olju	Rastlinsko olje	L-124-D-04	80	58,3	31.12.2010	A / Španija	Španija
3	Sardine v rastlinskem olju		PA 1	115	85,5	31.12.2010	A / Hrvaška	..
6	Izbrana tunina koščki tunine v rastlinskem olju		352COE 3D7H9	185	150,9	Do konca leta 2010	A / Tajska	Tajska
12	Zviti slani fileti inčunov v rastlinskem olju		L 027 05	50	31,9	Julij 2006	X / Španija	..
13	Sardine z limono v rastlinskem olju		3Z11 0205	115	94,3	31.12.2008	A / Hrvaška	..
14	Koščki tune v rastlinskem olju		352FOE 3D6014	185	150,6	Do konca leta 2008	A / Tajska	Tajska
20	Kosi tune v rastlinskem olju		PO102A A 16C03	80	56,9	31.12.2009	A / Španija	..
22	Sardine v rastlinskem olju		612 B	69	49,6	Do leta 2009	A / Francija	..
31	Tuna v rastlinskem olju		352 F0 3N7H4	185	131,1	Do konca leta 2010	B / Tajska	Tajska
34	Sardine v rastlinskem olju		Z09 0205	115	89,5	31.12.2009	A / Hrvaška	..
5	Tunina v ekstra deviškem oljčnem olju		Oljčno olje	L4071 N	160	123,1	31.12.2008	A / Italija
17	Tuna v olivnem olju	L4099 B		160	114,7	31.12.2008	A / Italija	..
19	Tunina v olivnem olju	LT 214		160	118,0	Do konca leta 2007	B / Italija	..
21	Tunina v oljčnem olju	L 178 TZ		80	66,0	31.12.2008	F / Španija	..
24	Kosi tuna v oljčnem olju	5238KN TCTH K PT 18		185	142,8	8.11.2007	C / Tajska	Tajska
27	Tunina v oljčnem olju z origanom	L5304 N		160	110,5	31.12.2005	A / Italija	..
28	Fileti tune v oljčnem olju	L4087		200	149,7	31.12.2008	A / Italija	..
29	Tuna v olivnem olju z rožmarinom	L4126 N		160	109,6	31.12.2006	A / Italija	..

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih marca 2005 v Ljubljani

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec/država	Poreklo izdelka
35	Fileti skuše v olivnem olju	Oljčno olje	CMA C 232 1P	125	96,8	Do konca leta 2009	A / Portugalska	..
37	Koščki tune v olivnem olju		L 4088	80	72,1	25.8.2006	A / Italija	..
18	Fileti skuše v semenskem olju	Semensko olje	P 29 U 04 02	125	91,8	Do konca leta 2005	B / Hrvaška	..
9	Koščki tune v sončničnem olju	Sončnično olje	AO7120 8B TPMOP	80	52,8	31.12.2007	B / Francija	Slono-koščena obala
11	Tunina v sončničnem olju		AO7052 1B TPEOW	80	60,1	21.5.2007	B / Francija	Slono-koščena obala
36	Koščki tune v sončničnem olju		AO7041 6B	160	117,9	15.4.2007	B / Francija	Slono-koščena obala
2	Fileti skuše, lastni sok	Naravni (lastni) sok	L-031 021	125	80,3	21.4.2005	A / Slovenija	..
15	Tuna listao v naravnem soku		P SLCE 569 4061	185	134,1	28.2.2007	X / Francija	..
16	Tunina v naravnem soku		B L4279N	160	102,7	31.12.2007	A / Italija	..
23	Kosi tuna v lastnem soku		5023CN TCTH K PNO8X	95	68,0	18.10.2007	C / Tajska	Tajska
25	Tunina albacore v naravnem soku		A071029 B AENU	139	84,8	29.10.2007	B / Francija	Slono-koščena obala
39	Kosi tunine v naravnem soku		L 4089	80	69,5	28.10.2005	A / Italija	Tajska
7	Kosi tuna v paradižnikovi omaki po mediteransko		Paradižnikova omaka	54C6KN TCTH K PN05	185	149,4	5.11.2007	A / Avstralija
8	Koščki tune v paradižnikovi omaki	A071102 B TPMTP		80	59,6	30.11.2007	B / Francija	Slono-koščena obala
10	Koščki tunine v paradižnikovi omaki	L179607 1		160	104,8	31.12.2008	B / Španija	..

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih marca 2005 v Ljubljani

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec/država	Poreklo izdelka
4	Skušini fileji s petimi aromati in belim vinom	Zelenjavni dodatki	HE	176	77,5	21.1.2009	C / Francija	..
26	Mehiška solata s tunino		HE1	280	107,4	8.10.2008	C / Francija	..
30	Fižol s tunino		L4271	160	80,6	31.12.2006	A / Italija	..
32	Sardine z zelenjavo		1102 205F	115	73,8	31.12.2007	A / Hrvaška	..
33	Oslič na lovski način		21610 03 R	115	110,9	31.12.2006	A / Hrvaška	..
38	Kosi lososa z zelenjavo		7235TD N 918	100	73,2	20.10.2005	C / Italija	Tajska

.. – ni naveden proizvajalec izdelka in ni navedeno poreklo izdelka

Preglednica 10. Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih aprila 2005 v Ljubljani

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec/država	Poreklo izdelka
47	Koščki tune v rastlinskem olju	Rastlinsko olje	MM 22 KGO F18BD	185	136,6	31.12.2006	D / Tajska	..
51	Sardine v rastlinskem olju		Z 20 0205	115	51,7	31.12.2008	C / Hrvaška	..
53	Sardine v rastlinskem olju		LSB0E 16DF1	125	71,9	31.12.2006	D / Tajska	..
54	Spar sardine v rastlinskem olju		PA 3	125	94,1	31.12.2009	X / Hrvaška	..
57	Sardine v rastlinskem olju		2A5 S150304	125	86,5	31.12.2008	D / Hrvaška	..
62	Kosi tune v rastlinskem olju		MNI ACOOK A 6ML1L	185	132,2	31.12.2006	D / Tajska	..
74	Spar kosi tune v rastlinskem olju		L/K 351	80	48,1	30.6.2010	X / Španija	..
75	Spar kosi tune v rastlinskem olju	L/K 349	160	98,6	30.6.2010	X / Španija	..	
42	Kocke tune v oljčnem olju	Oljčno olje	C01675. 12C	160	115,5	23.9.2006	C / Španija	..
45	Tunina v oljčnem olju		L1940	160	109,8	31.12.2009	D / Španija	..
48	Fileti tune v oljčnem olju		LB 034 B	200	132,4	3.2.2008	D / Italija	..

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih aprila 2005 v Ljubljani

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec/država	Poreklo izdelka
69	Rumenoplavuti tun v olivnem olju	Oljčno olje	M 073 A4	80	49,4	31.12.2011	E / Španija	..
70	Tunina v oljčnem olju, sredozemski okus s česnom		K163 AG	80	50,4	31.12.2010	E / Španija	..
71	Tunina v oljčnem olju, z manj soli		K 183 AJ	80	49,6	31.12.2010	E / Španija	..
76	Sardine v semenskem olju	Semensko olje	S N6 1711 04	125	93,8	Do konca leta 2008	E / Hrvaška	..
43	Koščki tune v naravnem soku	Naravni (lastni) sok	C01675. 11D	160	111,6	23.9.2006	A / Italija	..
65	Koščki tune v lastnem soku		CNI ASBBK A 6DB1N	185	112,1	31.12.2006	D / Tajska	..
66	Kosi tune v lastnem soku		MM 22KCW B2KCD	170	99,2	31.12.2006	D / Tajska	..
72	Losos v lastnem soku		3113P08 13C	170	126,9	17.8.2005	A / ZDA	ZDA
49	Tuna fižolom v pikantni paradižnikovi omaki	Paradižnikova omaka	4NG 2701 04	125	76,6	Do konca leta 2006	F / Hrvaška	..
52	Tuna v paradižnikovem soku z zelenjavo		QOF	185	132,5	31.12.2006	D / Tajska	..
58	Spar rezani slanikovi fileti v paradižnikovi omaki		D-NI-EFB 015 BG	200	107,2	31.12.2009	X / Avstrija	..
77	Sardine v paradižnikovi omaki		LSBSD2 15DF1	125	80,9	31.12.2006	D / Tajska	..
41	Sicilijanska solata	Zelenjavni dodatki	LH248J	180	165,0	30.9.2005	E / Španija	..
44	Provincale zelenjava s skušo		L040730	125	82,7	30.7.2007	A / Slovenija	..

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Seznam vzorcev ribjih izdelkov kupljenih aprila 2005 v Ljubljani

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec/država	Poreklo izdelka
46	Tunina v oljčnem olju z inčuni in kaprami	Zelenjavni dodatki	L3251 N	160	108,8	31.12.2006	A / Italija	..
50	Sardine v zelenjavni omaki		Z11F 0205	115	85,4	31.12.2008	C / Hrvaška	..
55	Picnic zelenjava s skušo		L050106	125	56,6	6.1.2008	A / Slovenija	..
56	Izola Brand skuša z zelenjavo		L041207	125	73,6	7.12.2007	A / Slovenija	..
59	Kosi tuna z mehiško omako		54D8KN TCTH K R121	185	126,9	21.1.2008	A / Avstralija	Tajska
60	Solata s tunino v jerebičji omaki	Zelenjavni dodatki	G274 P	150	93,5	Do konca leta 2006	E / Španija	..
61	Grah s tunino		L4182	160	71,4	31.12.2006	A / Italija	..
63	Antipasto zelenjava s tunom		L040827	150	78,8	27.8.2007	A / Slovenija	..
64	Tuna Pikantina zelenjava s tunom v pikantni omaki		L041117	150	67,7	17.11.2007	A / Slovenija	..
67	Solata s tunino		LK 345	150	112,3	Do konca leta 2008	E / Španija	..
68	Sredozemska solata s tunino		LK 195	150	100,8	Do konca leta 2008	E / Španija	..
73	Spar koščki tune s čebulo, grahom in paradižnikovo omako		OE 2VDS 3139 MA	185	126,2	31.12.2007	X / Tajska	..

..- ni naveden proizvajalec in ni navedeno poreklo izdelka

3.1.1.3 Certificiran referenčni material (CRM)

Za preverjanje pravilnosti in obnovljivosti metode smo analizirali dva certificirana referenčna materiala:

- Certificiran referenčni material (CRM) TORT 2 – Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals
- Certificiran referenčni material (CRM) DORM 1 – Dogfish Muscle

3.1.2 Reagenti

Pri pripravi raztopin in vzorcev smo uporabljali deionizirano vodo (Milli Q, Milipore) in naslednje kemikalije:

- koncentrirana HNO_3 , 65 % (Merck, suprapur)
- koncentrirana H_2SO_4 , 96 % (Merck, suprapur)
- koncentrirana HCl , 30 % (Merck, suprapur)
- koncentriran H_2O_2 , 30 % (Merck, p.a.)
- NaOH (Merck, p.a.)
- NaBH_4 (Fluka, purum p.a.)
- V_2O_5 (Merck, p.a.)
- 100 % kadeča HNO_3 (Merck, suprapur)
- Raztopina V_2O_5 v H_2SO_4 : 3,4 g V_2O_5 smo razredčili na 30 mL z Milli-Q vodo in nato dodali 170 mL koncentrirane H_2SO_4 pri 4 °C. Raztopino smo hranili na temnem.
- 1,2 % NaBH_4 v 0,1 mol/l NaOH : 6 g NaBH_4 in 2 g NaOH smo raztopili v 500 mL Milli-Q vode in shranili pri 4 °C do uporabe. Raztopino smo pripravljali dnevno.
- Standardna raztopina na zalogo Se(IV) v 5 % HNO_3 (Merck, 1005 ± 10 mg/l)
- Standardna mesečna raztopina Se(IV) ($11,5$ µg/g); delovne standarde z nižjimi koncentracijami smo dobili z redčenjem te raztopine z 0,5 M HCl . Vse standardne raztopine smo hranili v hladilniku.
- Tedensko smo pripravili raztopino s 100 ng Se/g iz standardne mesečne raztopine Se(IV) , dnevno pa raztopine iz 100 ng Se/g raztopine s koncentracijami 2, 4, 6, 8 ng Se/g , z redčenjem z 0,5 M HCl , zaradi nestabilnosti raztopin.

3.1.3 Aparature

Analizna tehtnica (METTLER AE 240 S), avtomatska tehtnica (METTLER PM 460 DR), kuhinjski rezalnik (KENWOOD), grelni blok (LABO), atomski fluorescenčni spektrometer (EXCALIBUR, PS Analytical), peristaltična črpalka (ISMATEC, MCP 380), rekorder (SERVOGOR 102).

V jedrskem reaktorju (TRIGA MARK II, Inštitut Jožef Stefan v Ljubljani) so bili obsevani vzorci za določitev selena z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava vzorcev

Vzorci rib in ribjih izdelkov smo v čisti sobi najprej evidentirali. Zabeležili smo podatke o neto masi, roku uporabe, državi porekla izdelka (če je bila navedena), proizvajalcu, lot serijski številki in celotno ime izdelka.

Sledila je priprava vzorcev za analizo in hranjenje. Sveže ribe smo obdelali tako, da smo odstranili vso drobovino, kosti, glavo in kožo z luskami. Ostala nam je le čista mišičnina, ki smo jo shomogenizirali v kuhinjskem rezalniku (Kenwood). Vzorec svežih rib je bil pridobljen iz najmanj 2 kosov rib, oziroma celih svežih rib iste vrste.

Ribjim izdelkom smo najprej odstranili dodatek in stehali maso mesa. Nato smo s plastičnimi vilicami homogenizirali meso. Da bi dobili dober reprezentativen vzorec, smo vzeli 2-3 enake konzerve istega lota, jih združili v plastično mešalno posodo in nadaljevali s homogenizacijo z rezalnikom (Kenwood) približno 2 minuti.

Dobljeno homogeno maso smo shranili v plastičnih lončkih v zamrzovalniku pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, do začetka analiz.

3.2.2 Razkroj vzorcev

Visoke teflonske posodice (50 mL, Savillex) smo predhodno 24 h namakali v raztopini reagenta (10 % Micro 90), potem 24 h v raztopini $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O} = 1:1$ in nato smo jih sprali z deionizirano vodo Milli Q (Millipore). V tako pomite in stehane teflonske posodice smo odtehtali 0,40 – 0,45 g vzorca.

Za razkroj smo dodali 0,5 mL konc. H_2SO_4 in 1,5 mL konc. HNO_3 in čez noč segrevali pri $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zaprtih posodicah v aluminijastem bloku na električni plošči. Nato smo temperaturo povišali na $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ in segrevali še 1 uro. Raztopine smo ohladili na sobno temperaturo, dodali 2 mL konc. H_2O_2 in v odprtih posodicah segrevali 15 minut pri $115\text{ }^{\circ}\text{C}$, ponovno dodali 2 mL konc. H_2O_2 in segrevali pri isti temperaturi še 10 minut. Posodice smo ohladili na sobno temperaturo in dodali 0,150 mL razt. V_2O_5 v H_2SO_4 in segrevali pri 115°C do pojava modre raztopine (približno 20 minut). Za redukcijo smo ohlajenim raztopinam dodali 2,5 mL konc. HCl in segrevali 10 minut pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ohlajene raztopine smo po redukciji redčili na 40 g z Milli Q. Nekatere raztopine je bilo potrebno še redčiti (z 0,5 M HCl) zaradi visoke vsebnosti selena v raztopini. Na enak način smo pripravili tudi dva slepa vzorca, ki smo ju ravno tako redčili na 40 g z Milli Q vodo.

Pri vsaki seriji vzorcev (10), smo uporabili certificiran referenčni material, in sicer izmenično DORM 1 in TORT 2, ki smo ju odtehtali v teflonske posodice po približno 0,2 g. S CRM vzorci smo postopali na enak način, le raztopine TORT 2 vzorca smo po redukciji redčili z 0,5 M HCl , zaradi velike vsebnosti selena.

Uporabili smo tudi metodo standardnega dodatka, in sicer smo k alikvotu vzorca s predhodno ugotovljeno vsebnostjo selena, dodali:

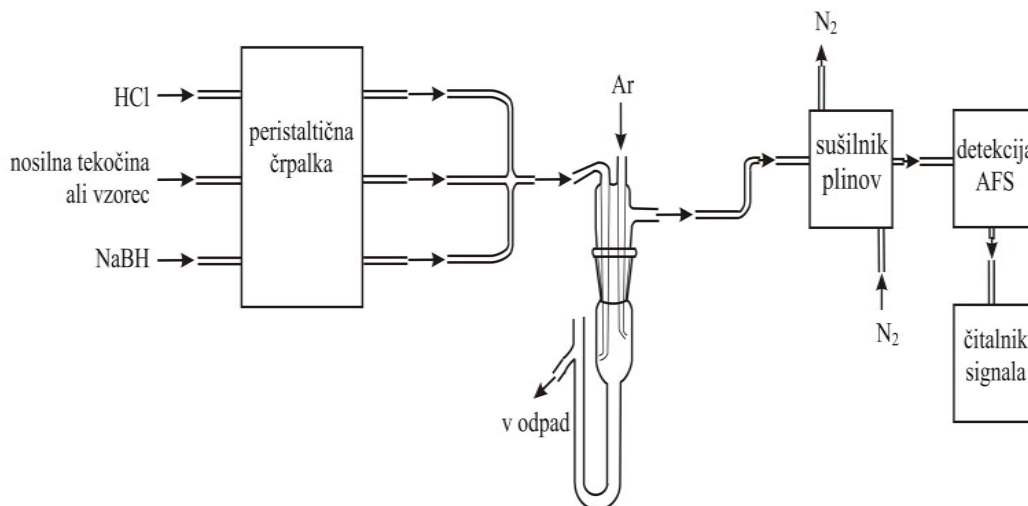
- Enako maso selena, kot je ugotovljena v alikvotu vzorca,
- 2 – krat večjo maso selena, kot je bila v alikvotu vzorca,
- 3 – krat večjo maso selena, kot je bila v alikvotu vzorca.

Masa alikvota vzorca je bila 0,2 g.

Standardne raztopine Se(IV) so bile pripravljene iz 0,5 M HCl z redčenjem osnovne raztopine Se(IV) (raztopina na zalogo). Vsebnost selena v vzorcu smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili dnevno z dnevnimi selenovimi standardi, v enakem mediju, kot so bili vzorci.

3.2.3 Določitev selena s HG-AFS

Na sliki 8 je shema pretočnega sistema HG-AFS, ki smo ga uporabili pri našem delu.



Slika 8. Shema sistema HG-AFS

Merili smo pri optimalnih pogojih, ki smo jih prevzeli po Mazej, (2002). Za nosilno tekočino smo uporabili 2 mol/L HCl s pretokom 1 mL/min. V križnem spoju je reagirala nosilna tekočina z 2 mol/L HCl raztopino (pretok 8 mL/min) in 1,2 % raztopino NaBH₄ v 0,1 mol/L NaOH raztopini (pretok 3 mL/min). Pretoke na peristaltični črpalki smo uravnavali s cevkami različnih notranjih premerov (0,76 mm; 1,02 mm; 2,06 mm) iz Tygona LFL. Povezava med injektorjem in separatorjem je bila narejena iz cevi (notranji premer 0,51 mm) in spojev PEEK-a (polietereterketon). V plinsko-tekočinskem separatorju (A – tip, PS Analytical) je prišlo do ločitve teh dveh faz. Argon (260 mL/min) je odnesel nastala plina H₂Se in H₂ skozi sušilec plinov (Perma Pure Products), kjer smo kot sušilni plin uporabili dušik (3 L/min), v atomski fluorescenčni spektrometer. Nastali selenovi atomi so absorbirali svetlobo s selenove žarnice z votlo katodo z dodanim napajanjem (Super Lamp Photron, valovna dolžina 196 nm; primarni tok 20 mA; sekundarni tok 25 mA). Intenzivnost fluorescirajoče svetlobe smo zabeležili z rekorderjem in izmerili višino vrhov.

Za validacijo metode HG-AFS smo uporabili dva statistična parametra, in sicer pravilnost in obnovljivost, predstavljena v poglavju 2.5.2 Validacija analizne metode.

3.2.4 Določitev selena z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA) (Stibilj in sod., 2005)

V polietilenske ampule, očiščene z raztopino HNO_3 in vode (1:1), smo odtehtali 0,2–0,4 g vzorca in jih zatalili. Vzorce smo skupaj s standardi z znano koncentracijo 40 ur obsevali v vrtiljaku jedrskega reaktorja TRIGA MARK II Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani, kjer je bil fluks nevtronov $1,5 \cdot 10^{12} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Obsevane vzorce smo hladili približno en mesec, nato pa smo jih prenesli v lončke iz vitrozila in dodali 3 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60–100 mg raztopine selenovega nosilca s koncentracijo 1,000 mg/mL in 0,5 mL konc. HNO_3 . Na električni plošči smo vzorec segrevali pri temperaturi 250–300 °C toliko časa, dokler ostanek v lončku ni postal svetlo rumene barve. Posušeni ostanek v lončku smo postavili v žarilno peč (Zlatarna Celje) in postopno dvigovali temperaturo do 530 °C ter pri tej temperaturi pustili 30 minut. Ostanek smo raztopili v 20 mL 6 M HCl in segrevali na električni plošči pri temperaturi 100 °C 15 minut, da je potekla redukcija Se(VI) v Se(IV). Lončke smo ohladili in vsebino kvantitativno prenesli v lij ločnik s 25 mL 6 M HCl, dodali 1 % 4-nitro-1,2-diaminobenzena (4 NDB) v 1 M HCl ter pustili v temi stati 1,5 ure pri sobni temperaturi. Potem smo dodali 6 mL toluena in stresali 15 minut, da se je selenov kelat 5-nitro-2,1,3-benzoselendiazol (5 NBSed) ekstrahirал v organsko fazo. Odpipetirali smo 5 mL toluenske faze v merilno kiveto. Gama aktivnost ^{75}Se ($t_{1/2}=120$ dni) smo izmerili z detektorjem well type Ge z utorom (EG&G Ortec, Model No. GWL-120-230). Število sunkov v določenem času smo primerjali s številom sunkov raztopine standarda, z znano koncentracijo selena.

Po merjenju aktivnosti gama, smo vzorce kvantitativno prenesli iz merilne kivete v 25 mL bučko in dopolnili do oznake s toluenom. Na spektrofotometru (MA 9525 Spekol 210 (Iskra)) smo izmerili absorbanco selenovega kelata pri 343 nm, odšteli absorbanco slepega vzorca in s pomočjo absorbanco standarda izračunali kemijski izkoristek postopka.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 METODA HG-AFS ZA DOLOČANJE SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH

4.1.1 Razkroj vzorcev

Za oksidacijo organske snovi v vzorcu za določanje selena se največkrat v literaturi omenja moker razkroj. Za validacijo analizne metode pa se uporablja določanje selena v certificiranem referenčnem materialu, pri čemer je pomembno, da je le-ta po osnovi in koncentraciji analita čimbolj podoben preiskovanemu vzorcu.

Pri našem delu smo za razkroj vzorcev rib in ribjih izdelkov uporabili mešanico HNO_3 - H_2SO_4 - H_2O_2 - V_2O_5 (Smrkolj, 2003). Uporabi perklorove kisline, ki jo v literaturi pogosto omenjajo, smo se zaradi njene narave izognili, saj tvori perklorate, ki so eksplozivni (Tinggi in sod., 1992). Želeli smo tudi ugotoviti vpliv kadeče 100 % HNO_3 na določitev selena v vzorcu rib, ker je močnejši oksidant kot 65 % HNO_3 .

Razkroj je potekal čez noč pri 80 °C in nato eno uro pri 130 °C v zaprti posodi. Za ugotavljanje učinkovitosti razkroja, smo uporabili različne volumne kadeče HNO_3 kisline: 0,5; 1,0 in 1,5 mL.

V preglednici 11 so predstavljeni dobljeni rezultati za selen v certificiranih referenčnih vzorcih in nekaterih ribjih izdelkih. Vidimo, da izbrani volumni kadeče HNO_3 kisline ne vplivajo na rezultat. Zato smo za nadaljnje delo uporabili 1,5 mL 65 % HNO_3 , ker je rokovanje s to kemikalijo bolj enostavno.

Preglednica 11. Vsebnost selena v standardnem referenčnem materialu in nekaterih vzorcih ribjih izdelkov z razkrojem s koncentrirano in kadečo HNO_3 , v zaprtih teflonskih posodah in detekcijo s HG-AFS

Oznaka vzorca	Vzorec	HG-AFS				Certificirana vrednost za selen ($\mu\text{g/g}$)
		Umeritvena krivulja				
		Volumen (100 %) HNO_3 za razkroj (mL)	Vsebnost selena ($\mu\text{g/g}$)*	Volumen (65 %) HNO_3 za razkroj (mL)	Vsebnost selena ($\mu\text{g/g}$)*	
1	Kosi tune v rastlinskem olju	1,5	$0,85 \pm 0,05$ (4)	1,5	$0,85 \pm 0,06$ (4)	
2	Fileti skuše v lastnem soku	1,0	$0,39 \pm 0,01$ (4)		$0,40 \pm 0,02$ (4)	
3	Sardine v rastlinskem olju	0,5	$0,97 \pm 0,02$ (4)		$1,05 \pm 0,05$ (4)	
CRM**	TORT 2	1,5	$5,45 \pm 0,06$ (6)		$5,51 \pm 0,07$ (6)	

* - povprečna vrednost \pm SD (število vzorcev); ** - certificiran referenčni material

4.1.2 Meja zaznavnosti

Mejo zaznavnosti smo določili z večkratno določitvijo selena v slepem vzorcu. Določili smo jo kot 3-kraten standardni odmik vrednosti slepega vzorca in delili z naklonom umeritvene krivulje. Ugotovili smo, da je meja zaznavnosti za izbrano metodo 0,04 ng/g raztopine.

4.1.3 Izkoristek celotnega postopka za določanje selena

Izkoristek celotnega analiznega postopka smo določili tako, da smo alikvotu vzorca (0,2 g) s predhodno ugotovljeno vsebnostjo selena dodali različne mase standardnih raztopin selena in jih razkrojili v zaprtih teflonskih posodah. Vsebnost selena po razkroju smo določili s pomočjo umeritvene krivulje. V preglednici 12 so predstavljeni posamezni rezultati za izkoristek. Povprečen izkoristek celotnega postopka je $98,9 \pm 7,5$ % (18 določitev).

Preglednica 12. Izkoristek celotnega analiznega postopka za razkroj selena v zaprti teflonski posodi

Številka vzorca	Določitev	Masa Se (ng)				Izkoristek (%)
		V alikvotu vzorca*	Dodana**	Pričakovana	Izmerjena	
85	1a	43,9	47,2	91,10	95,90	105,3
	1b	45,3	47,0	92,24	91,01	98,7
	2a	46,9	70,5	117,21	111,15	95,0
	2b	43,3	70,7	114,10	116,87	102,4
	3a	46,5	94,4	140,87	113,96	81,0
	3b	43,6	95,9	139,52	112,17	80,4
49	1a	266,7	241,6	508,34	503,19	99,0
	1b	264,5	240,7	505,51	501,90	99,3
	2a	266,4	486,1	748,80	789,21	105,4
	2b	264,5	485,8	748,79	809,33	108,1
	3a	271,5	728,9	1002,26	1000,68	100,0
	3b	266,4	728,6	994,04	1015,03	102,1
57	1a	354,0	485,9	841,83	898,22	106,7
	1b	469,1	485,3	954,67	920,61	96,4
	2a	467,5	973,8	1442,17	1443,36	100,1
	2b	476,2	971,5	1445,80	1429,96	99,0
	3a	475,3	1464,3	1937,17	1929,25	99,6
	3b	490,5	1473,4	1964,06	2008,41	102,3
povprečje \pm SD						98,9 \pm 7,5

- masa selena v alikvotu vzorca je bila izračunana na osnovi predhodno določene koncentracije selena v vzorcu; ** - dodana masa selena s standardnimi raztopinami s koncentracijami: 116,4 ng/g v vzorec 85 in 1202,1 ng/g v vzorca 49 in 57.

4.1.4 Metoda standardnega dodatka

Na področju študije vpliva interferenc za določanje selena z metodo HG-AFS je še veliko neznanega. Najbolj pogoste in največ obravnavane so pri hidridni tehniki anorganske interference, med katere sodijo naslednji elementi: Ni, Cu, Co, Fe, Ag, Au, Pd, Pt, Mo, Mg, As, Bi, Te, Sb, Sn, Hg, Ge, Pb, Si (Dedina, 1995; Hoenig in Kersabiec, 1996;).

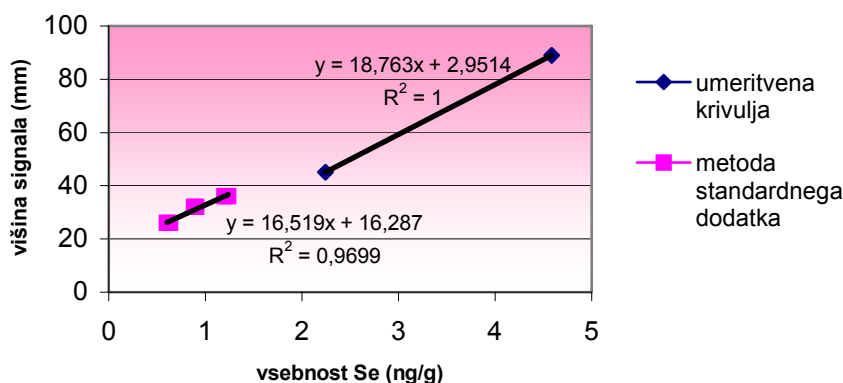
Ribe in ribji izdelki vsebujejo elemente (Cu, Fe, Mg, Mn, Cl, Ca in Hg), ki sodijo med interferenčne ione pri določanju selena s HG-AFS. Uporabili smo metodo standardnega dodatka, da bi ugotovili njihov vpliv pri določanju selena v naših vzorcih.

Pred razkrojem smo vzorcu dodali znano maso raztopine Se(IV). Vsebnost selena smo nato izračunali z metodo najmanjših kvadratov (Skoog in sod., 1988). Umeritveno krivuljo smo pripravljali dnevno z delovnimi raztopinami Se(IV) različnih koncentracij, ki smo jih pripravljali iz raztopine na zalogo in v enakem kislinskem mediju kot vzorce. Primerjava rezultatov, dobljenih z umeritveno krivuljo in z metodo standardnega dodatka, je predstavljena v preglednici 13 in sliki 9. Rezultati, dobljeni z metodo standardnega dodatka in rezultati iz umeritvene krivulje, se dobro ujemajo (preglednica 13). Tudi umeritvena krivulja in krivulja dobljena z metodo standardnega dodatka imata v primeru vzorca 85 podoben smerni koeficient (slika 9).

Preglednica 13. Primerjava rezultatov dobljenih z metodo standardnega dodatka in z umeritveno krivuljo

Vzorec	Vsebnost selena (ng/g)	
	Metoda standardnega dodatka*	Iz umeritvene krivulje**
85	102 ± 18 (6)	102 ± 9 (2)
49	668 ± 62 (6)	661 ± 3 (2)
57	1156 ± 35 (6)	1161 ± 10 (2)

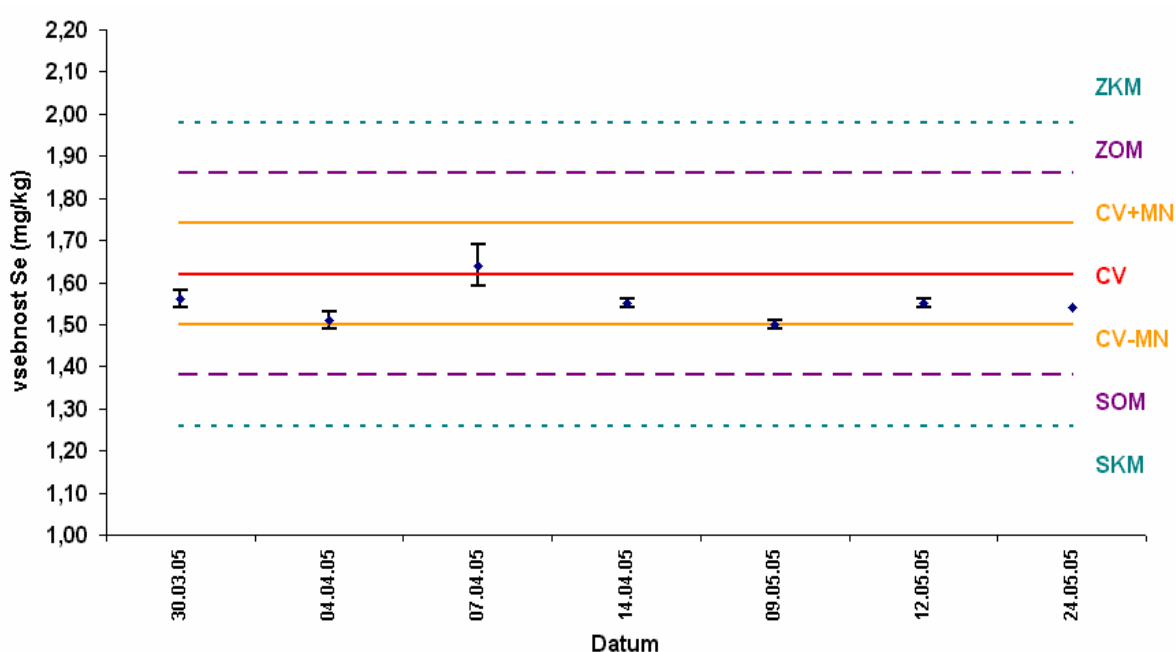
- vsebnost selena ± SD (število določitev); ** - povprečje ± absolutna napaka



Slika 9. Primerjava umeritvene krivulje in krivulje dobljene s standardnim dodatkom za vzorec 85

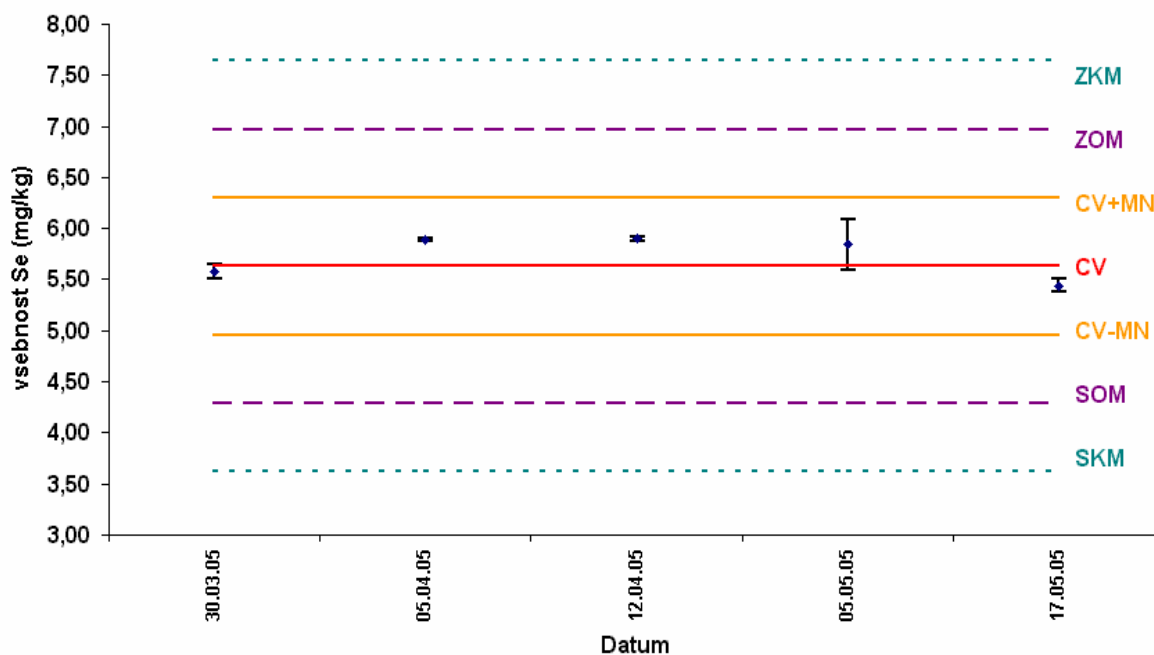
4.1.5 Pravilnost in natančnost postopka

Pravilnost in zanesljivost metode z razkrojem pri 130 °C v zaprti teflonski posodi in detekcije selena s HG-AFS, smo preverili z uporabo kontrolnega diagrama za določanje selena v standardnem referenčnem materialu DORM 1 in TORT 2, ker sta po naravi vzorca najbližja našim vzorcem (sliki 10 in 11). Podatke smo podali kot povprečje \pm standardni odklik, kar je eden izmed načinov podajanja rezultatov v kontrolni karti (Spiegel in Stephens, 1989). Večina rezultatov je znotraj območja med spodnjo in zgornjo opozorilno mejo, kar kaže na pravilnost in ponovljivost metode.



CV – certificirana vrednost (1,62 $\mu\text{g/g}$), MN – merilna negotovost (0,12 $\mu\text{g/g}$), SOM – spodnja opozorilna meja ($\text{CV} - 2 \cdot \text{MN}$), ZOM – zgornja opozorilna meja ($\text{CV} + 2 \cdot \text{MN}$), SKM – spodnja kritična meja ($\text{CV} - 3 \cdot \text{MN}$), ZKM – zgornja kritična meja ($\text{CV} + 3 \cdot \text{MN}$)

Slika 10. Kontrolni diagram določanja selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1



CV – certificirana vrednost (5,63 $\mu\text{g/g}$), MN – merilna negotovost (0,67 $\mu\text{g/g}$), SOM – spodnja opozorilna meja ($\text{CV} - 2 \cdot \text{MN}$), ZOM – zgornja opozorilna meja ($\text{CV} + 2 \cdot \text{MN}$), SKM – spodnja kritična meja ($\text{CV} - 3 \cdot \text{MN}$), ZKM – zgornja kritična meja ($\text{CV} + 3 \cdot \text{MN}$)

Slika 11. Kontrolni diagram določanja selena v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2

4.1.6 Obnovljivost postopka

Obnovljivost določanja selena v vzorcih rib in ribjih izdelkov smo izračunali v standardnem referenčnem materialu DORM 1 in TORT 2 (preglednice 14, 15, 16 in 17) po enačbah 4 – 11.

Preglednica 14. Določanje selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1

Obdobje opravljenih analiz	Vsebnost Se (ng/g)	n_i	X_i	SD_i
	x_i			
marec	1354,6; 1371,3; 1341,9	3	1355,9	14,8
april	1294,7; 1324,0; 1387,4; 1453,4; 1339,6; 1352,7; 1334,9;	7	1355,2	51,6
maj	1302,8; 1289,8; 1309,1; 1326,5; 1355,3; 1340,7; 1329,7; 1334,9; 1340,3	9	1325,4	20,9

x_i – posamezna meritev; n_i – število ponovitev; X_i – srednja vrednost ene serije; SD_i – standardni odmik

Preglednica 15. Obnovljivost določanja selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1

Parameter	N	p	n ₀	GM	M _i	SD ² _{wi}	SD ² _{be}	SD _R	RSD _R
Vrednost	19	7	2,7	1341,2	3383,2	323,10	1132,63	38,2	0,030

N – skupno število meritev; p – število serij; n₀ – povprečno število meritev; GM – skupno povprečje; M_i – parameter; SD_{wi} – standardni odmik merjenja znotraj ene serije; SD_{be} – standardni odmik merjenja med serijami meritev; SD_R – standardni odmik obnovljivosti; RSD_R – relativni standardni odmik obnovljivosti

Obnovljivost postopka (RSD_R) je v časovnem obdobju štirih mesecev znašala 3,0 %.

Preglednica 16. Določanje selena v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2

Obdobje opravljenih analiz	Vsebnost Se (ng/g)	n _i	X _i	SD _i
	X _i			
marec	4803,1; 4687,4; 4672,5	3	4721,0	71,5
april	4961,9; 4977,6; 4993,2; 5133,1; 5034,0; 4800,5	6	4983,4	108,6
maj	5133,1; 5034,0; 4657,0; 4521,27; 4633,1; 4634,0	6	4768,8	250,4

x_i – posamezna meritev; n_i – število ponovitev; X_i – srednja vrednost ene serije; SD_i – standardni odmik

Preglednica 17. Obnovljivost določanja selena v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2

Parameter	N	p	n ₀	GM	M _i	SD ² _{wi}	SD ² _{be}	SD _R	RSD _R
Vrednost	15	5	3,1	4845,0	88520,5	19386,74	22421,75	204,5	0,042

N – skupno število meritev; p – število serij; n₀ – povprečno število meritev; GM – skupno povprečje; M_i – parameter; SD_{wi} – standardni odmik merjenja znotraj ene serije; SD_{be} – standardni odmik merjenja med serijami meritev; SD_R – standardni odmik obnovljivosti; RSD_R – relativni standardni odmik obnovljivosti

Obnovljivost postopka (RSD_R) je v časovnem obdobju treh mesecev znašala 4,2 %.

4.1.7 Primerjava rezultatov vsebnosti selena v ribah in ribjih izdelkih dobljenih s HG-AFS in z neodvisno metodo RNAA

Rezultate, ki smo jih dobili pri določanju selena s HG-AFS (z umeritveno krivuljo), smo preverjali tudi z neodvisno metodo RNAA, kjer osnova vzorca nima vpliva na določitev selena. Preverili smo tri vzorce rib in ribjih izdelkov ter standardni referenčni material Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2, ki ima podobno osnovo kot naši vzorci rib. Standardni referenčni material je v obliki praška – liofiliziran in razmaščen.

Dobili smo zelo dobro ujemanje rezultatov dobljenih z umeritveno krivuljo in z RNAA metodo (preglednica 18).

Preglednica 18. Vsebnost selena v nekaterih vzorcih rib in ribjih izdelkov in v standardnem referenčnem materialu TORT 2, dobljenega s HG-AFS in z neodvisno metodo RNAA

Vzorec	Vsebnost selena ($\mu\text{g/g}$ vzorca)		
	HG-AFS	RNAA	Certificirana vrednost
	Umeritvena krivulja		
85	$0,13 \pm 0,33$ (3)**	$0,13 \pm 0,02$ (3)**	
49	$0,74 \pm 0,01$ (2)*	$0,74 \pm 0,02$ (2)*	
57	$1,36 \pm 0,10$ (2)*	$1,49 \pm 0,12$ (3)**	
TORT 2	$5,48 \pm 0,24$ (2)*	$5,77 \pm 0,12$ (2)*	$5,63 \pm 0,67$

- povprečje \pm absolutna napaka; ** - povprečje \pm SD (število določitev)

4.2 VSEBNOST SELENA V RIBAH IN RIBJIH IZDELKIH

4.2.1 Vsebnost selena v svežih ribah iz istega ribolovnega območja, ulovljenih v različnem časovnem obdobju

Namen našega večkratnega vzorčenja svežih rib je bil ugotoviti, kako varira vsebnost selena v ribah iz istega ribolovnega območja. Rezultati so prikazani v preglednici 19 in shematsko na sliki 12.

Preglednica 19. Vsebnost selena v svežih ribah iz istega ribolovnega območja, kupljenih na ljubljanski tržnici v obdobju treh mesecev

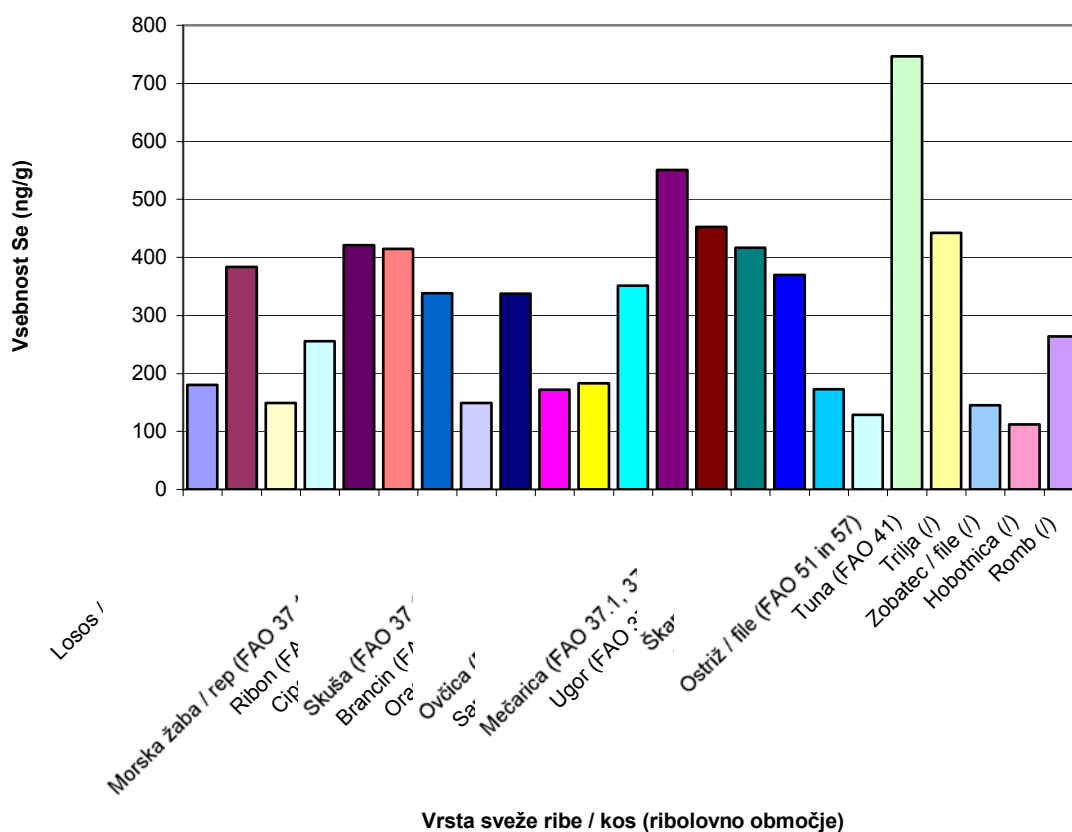
Št. vzorca	Vrsta sveže ribe / kos	Vsebnost Se (ng/g)	Čas ulova v letu 2005*	Ribolovno območje
80	Losos / file	182 ± 2	april	FAO 27
112		178 ± 3	maj	
94	Slanik	404 ± 3	maj	
122		362 ± 6	junij	
81	List / file	166 ± 6	april	
99		171 ± 8	maj	
117		110 ± 4	junij	
82	Oslič / file	269 ± 13	april	
89		234 ± 10	maj	
115		265 ± 6	junij	
83	Lignji	421 ± 8	april	FAO 37.1, 37.2, 37.3
87	Morska žaba / rep	220 ± 4	april	
106		529 ± 19	maj	
120		494 ± 11	junij	
92	Ribon	307 ± 9	maj	
121		370 ± 9	junij	
93	Cipelj	89 ± 3	maj	
109		209 ± 1	junij	
97	Skuša	325 ± 5	maj	
126		350 ± 6	junij	
98	Brancin	161 ± 5	maj	
125		182 ± 4	junij	
102	Orada	168 ± 1	maj	
113		198 ± 4	junij	
104	Ovčica	363 ± 10	maj	
128		339 ± 4	junij	
108	Sardela	557 ± 18	maj	
114		544 ± 9	junij	
118	Mečarica / file	452 ± 2	junij	
84	Ugor	417 ± 18	april	
88	Škarpena	343 ± 3	maj	
127		396 ± 19	junij	
95	Postrv / file	169 ± 2	maj	
116		176 ± 4	junij	

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 19: Vsebnost selena v svežih ribah iz istega ribolovnega območja, kupljenih na ljubljanski tržnici v obdobju treh mesecev

Št. vzorca	Vrsta sveže ribe / kos	Vsebnost Se (ng/g)	Čas ulova v letu 2005*	Ribolovno območje
96	Ostriž / file	173 ± 1	maj	FAO 51 in 57
110		85 ± 1	junij	
79	Tuna	782 ± 9	april	FAO 41
103		997 ± 7	maj	
119		461 ± 1	junij	
91	Trilja	377 ± 17	maj	..
129		508 ± 10	junij	
100	Zobatec / file	89 ± 4	maj	..
111		202 ± 7	junij	
85	Hobotnica	112 ± 9	april	..
86	Romb	264 ± 16	april	..

*- čas ulova = čas v katerem je bila riba kupljena; .. ni navedeno ribolovno območje



Slika 12. Shematski prikaz povprečne vsebnosti selena za posamezne vrste svežih rib iz istega ribolovnega območja, kupljenih na ljubljanski tržnici v obdobju treh mesecev

Iz preglednice 19 in slike 12 je razvidno, da se vsebnost selena v 45 vzorcih svežih rib giblje v območju od 85 do 997 ng/g. Večina vzorcev svežih rib (51 %) vsebuje od 200 do 500 ng Se/g. 36 % svežih rib vsebuje manj kot 200 ng Se/g, le 13 % svežih rib pa vsebuje več kot 500 ng Se/g.

Rezultati kažejo dobro ujemanje v vsebnosti selena v svežih ribah iz istih ribolovnih območij, ulovljenih v različnem časovnem obdobju. Najmanjše nihanje v vsebnosti selena je opaziti pri filejih lososa, osliča in postrvi, pri morski žabi, škarpeni, skuši, brancinu in sardeli. Pri trilji, ribonu, ciplju, fileju zobatca in oradi se v primerjavi z mesecem majem, v juniju pojavlja trend povečanja vsebnosti selena. Nasprotno pa je pri slaniku, fileju ostriza in ovčici vsebnost selena v maju nekoliko višja kot v mesecu juniju. Največjo razliko v vsebnosti selena smo dobili pri tuni, saj se giblje od 997 ± 7 ng Se/g v maju do 461 ± 1 ng Se/g v juniju.

Razloge bi zato lahko iskali v sezonskih nihanjih v vsebnosti selena, o katerih so poročali že francoski znanstveniki, ki so proučevali vsebnost selena v mehkužcih v obdobju od februarja do junija (Reilly, 1996). Nihanja pa so lahko tudi posledica biodiverzitete rib, njihovih prehranskih navad in spremenljivih dejavnikov vodnega okolja (Kadrabova in sod., 1997).

Široko območje v vsebnosti selena se lahko pojavi tudi zaradi vzorčenja. Pri večjih ribah, kjer smo imeli na voljo le manjši kos ribje mišičnine (na primer file ali rep) verjetno ne dobimo tako natančnega oziroma reprezentativnega podatka o vsebnosti selena, kot pri manjših ribah, kjer smo uporabili celotno ribjo mišičnino, o čemer poročajo tudi v literaturi (Ihnat, 1989).

4.2.2 Vsebnost selena v enakih ribjih izdelkih različnih lotov istega proizvajalca

V preglednici 20 in na sliki 13 je predstavljena vsebnost selena v ribjih izdelkih različnih lotov, kar pomeni, da so bili izdelki izdelani v različnih časovnih obdobjih in imajo zato različno serijsko številko izdelave. S primerjavo enakih izdelkov z različnim loti smo želeli preveriti, kako niha vsebnost selena v ribjih izdelkih istih proizvajalcev.

Preglednica 20. Vsebnost selena v ribjih izdelkih istih proizvajalcev, različnih lotov

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vsebnost selena (ng/g)	lot	Proizvajalec / država
3	Sardine v rastlinskem olju	1052 ± 45	PA 1	A / Hrvaška
13		649 ± 28	3Z11 0205	
34		876 ± 151	Z09 0205	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	859 (649 – 1052) 3		
6	Koščki tune v rastlinskem olju	707 ± 10	352COE 3D7H9	A / Tajska
14		501 ± 8	352FOE 3D6014	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	604 (501 – 707) 2		
47	Kosi tune v rastlinskem olju	664 ± 30	MM 22 KGO F18BD	D / Tajska
62		753 ± 27	MNI ACOOKA 6ML1L	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	708,5 (664 – 753) 2		
74	Kosi tune v rastlinskem olju	747 ± 8	L/K 351	X / Španija
75		995 ± 15	L/K 349	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	871 (747 – 995) 2		
1	Kosi tune v rastlinskem olju	853 ± 55	L-124-D-04	A / Španija
20		814 ± 10	P0102AA 16C03	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	833,5 (814 – 853) 2		
5	Tuna v olivnem olju	561 ± 15	L4071 N	A / Italija
17		467 ± 15	L4099 B	
28		543 ± 19	L4087	
37		550 ± 56	L4088	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	530,3 (467 – 561) 4		
9	Koščki tune v sončničnem olju	446 ± 14	A071208 B TPMOP	B / Francija
11		386 ± 3	A070521 B TPEOW	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	416 (386 – 446) 2		
16	Tunina v naravnem soku	289 ± 2	B L2479N	A / Italija
43		889 ± 3	C0167511D	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	589 (289 – 889) 2		
65	Koščki tune v naravnem soku	655 ± 69	CNI ASBBKA 6DB1N	D / Tajska
66		539 ± 19	MM 22KCW B2KCD	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	597 (539 – 655) 2		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 20: Vsebnost selena v ribjih izdelkih istih proizvajalcev, različnih lotov

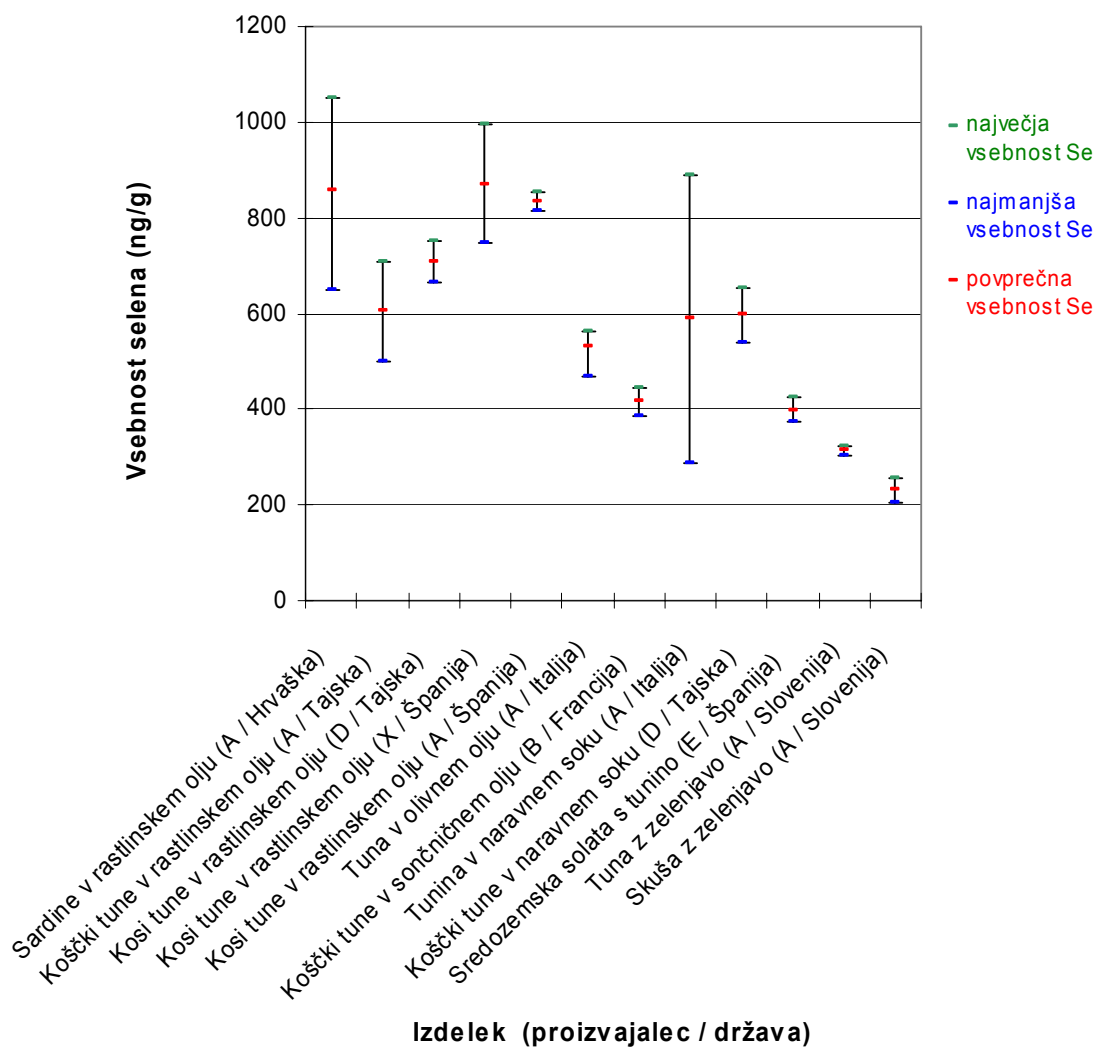
Št. vzorca	Naziv izdelka	Vsebnost selena (ng/g)	lot	Proizvajalec / država
67	Sredozemska solata s tunino	425 ± 9	LK 345	E / Španija
68		372 ± 29	LK 195	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	398,5 (372 – 425) 2		
63	Tuna z zelenjavo	324 ± 3	L040827	A / Slovenija
64		302 ± 20	L041117	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	313 (302 – 324) 2		
55	Skuša z zelenjavo	206 ± 2	L050106	A / Slovenija
56		255 ± 5	L041207	
44		235 ± 4	L040730	
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	232 (206 – 255) 3		

.. ni naveden proizvajalec izdelka

Iz dobljenih rezultatov opazimo nihanje v vsebnosti selena med istimi ribjimi izdelki različnih lotov. Najmanjše nihanje v vsebnosti selena so v ribjem izdelku kosi tune v rastlinskem olju proizvajalca A iz Španije (1 %). Ponovljivi rezultati vsebnosti selena so tudi v ribjih izdelkih proizvajalca A iz Italije. Vsebnosti selena v njihovem izdelku tuna v oljčnem olju so v ozkem območju od 467 do 561 ng Se/g. Zelo ozko območje v vsebnosti selena (od 302 do 324 ng Se/g) opazimo tudi pri tuni z zelenjavo slovenskega proizvajalca A ter v izdelku skuša z zelenjavo (od 206 do 255 ng Se/g) istega proizvajalca. Največja nihanja v vsebnosti selena smo določili pri izdelkih: sardine v rastlinskem olju hrvaškega proizvajalca A, ki se gibljejo v območju od 649 do 1052 ng Se/g, v koščkih tune v rastlinskem olju tajskega proizvajalca A, z vsebnostjo selena, ki se giblje v območju od 501 do 707 ng Se/g, največje nihanje pa smo ugotovili pri tuni v naravnem soku italijanskega proizvajalca A, v območju od 289 do 889 ng Se/g.

Vzroke nihanj lahko pripišemo spremenljivemu naravnemu vodnemu okolju, iz katerega so vodni organizmi od najbolj enostavnega fitoplanktona, pa vse do višjih rib in sesalcev, sposobni absorbirati selen. Selen se v vodi nahaja v raztopljeni obliki, njegovo koncentracijo pa povečujejo morebitna onesnaženja z organskimi odpadki, olji in težkimi kovinami ter raztapljanje s selenom bogatih sedimentov. Ihnat (1989) navaja, da se z raztapljanjem selena lahko poveča vsebnost celokupnega selena v jezerih in morjih od 100 do 20000 krat, kar ima velik vpliv na vodne organizme, v katerih se kopiči selen. Prezem selena s prehranjevanjem je še vedno prevladujoč način prevzema selena, ker se ribe iz višjega trofičnega nivoja hranijo z ribami iz nižjega (v katerih se že kopiči selen) (Hamilton, 2004). Večje vsebnosti selena v ribah so lahko tudi posledica starosti rib. S staranjem imajo ribe vse več receptorjev za selen in ga zato lahko več akumulirajo (Orban in sod., 2002).

Majhna nihanja v vsebnosti selena pri ribah – to dejstvo potrjuje tudi naša raziskava – so posledica nespremenljivega vodnega območja, oziroma le majhnih migracij rib, njihovega nespremenjenega metabolizma in nespremenjenih prehranskih navad (Ihnat, 1989 in Kadrabova in sod., 1997).



Slika 13. Prikaz vsebnosti selena v ribjih izdelkih različnih lotov

4.2.3 Vsebnost selena v enakih ribjih izdelkih različnih proizvajalcev

V preglednici 21 in na sliki 14 je navedena vsebnost selena v enakih ribjih izdelki različnih proizvajalcev. Vidimo, da je vsebnost selena izmerjena v petih vzorcih tune v rastlinskem olju različnih proizvajalcev precej konstantna (751 ± 63 ng/g).

Vzorci skuše z zelenjavo vseh proizvajalcev, so v zelo ozkem območju v vsebnosti selena (od 206 do 357 ng Se/g). Še ožje območje v vsebnosti selena opazimo pri slovenskem proizvajalcu A (od 206 do 255 ng Se/g).

Vsebnosti selena v vzorcih tune v paradižnikovi omaki različnih proizvajalcev so v ozkem območju. Opaziti je ozko območje v vsebnosti selena med francoskima proizvajalcema B in C ($335 - 397$ ng Se/g) in med tajskega proizvajalcema C in D ($606 - 753$ ng Se/g).

Tudi vsebnost selena v vzorcih sardin v rastlinskem olju hrvaških proizvajalcev A, C in D so v ozkem območju od 985 do 1179 ng Se/g.

Pri vsebnosti selena v vzorcih tune v oljčnem olju opazimo večja nihanja med proizvajalci. Povprečna vrednost v sedmih vzorcih je 740 ± 244 ng Se/g. Opazimo široko območje v vsebnosti selena. Najmanj selena ($462 - 467$ ng Se/g) vsebujejo tune v olivnem olju italijanskih proizvajalcev A in B, največ pa tune španskega proizvajalca F (1080 ± 32 ng Se/g).

Široko območje v vsebnosti selena opazimo tudi pri proizvajalcih tune v naravnem soku. Povprečje v petih analiziranih vzorcev je 537 ± 211 ng Se/g. Najmanjšo vsebnost selena v tuni v naravnem soku (289 ± 2 ng/g) najdemo pri proizvajalcu A iz Italije, največjo vsebnost selena pa pri tuni proizvajalca C iz Tajske (830 ± 46 ng/g).

Najširše območje v vsebnosti selena smo določili pri vzorcih sardin v rastlinskem olju različnih proizvajalcev (242 do 1179 ng Se/g). Najmanj selena je bilo v vzorcu francoskega proizvajalca B (242 ± 8 ng Se/g), največ pa v vzorcu hrvaškega proizvajalca D (1179 ± 70 ng Se/g).

Vzorcev tune z dodatki ne moremo med seboj direktno primerjati. Vzorcev se namreč razlikujejo po vrsti dodatkov, ki imajo skupno le-to, da so rastlinskega izvora. Opazimo, da prisotnost različnih dodatkov (čeprav smo jih pred homogeniziranjem odstranili), različno vplivajo na vsebnost selena v vzorcih tune z dodatki. Splošno pa lahko povzamemo, da prisotnost beljakovinsko bogatih dodatkov, kot je grah ter drugih dodatkov, ki vsebujejo večje količine selena, vplivajo na povečanje vsebnosti selena v vzorcu. Visoko vsebnost selena je najbolje opaziti pri vzorcih tune z inčuni in kaprami italijanskega proizvajalca A, ki vsebujejo okrog 901 ± 53 ng Se/g, tuna v naravnem soku istega proizvajalca, pa vsebuje le 289 ± 2 ng Se/g.

Preglednica 21. Vsebnost selena v ribjih izdelkih različnih proizvajalcev

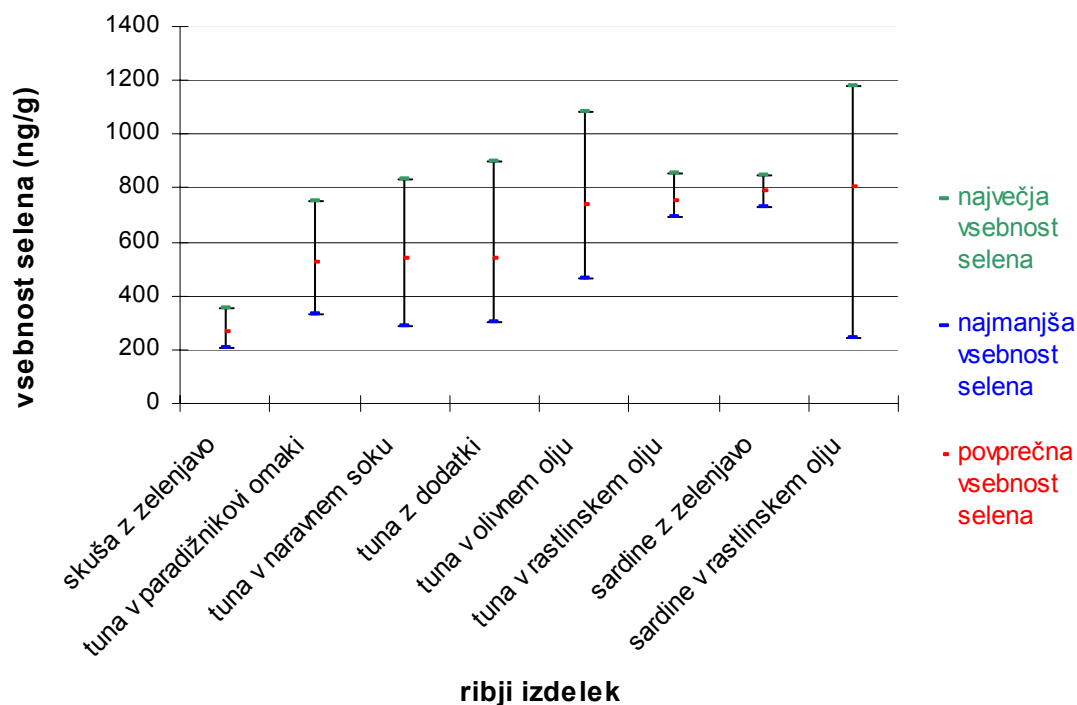
Št. vzorca	Naziv izdelka	Vsebnost selena (ng/g)	Proizvajalec / država
1	Tuna v rastlinskem olju	853 ± 55	A / Španija
6		707 ± 10	A / Tajska
31		693 ± 5	B / Tajska
62		753 ± 27	D / Tajska
74		747 ± 8	X / Španija
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	751 (693 – 853) 5	
17	Tuna v olivnem olju	467 ± 15	A / Italija
19		462 ± 2	B / Italija
21		1080 ± 32	F/ Španija
24		1037 ± 67	C / Tajska
45		700 ± 5	D / Španija
48		695 ± 57	D / Italija
69		736 ± 5	E / Španija
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	740 (462 – 1080) 7	
15	Tuna v naravnem soku	417 ± 33	B / Francija
16		289 ± 2	A/ Italija
23		830 ± 46	C / Tajska
25		496 ± 27	B / Francija
65		655 ± 69	D / Tajska
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	537 (289 – 830) 5	
7	Tuna v paradižnikovi omaki	753 ± 4	A/ Avstralija
8		335 ± 8	B / Francija
10		397 ± 2	B / Španija
52		606 ± 22	D / Tajska
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	523 (335 – 753) 4	
26	Tuna z dodatki ^a	389 ± 13	C / Francija
30		482 ± 27	A / Italija
46		901 ± 53	A / Italija
59		843 ± 7	A / Avstralija
60		478 ± 48	E / Španija
61		554 ± 48	A / Italija
64		302 ± 20	A / Slovenija
68		372 ± 29	E / Španija
73		420 ± 44	X / Tajska
70		632 ± 17	E / Španija
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	537 (302 – 901) 10	
3	Sardine v rastlinskem olju	1052 ± 45	A / Hrvaška
22		242 ± 8	B / Francija
51		985 ± 2	C / Hrvaška
53		682 ± 2	D / Tajska
54		668 ± 1	X / Hrvaška
57		1179 ± 70	D / Hrvaška
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	801 (242 – 1179) 6	
32	Sardine z zelenjavo	733 ± 10	A / Hrvaška
50		850 ± 7	C / Hrvaška
	\bar{x} (območje) št.vzorcev	792 (733 – 850) 2	

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 21: Vsebnost selena v ribjih izdelkih različnih proizvajalcev

Št. vzorca	Naziv izdelka	Vsebnost selena (ng/g)	Proizvajalec / država
4	Skuša z zelenjavo	357 ± 8	C / Francija
56		255 ± 5	A / Slovenija
55		206 ± 2	A / Slovenija
44		235 ± 4	A / Slovenija
\bar{x} (območje) št.vzorcev		263 (206 – 357) 4	

^a – dodatki v vzorcih št. 26: mehiška solata; 30: fižol; 46: inčuni, kapre; 59: mehiška omaka; 60: jerebičja omaka; 61: grah; 64: pikantna omaka; 68: sredozemska solata; 73: čebula, grah, paradižnikova omaka; 70: česen; .. proizvajalec ni naveden



Slika 14. Prikaz vsebnosti selena v enakih ribjih izdelkih različnih proizvajalcev

4.2.4 Vsebnost živega srebra v izbranih ribjih izdelkih

Z ribami in ribjimi izdelki zaužijemo poleg esencialno pomembnega selena tudi živo srebro (Hg). Hg je težka kovina, ki je v povišanih koncentracijah strupena za organizme (Cabañero in sod., 2004). Učinki Hg so odvisni od koncentracije in kemične oblike. Najbolj toksična oblika Hg je metil živo srebro (MeHg), ki v ribah predstavlja okrog 90 % celokupnega Hg (Storelli in sod., 2002). Je zelo stabilna spojina lipofilne narave, s sposobnostjo vezave na proteine z –SH skupinami, kar ji omogoča bioakumulacijo v organizmih in transport skozi prehranjevalno verigo (Storelli in sod., 2002). Po zaužitju se

iz prebavnega trakta hitro absorbira v kri, od koder se razporedi po celem telesu. Kopiči se v možganih, kjer povzroča nevrološke motnje. Izločanje iz organizma poteka zelo počasi 60 – 70 dni (Storelli in sod., 2002).

Vzporedno z našo raziskavo je potekala tudi raziskava o vsebnosti živega srebra v vzorcih istih rib in ribjih izdelkov, ki jo je opravljala Antonija Zajc. Za predstavitev in primerjavo smo izbrali nekatere vzorce, ki so vsebovali visoke vsebnosti obeh elementov: selena in živega srebra (preglednica 22 in slika 15). Natančnejša analiza teh rezultatov bo v diplomu Antonije Zajc.

Preglednica 22. Vsebnost selena in živega srebra v nekaterih ribjih izdelkih najbolj zastopanih proizvajalcev C (Tajska), A (Italija) in E (Španija) na slovenskem tržišču

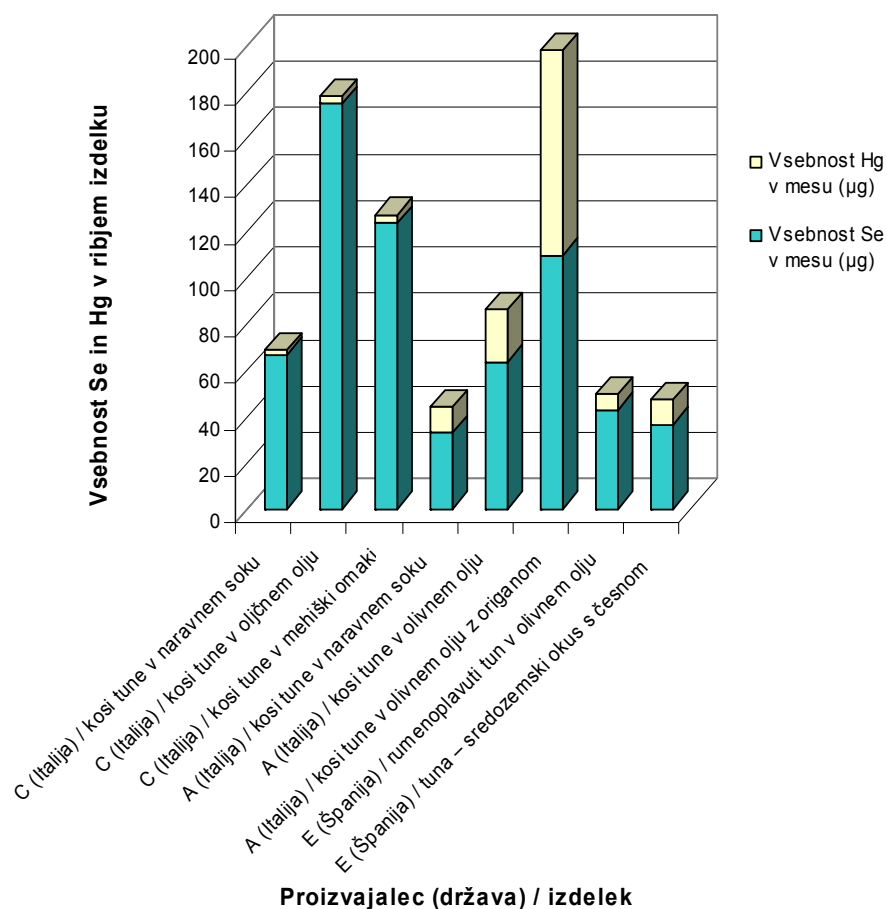
Proizvajalec (država) / izdelek	Masa mesa v konzervi (g)	Vsebnost Se v mesu* (µg)	Vsebnost celokupnega Hg v mesu* (µg)
C (Italija) / kosi tune v naravnem soku	68,0	66,7	2,0
C (Italija) / kosi tune v oljčnem olju	142,8	175,1	3,1
C (Italija) / kosi tune v mehiški omaki	127,0	123,4	3,7
A (Italija) / kosi tune v naravnem soku	69,5	33,2	11,0
A (Italija) / kosi tune v olivnem olju	114,7	63,4	22,9
A (Italija) / kosi tune v olivnem olju z origanom	110,5	109,4	88,4
E (Španija) / rumenoplavuti tun v olivnem olju	49,4	43,0	6,8
E (Španija) / tuna – sredozemski okus s česnom	50,4	36,7	10,8

- ribje meso z odstranjenim dodatkom

Iz preglednice 22 vidimo, da nekateri izdelki tune v naravnem soku vsebujejo večje vsebnosti selena in živega srebra. Še večje vsebnosti obeh elementov pa zasledimo pri enakih izdelkih istih proizvajalcev, z različnimi dodatki. *European Commission Decision* je leta 1993 postavil mejo o vsebnosti celokupnega Hg v ribah, ki ne sme presegati 0,5 µg/g sveže mase. Izjema so določene vrste rib na višjem trofičnem nivoju, ki lahko vsebujejo največ 1 µg Hg/g.

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je istega leta podala priporočila o tolerančnem tedenskem vnosu Hg, ki naj ne bi presegala 0,3 mg celokupnega Hg in 0,2 mg metilnega Hg v prehrani 60 kg težkega človeka (Storelli in sod., 2002). Ameriška agencija za varovanje okolja (EPA – *US Environmental Protection Agency*) pa je leta 1996 objavila priporočila, po katerih je dovoljen privzem 0,1 µg MeHg/kg telesne teže na dan (Storelli in sod., 2002).

Vsebnost Hg v vzorcih iz naše raziskave ne presegajo 1 µg Hg/g.



Slika 15. Pregled vsebnosti selena in živega srebra v ribjih izdelkih najbolj zastopanih proizvajalcev C (Tajska), A (Italija) in E (Španija) na slovenskem tržišču

4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV Z LITERATURO

Ribe in ribji izdelki so poleg mesa, mlečnih izdelkov, žit, sadja in zelenjave zelo pomembno hranilo. Zaradi svoje pestre beljakovinske sestave, vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin in vsebnosti pomembnih mikroelementov, so bile ribe in ribji izdelki zelo primerno hranilo, deležno prehranskih raziskav že vrsto let. S preiskovanjem vsebnosti elementov v ribah in ribjih izdelkih, še posebej pa z raziskavami selena, so se ukvarjali mnogi znanstveniki iz mnogih držav, kot so: Brazilija, Kitajska, Španija, Portugalska, Hrvaška in druge.

Naša raziskava o vsebnosti selena v ribah in ribjih izdelkih je bila precej obsežna, saj smo selen določali v 52 vzorcih svežih rib in v 77 vzorcih ribjih izdelkov. V preglednici 23 so podane vsebnosti selena v vzorcih iz naše raziskave in podatki iz literature.

Preglednica 23. Vsebnost selena v ribah in ribjih izdelkih iz naše raziskave in podatki iz literature

Vrsta ribe / ribjega izdelka	Naša raziskava	Literaturni podatki		
	Vsebnost selena (ng/g)*	Vsebnost selena (ng/g)*	Metoda	Vir
Losos	180 ± 3 (2) {178 – 182}	600 ± 212	/	Ihnat (1989)
		80	fluorometrija	Yoshida in sod. (2002)
Slanik	383 ± 29 (2) {362 – 404}	310 ± 85 (3) {250 – 420}	fluorometrija	
Skuša	338 ± 29 (2) {325 – 350}	881 ± 17	fluorometrija	Sirichakwal (2004)
		240 ± 35 (3) {220 – 270}	fluorometrija	Yoshida in sod. (2002)
Hobotnica	112 ± 9 (1)	590 ± 20	CV-AFS in HG-AFS	Cabañero in sod. (2004)
		380 ± 60	HG-AAS	Wyatt in sod. (2004)
Mečarica	452 ± 2 (1)	2090 ± 40	CV-AFS in HG-AFS	Cabañero in sod. (2004)
		960 ± 40	HG-AFS	
Tuna	510 ± 6 (3) {461 – 997}	2320 ± 30	CV-AFS in HG-AFS	
		1570 ± 60	HG-AFS	
		734 ± 397	HG-AAS	Plessi in sod. (2001)
Konzervirana tuna	631 ± 188 (18) {289 – 995}	480 ± 260 (4) {160 – 770}	fluorometrija	Yoshida in sod. (2002)
		730 ± 360	/	Ihnat (1989)
Konzervirane sardine	859 ± 202 (3) {649 – 1052}	859 ± 102	HG-AAS	Klapec in sod. (2003)
		571 ± 22	HG-AAS	

- povprečna vrednost ± SD, (št. vzorcev), {območje}; / – ni navedena metoda določanja selena v vzorcu

Iz preglednice 23 vidimo, da so naši rezultati v istem območju kot literaturni podatki. Opazimo, da je vsebnost selena v nekaterih vzorcih v naši raziskavi nižja kot jo navajajo literaturni podatki. Wyatt in sod. (1996) pojasnjujejo, da so velika nihanja v vsebnosti selena v ribah posledica različnih območij ulova rib in različnih vrst rib, z različnimi prehranskimi navadami in različnim metabolizmom. Naši rezultati tako kažejo na to, da so se ulovljene ribe nahajale v vodnem okolju z nizkimi koncentracijami selena, kar je vzrok manjšemu akumuliranju selena v ribah in ostalih vodnih organizmih, o čemer poročajo tudi v literaturi (Horvat in sod., 2003).

Reilly (2002) navaja, da so ribe, ki vsebujejo 0,05 – 0,54 mg Se/kg, poleg mesa z 0,05 – 1,33 mg Se/kg, najbogatejši vir selena. Tudi Smrkolj (2004) v svoji študiji o vsebnosti

selena v izbranih slovenskih živilih navaja, da visokoproteinska hrana predstavlja bogat vir selena. To velja predvsem za drobovino in ribe, ki vsebujejo 0,4 – 1,5 mg Se/kg in s tem predstavljajo živilo z največjo vsebnostjo selena. Podobne rezultate o vsebnosti selena v ribah je določil tudi Tinggi (2003). V petih vzorcih morskih rib, kupljenih na tržišču (vrste rib ne navaja), je določil 0,3 – 0,7 mg Se/kg, s povprečno vrednostjo 0,45 mg Se/kg. Hamilton (2003) pa opozarja, da koncentracije selena v ribah, ki presegajo 4 mg/kg že lahko povzročajo toksične učinke na ribe.

V naši raziskavi se vsebnost selena v svežih ribah gibljejo od 0,08 – 1,00 mg Se/kg, v konzerviranih ribah, oziroma v ribjih izdelkih pa od 0,2 – 1,2 mg Se/kg, kar je primerljivo s podatki iz literature. Primerljivi so tudi podatki o povprečni vsebnosti selena v ribah iz nekaterih držav (Wyatt in sod., 1996) z našo raziskavo (preglednica 24).

Preglednica 24. Povprečna vsebnost selena v ribah iz nekaterih držav (Wyatt in sod., 1996), v primerjavi z rezultati naše raziskave

Država	Povprečna vsebnost selena v ribah ($\mu\text{g/g}$)
Anglija	0,32
Belgija	0,25
ZDA	0,53
Francija	0,20
Sonora, Mehika	0,90
Slovenija*	$0,31 \pm 0,2$ (52)

- povprečna vsebnost selena v svežih ribah, kupljenih na slovenskem tržišču \pm SD (število vseh vzorcev svežih rib)

Iz preglednice 24 vidimo, da ribe, kupljene na slovenskem tržišču vsebujejo primerljive vsebnosti selena z vsebnostjo selena v ribah drugod po svetu.

Nekateri znanstveniki so proučevali vsebnost selena v rastlinojedih in mesojedih vrstah rib. Kehrig in sod. (2004) poročajo o tem, da so prisotne večje vsebnosti selena v mesojedih ribah kot v ribah, ki se hranijo le s planktonom in rastlinami. Mesojede vrste vsebujejo 0,12 – 1,25 mg Se/kg, nemesojede pa 0,02 – 0,18 mg Se/kg. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Souza Lima in sod. (2004), ki so na podlagi raziskave 10 vzorcev rib iz Brazilije določili povprečno vsebnost selena v mesojedih vrstah: 0,19 – 1,14 mg Se/kg ter v nemesojedih: 0,10 – 1,19 mg Se/kg.

Mehkužci so vir selena. Zelo raziskane so školjke, od katerih so v ostrigah določili 0,29 mg Se/kg (Sirichakwal, 2004), 0,57 mg Se/kg (Ihnat, 1989), 0,48 mg Se/kg (Wyatt in sod., 2004) in 0,36 mg Se/kg (Reilly, 1996). V naši raziskavi smo določali vsebnost selena le v dveh mehkužcih, in sicer v hobotnici in v lignjih, pri katerih smo določili 421 ± 8 ng Se/g, kar je primerljiv rezultat z raziskavo Sirichakwala (2004), ki je v lignjih določil 461 ± 11 ng Se/g.

Vsebnost selena so dobro proučili tudi na rakih, pri katerih se vsebnosti selena gibljejo od 0,28 mg Se/kg (Ihnat, 1989) in 0,30 mg Se/kg (Reilly, 1996) ter 0,46 mg Se/kg

(Sirichakwal, 2004), pa do 0,53 mg Se/g (Wyatt in sod., 2004). V naši raziskavi rakov nismo analizirali.

4.4 OCENA VNOSA SELENA Z RIBAMI IN RIBJIMI IZDELKI

Nutricionisti in proizvajalci ribjih izdelkov s članki v strokovnih revijah, časopisih in dnevnikih vedno bolj poudarjajo, kako pomembno je uživanje morske hrane. Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti vsebnost selena v svežih ribah, ulovljenih v različnem časovnem obdobju in v ribjih izdelkih različnih lotov, kupljenih na slovenskem tržišču ter nato oceniti dnevni vnos selena z ribami in ribjimi izdelki. Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004) priporočajo vnos 30 – 70 µg selena/dan, kar je sprejeto tudi v Sloveniji. V naši raziskavi smo za priporočen vnos selena vzeli srednjo vrednost 50 µg selena/dan, ki je hkrati blizu priporočene vrednosti 55 µg selena/dan Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) (DRI, 2000; FAO/WHO, 2001).

Iz dobljenih rezultatov lahko potrdimo, da so ribe in ribji izdelki živilo, bogato s selenom, kot so o tem poročali že mnogi znanstveniki. V preglednici 25 in sliki 16 prikazujemo, koliko selena zaužijemo z jedilno porcijo – to je 100 g in kolikšen delež dnevnih potreb po selenu s tem pokrijemo.

Preglednica 25. Delež vnosa selena z jedilno porcijo svežih rib (100 g) glede na dnevni vnos 50 µg

Vrsta sveže ribe / kos	Vsebnost selena v jedilni porciji ribjega mesa* (µg/100 g)	Delež vnosa selena z jedilno porcijo rib glede na dnevni vnos 50 µg** (%)
Losos – file	18 (3)	36
List – file	15 (3)	30
Oslič – file	30 (5)	60
Cipelj	15 (2)	30
Postrv – file	17 (3)	34
Brancin	17 (2)	34
Zobatec – file	15 (2)	30
Orada	19 (4)	38
Hobotnica	11 (1)	22
Romb	26 (1)	52
Ostriž – file	13 (2)	26
Škarpena	40 (2)	80
Trilja	44 (2)	88
Ribon	34 (2)	68
Slanik	38 (2)	76
Morska žaba – rep	37 (2)	74

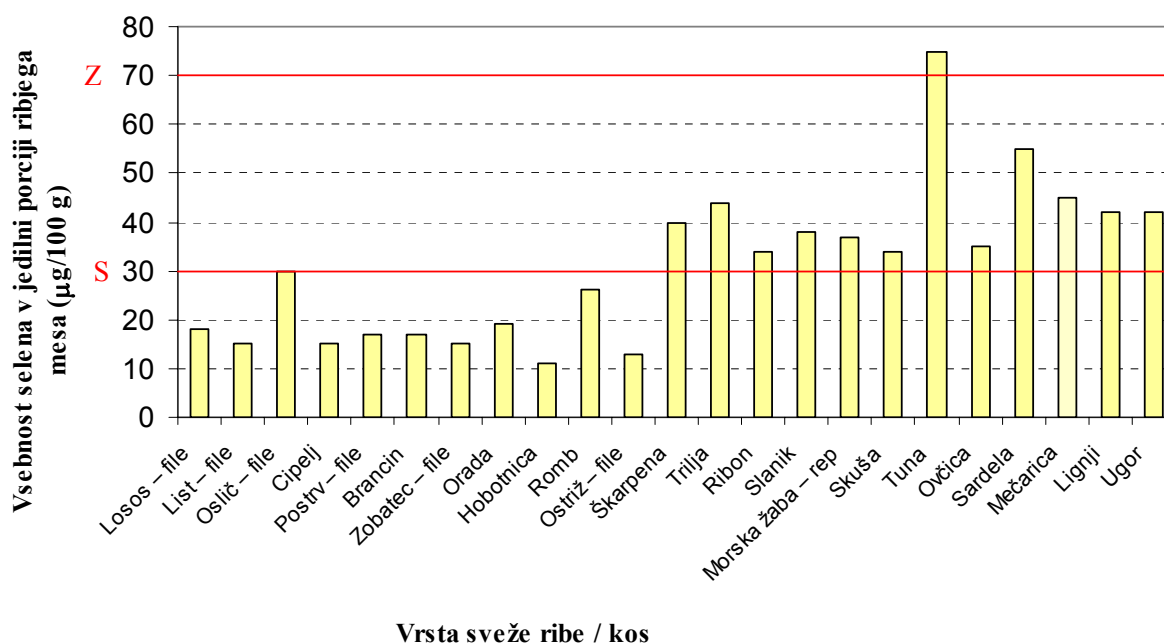
se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 25: Delež vnosa selena z jedilno porcijo svežih rib (100 g) glede na dnevni vnos 50 μg

Vrsta sveže ribe / kos	Vsebnost selena v jedilni porciji ribjega mesa* ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	Delež vnosa selena z jedilno porcijo rib glede na dnevni vnos 50 μg ** (%)
Skuša	34 (2)	68
Tuna	75 (3)	150
Ovčica	35 (2)	70
Sardela	55 (2)	110
Mečarica	45 (1)	90
Lignji	42 (1)	84
Ugor	42 (1)	84

* - povprečna vsebnost selena v ribah, ulovljenih v različnem časovnem obdobju (število vzorcev);

** - po Referenčnih vrednostih za vnos hranil (2004) je priporočen dnevni vnos selena v intervalu od 30 do 70 μg



Legenda: *Po Referenčnih vrednostih za vnos hranil (2004) je priporočen dnevni vnos za Se v intervalu od 30 do 70 μg , ki ga ponazarjata črki S in Z.*

Slika 16. Vnos selena z jedilno porcijo svežih rib (100 g) glede na priporočen dnevni vnos 30 - 70 μg

Z zaužitjem jedilne porcije svežih rib, kot so morska žaba, škarpena, trilja, ribon, ovčica, slanik, skuša, lignji, ugor, še posebej pa tuna, sardela in mečarica, že zadostimo dnevnim

potrebam po selenu (70 – 150 %) (preglednica 25 in slika 16). Z zaužitjem jedilne porcije lososa, lista, osliča, ciplja, postrvi, brancina, zobatca, orade, hobotnice, ostriza ali romba pa zadostimo le 22 – 60 % dnevnih potreb po selenu.

Analize ribjih izdelkov so pokazale visoke vsebnosti selena, višje kot v svežih ribah. Ribjim izdelkom smo dodatke odstranili in zanemarili njihov vpliv na povečanje vsebnosti selena, saj je vsebnost selena v oljčnem in rastlinskem olju zanemarljiva (Souci in sod., 2000). Rezultate o vsebnosti selena v ribjih izdelkih, z odstranjenim dodatkom in vnos selena z zaužitjem ribje konzerve, namenjene za en obrok za eno osebo, glede na priporočen dnevni vnos 30 - 70 µg, prikazujemo v preglednici 26 in sliki 17.

Preglednica 26. Delež vnosa selena z ribjo konzervo glede na dnevni vnos 50 µg

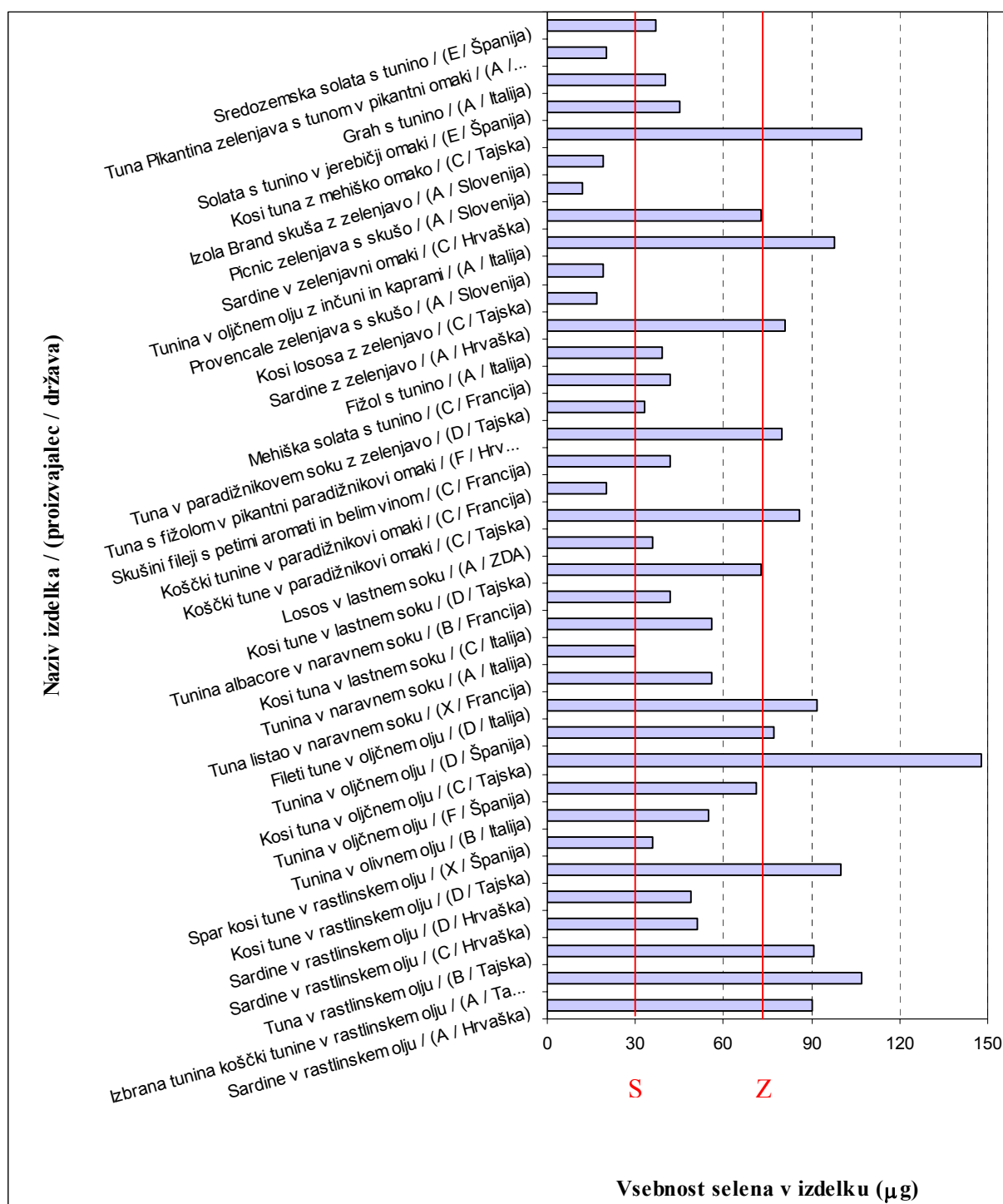
Št. vzorca	Naziv izdelka / (proizvajalec / država)	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Vsebnost selena v izdelku* (µg)	Delež vnosa Se z zaužitjem konzerve glede na dnevni vnos 50 µg** (%)
1	Tuna, kosi tunov v rastlinskem olju / (A / Španija)	80	58,3	50	100
3	Sardine v rastlinskem olju / (A / Hrvaška)	115	85,5	90	180
6	Izbrana tunina koščki tunine v rastlinskem olju / (A / Tajska)	185	150,9	107	214
12	Zviti slani fileti inčunov v rastlinskem olju / (X / Španija)	50	31,9	8	16
22	Sardine v rastlinskem olju / (B / Francija)	69	49,6	12	24
31	Tuna v rastlinskem olju / (B / Tajska)	185	131,1	91	181
51	Sardine v rastlinskem olju / (C / Hrvaška)	115	51,7	51	102
53	Sardine v rastlinskem olju / (D / Tajska)	125	71,9	49	98
54	Spar sardine v rastlinskem olju / (X / Hrvaška)	125	94,1	63	126
57	Sardine v rastlinskem olju / (D / Hrvaška)	125	86,5	102	204
62	Kosi tune v rastlinskem olju / (D / Tajska)	185	132,2	100	200
74	Spar kosi tune v rastlinskem olju / (X / Španija)	80	48,1	36	72
17	Tuna v olivnem olju / (A / Italija)	160	114,7	54	108
19	Tunina v olivnem olju / (B / Italija)	160	118,0	55	110
21	Tunina v oljčnem olju / (F / Španija)	80	66,0	71	142
24	Kosi tuna v oljčnem olju / (C / Tajska)	185	142,8	148	296
45	Tunina v oljčnem olju / (D / Španija)	160	109,8	77	154
69	Rumenoplavuti tun v olivnem olju / (E / Španija)	80	49,4	36	72
48	Fileti tune v oljčnem olju / (D / Italija)	200	132,4	92	184
48	Fileti tune v oljčnem olju / (D / Italija)	200	132,4	92	184
70	Tunina v oljčnem olju, sredozemski okus s česnom / (E / Španija)	80	50,4	32	64
16	Tunina v naravnem soku / (A / Italija)	160	102,7	30	60
15	Tuna listao v naravnem soku / (X / Francija)	185	134,1	56	112
23	Kosi tuna v lastnem soku / (C / Italija)	95	68,0	56	112

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 26: Delež vnosa selena z ribjo konzervo glede na dnevni vnos 50 μg

Št. vzorca	Naziv izdelka / (proizvajalec / država)	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Vsebnost selena v izdelku* (μg)	Delež vnosa Se z zaužitjem konzerve glede na dnevni vnos 50 μg ** (%)
25	Tunina albacore v naravnem soku / (B / Francija)	139	84,8	42	84
65	Kosi tune v lastnem soku / (D / Tajska)	185	112,1	73	146
72	Losos v lastnem soku / (A / ZDA)	170	126,9	36	72
7	Koščki tune v paradižnikovi omaki / (C / Tajska)	185	149,4	86	172
8	Koščki tunine v paradižnikovi omaki / (C / Francija)	80	59,6	20	40
10	Skušini fileji s petimi aromati in belim vinom / (C / Francija)	160	104,8	42	84
52	Tuna s fižolom v pikantni paradižnikovi omaki / (F / Hrvaška)	185	132,5	80	160
58	Tuna v paradižnikovem soku z zelenjavo / (D / Tajska)	200	107,2	33	66
4	Skušini fileji s petimi aromati in belim vinom / (C / Francija)	176	77,5	28	56
26	Mehiška solata s tunino / (C / Francija)	280	107,4	42	84
30	Fižol s tunino / (A / Italija)	160	80,6	39	78
32	Sardine z zelenjavo / (A / Hrvaška)	115	73,8	81	162
38	Kosi lososa z zelenjavo / (C / Tajska)	100	73,2	17	34
44	Provincale zelenjava s skušo / (A / Slovenija)	125	82,7	19	38
46	Tunina v oljčnem olju z inčuni in kaprami / (A / Italija)	160	108,8	98	196
50	Sardine v zelenjavni omaki / (C / Hrvaška)	115	85,4	73	146
55	Picnic zelenjava s skušo / (A / Slovenija)	125	56,6	12	24
56	Izola Brand skuša z zelenjavo / (A / Slovenija)	125	73,6	19	38
59	Kosi tuna z mehiško omako / (C / Tajska)	185	126,9	107	214
60	Solata s tunino v jerebičji omaki / (E / Španija)	150	93,5	45	90
61	Grah s tunino / (A / Italija)	160	71,4	40	80
64	Tuna Pikantina zelenjava s tunom v pikantni omaki / (A / Slovenija)	150	67,7	20	40
68	Sredozemska solata s tunino / (E / Španija)	150	100,8	37	74
73	Spar koščki tune s čebulo, grahom in paradižnikovo omako / (X / Tajska)	185	126,2	53	106

* - ribje meso z odstranjenim dodatkom;** - po Referenčnih vrednostih za vnos hranil (2004) je priporočen dnevni vnos selena v intervalu od 30 do 70 μg ; ... - ni naveden proizvajalec



Legenda: *Po Referenčnih vrednostih za vnos hranil (2004) je priporočen dnevni vnos za Se v intervalu od 30 do 70 µg, ki ga ponazarjata črki S in Z.*

Slika 17. Vnos selena z zaužitjem konzerve glede na priporočen dnevni vnos 30 - 70 µg

Z našo raziskavo smo določili, da je kar 83,3 % ribjih konzerv takih, ki vsebujejo več kot 30 μg Se v konzervi, torej zadostno količino za pokritje priporočenih dnevnih potreb po selenu, ob zaužitju celotne konzerve. Le 16,7 % ribjih konzerv pa je takih, ki vsebujejo manj kot 30 μg Se v konzervi in zato pokrijejo največ 60 % dnevnih potreb po selenu.

5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Metoda z razkrojem vzorcev s H_2SO_4 , HNO_3 , H_2O_2 in detekcija s HG-AFS je primerna za določanje selena v ribah in ribjih izdelkih.
 - Razkroj je potekal čez noč pri $80\text{ }^\circ\text{C}$ in nato 1 uro pri $130\text{ }^\circ\text{C}$ v zaprtih teflonskih posodah. Izkoristek postopka za določanje selena v vzorcih rib in ribjih izdelkov je znašal $98,9 \pm 7,5\%$ ($n = 18$).
 - Pravilnost metode smo preverjali z uporabo ustreznih standardnih referenčnih materialov in dobili dobro ujemanje s certificiranimi vrednostmi.
 - Vrednosti, ki smo jih dobili z umeritveno krivuljo, se ujemajo z vrednostmi, dobljenimi z metodo standardnega dodatka, zato se za rutinsko delo lahko uporablja umeritvena krivulja, ker je ta tehnika hitrejša in preprostejša.
 - Postopki so ponovljivi, saj je večina relativnih standardnih odklikov manj kot 10% .
 - Obnovljivost postopka za določanje selena v standardnem referenčnem materialu Dogfish Muscle, DORM 1 je v obdobju treh mesecev znašala 3% (RSD_R), v standardnem referenčnem materialu Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2 pa $4,2\%$ (RSD_R).
 - Ves postopek od razkroja do določitve je potekal v isti teflonski posodi in sočasno smo lahko analizirali 10 vzorcev.
 - Dobili smo tudi dobro ujemanje z rezultati, dobljenimi z neodvisno metodo RNAA.
 - Določitev selena z metodo HG-AFS (po predhodnem razkroju vzorcev rib in ribjih izdelkov) je enostavna, občutljiva, hitra, pravilna, natančna in relativno poceni ter primerna za uporabo v prehranskih in okoljskih študijah.
- Določali smo vsebnost selena v ribah in ribjih izdelkih, kupljenih na slovenskem tržišču. Vsebnosti selena v ribah so bile v območju od $100 - 1150\text{ ng Se/g}$, v ribjih izdelkih (mesu) pa v območju od $200 - 1200\text{ ng Se/g}$. Rezultati so primerljivi s podatki iz literature. Večja odstopanja od podatkov iz literature so vidna le pri posameznih vrstah rib, kar je posledica spremenljivega vodnega okolja, drugačnih ribolovnih območij, metabolizma rib in njihove sposobnosti akumuliranja selena, prehranskih navad rib in njihove starosti.
- Varen in zadosten dnevni vnos za selen pri odraslem človeku znaša od $30 - 70\text{ }\mu\text{g}$ (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004). Ker so ribe živile z visoko vsebnostjo selena, kar smo določili tudi z našo raziskavo, je priporočljivo zmerno uživanje rib in ribjih izdelkov. Za doseg priporočenega dnevnega vnosa selena, zadostuje že jedilna porcija tune, sardele ali mečarice ali skoraj katerekoli ribje konzerve kupljene na slovenskem tržišču.

6 POVZETEK

Selen je za žive organizme esencialen element, ker je že v sledovih potreben za življenjske procese. Njegov primarni vir je hrana, zato je pomembno, da spremljamo njegovo vsebnost v živilih. Vsebnosti selena so nizke, običajno manj kot $\mu\text{g/g}$ živila.

Določanje selena v živilih kljub številnim razvitim metodam še vedno povzroča težave. Vzorci živil zaradi svoje sestave, ki je kombinacija organskih in anorganskih komponent, zahtevajo bolj kompleksen proces razgradnje. Za določanje selena je zaradi hlapnosti selenovih spojin primeren moker razkroj v zaprti posodi. Organski del vzorca se razkroji z uporabo mešanic kislin in vodikovega peroksida. Za detekcijo selena se uporabljajo fluorimetrična metoda, atomska absorpcijska spektrometrija s hidridno tehniko (HG-AAS) in v zadnjem času atomska fluorescenčna spektrometrija s hidridno tehniko (HG-AFS).

Namen našega dela je bil uporabiti hiter in enostaven postopek za določanje celotne vsebnosti selena v ribah in ribjih izdelkih z metodo HG-AFS. Na podlagi dobljenih rezultatov pa oceniti dnevni vnos selena z ribami in ribjimi izdelki. Za razkroj vzorcev smo uporabili razkrojno mešanico $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2\text{-V}_2\text{O}_5$. Pravilnost metode smo preverjali z uporabo ustreznih standardnih referenčnih materialov (Dogfish Muscle, DORM 1 in Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals, TORT 2), ki sta po naravi vzorca najbližja našim vzorcem. Rezultate smo preverjali z rezultati neodvisne metode (RNAA). Obnovljivost določanja selena v vzorcih rib in ribjih izdelkov je bila pod 5 %. Povprečen izkoristek postopka je bil 98,9 %. Celoten postopek poteka v isti teflonski posodi in ugotovili smo dobro ujemanje rezultatov dobljenih z umeritveno krivuljo in z metodo standardnega dodatka. Meja zaznavnosti metode je nizka (0,04 ng Se/g raztopine), analiza pa enostavna, hitra in relativno poceni.

Določili smo vsebnost selena v vzorcih svežih rib in ribjih izdelkov, kupljenih na slovenskem tržišču. Vsebnosti selena v dvainpetdesetih vzorcih svežih rib so bile v območju od 8,5 do 99,7 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, v šestinsedemdesetih vzorcih ribjih izdelkov pa v območju od 20,6 do 117,9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Vsebnosti selena v ribah in ribjih izdelkih so bile v enakem koncentracijskem območju kot podatki iz literature. Ocenili smo, da z jedilno porcijo (100 g) svežih rib vnesemo 22 - 150 %, z jedilno porcijo ribjih izdelkov pa 16 - 296 % priporočene dnevne količine selena.

7 VIRI

- Atkins J.F., Gesteland F. 2000. The twenty-first amino acid. *Nature*, 407: 463-465.
- Behne D., Kyriakopoulos A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annual Review of Nutrition*, 21: 453-473.
- Bezur L. 1998. Analytical performance of arsenic and selenium boosted hollow cathode lamps. *Microchemical Journal*, 59: 107-116.
- Cabañero A.I., Madrid Y., Cámara C. 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta*, 526: 51-61.
- Cabañero A.I., Carvalho C., Madrid Y., Batoréu C., Cámara C. 2004. Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biological Trace Element Research*, 103: 17-35.
- Chen C., Zhao J., Yu H., Zhang P., Li B., X L., Chai Z., Qu L. 2004. Study on the roles of serum selenoproteins upon Hg toxicity in chronic mercury mine workers. *RMZ-Materials and Geoenvironment. Revija za rudarstvo, metalurgijo in geologijo*, 51: 373-376.
- Combs G.F., Combs S.B. 1986. The role of selenium in nutrition. Orlando, San Diego, New York, Academic Press: 453 str.
- Dedina J. 1995. Hydride generation atomic absorption spectrometry. Chichester, New York, Brisbane, John Wiley & Sons: 526 str.
- Dermelj M., Hancman G., Gosar A., Byrne A.R., Kosta L., 1985. Application of 4-nitro-o-phenylenediamine as a reagent for radiochemical separation of selenium. *Vestnik slovenskega kemijskega društva*, 32: 127-135.
- Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids: a report of the panel on dietary antioxidants and related compounds, subcommittees on upper reference levels of nutrients and of interpretation and use of dietary reference intakes, and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes, food and nutrition board. 2000. Washington, D.C., National Academy Press: 284-319.
- Selenium. 2002. V: Human vitamin and mineral requirements: Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand. Rome, Food and agriculture organization/ World health organization: 235-255.
<http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e00.htm>
- Farrant T.J. 1997. Practical statistics for the analytical scientists. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 96 str.
- Foster L.H., Sumar S. 1997. Selenium in health and disease: a review. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, 37, 3: 211-228.

Goenaga-Infante H., Sargent M. 2005. Understanding the role of selenium in health: identification and measurement of selenium compounds in dietary supplements. *Vam – Valid Analytical Measurement Bulletin*: 8-12.

http://www.vam.org.uk/news/news_bulletin_item.asp?intNewsItemID=396

Hamilton S.J. 2003. Review of residue-based selenium toxicity thresholds for freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 2: 201-210.

Hamilton S.J. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326, 1-3: 1-31.

Hill S.J., Dawson J.B., Price W.J., Shuttler I.J., Smith C.M.M., Tyson J.F. 1999. Advances in atomic absorption and fluorescence spectrometry and related techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14: 1245-1285.

Hilton J.W., Hodson P.V., Slinger S.J. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Nutrition*, 110: 2527-2535.

Hoening M., Kersabiec A.M. 1996. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. *Spectrochimica Acta*, 51: 1297-1307.

Horvat M., Nolde N., Fajon V., Jereb V., Logar M., Lojen S., Jačimović R., Falnoga I., Liya Q., Faganeli J., Drobne D. 2003. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. *Science of the Total Environment*, 304, 1-3: 231-256.

Ihnat I. 1989. Occurrence and distribution of selenium. Boca Raton, CRC Press: 110-115 str.

Kabata Pendias A. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rded. Boca Raton, Florida, CRC Press: 313 str.

Kadřabová J., Madaric A., Ginter E. 1997. The selenium content of selected food from the Slovak Republic. *Food Chemistry*, 58, 1-2: 29-32.

Kehrig H., Seixas T.G., Brito J.L., Baeta A., Moreira I., Malm O. 2004. Relation between mercury, monomethylmercury and selenium in the muscle of coastal Brazilian fishes. *RMZ-Materials and Geoenvironment. Revija za rudarstvo, metalurgijo in geologijo*, 51: 1107-1110.

Klapec T., Mandić M.L., Grgić J., Primorac Lj., Perl A., Krstanović V. 2003. Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. *Food Chemistry*, 85: 445-452.

Lemly A.D. 1993. Guidelines for evaluating selenium data from aquatic monitoring and assessment studies. *Environmental Monitoring and Assessment*, 28: 83-100.

Lemly A.D. 1997. Ecosystem recovery following selenium contamination in a freshwater reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36: 275-281.

Lemly A.D. 1999. Selenium impacts on fish: an insidious time bomb. *Human and Ecological Risk Assessment*, 5: 1139-1151.

Lemly A.D. 2001. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. *Aquatic Toxicology*, 57, 1-2: 39-49.

Marin M. 2005. Vpliv sezone ulova na lipidno sestavo in senzorično kakovost jadranske sardele (*Sardina pilchardus*). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-4.

Mazej D. 2002. Določanje selena in njegove porazdelitve v bioloških vzorcih z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije. Magistrsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 97 str.

McNaughton S.A., Marks G.C. 2002. Selenium content of Australian foods: a review of literature values. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 169-182.

Naglič M. 2005. Kopičenje živega srebra v tkivih izbranih ribjih vrst v reki Idrijci. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 43 str.

Navarro-Alarcon M., Lopez-Martinez M.C. 2000. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Science of the Total Environment*, 249: 347-371.

Orban E., Lena G. di, Nevigato T., Casini I., Santaroni G., Marzetti A., Caproni R. 2002. Quality characteristics of sea bass intensively reared and from lagoon as affected by growth conditions and the aquatic environment. *Journal of Food Science*, 67, 2: 542-546.

Palace V.P., Spallholz J.E., Holm J., Wautier K., Evans R.E., Baron C.L. 2003. Metabolism of selenomethionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos can generate oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 17-21.

Plessi M., Bertelli D., Monzani A. 2001. Mercury and selenium content in selected seafood. *Journal of Food Composition & Analysis*, 14, 5: 461-467.

Pokorn D., Gregorič B., Poklar T., Eržen T. 1991. Ocena prehrane v domovih za starejše občane v Ljubljani. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 57: 259-271.

Pokorn D., Stibilj V., Gregorič B., Dermelj M., Štupar J. 1998. Elemental composition (Ca, Mg, Mn, Cu, Cr, Zn, Se, and I) of daily diet samples from some old people's homes in Slovenia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 11: 47-53.

Pyrzynska K. 2002. Determination of selenium species in environmental samples. *Microchimica Acta*, 140: 55-62.

Ratkovska B., Marzec Z., Stibilj V., Wojtasik A., Kunachowicz H. 2003. Assessment of selenium content in diets using two analytical methods-comparative studies. Unpublished results, Warszawa, Food Institute: 9 str.

Recommended dietary allowances. 1989. 10th ed. Washington, D.C., National Academy Press: 217-224.

Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izdaja. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 177-181.

Reilly C. 1996. Selenium in food and health. London, Weinheim, New York, Blackie Academic & Professional: 228-233.

Reilly C. 2002. Metal contamination of food: Its significance for food quality and human health. 3rd ed. Oxford, Blackwell Science: 204-215.

Sabe R., Rubio R., Garcia-Beltran L. 2001. Selenium determination in urine with atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 436: 215-221.

Schrauzer G.N. 1998. Selen-Neue Entwicklungen aus Biologie, Biochemie und Medizin. Heidelberg, Leipzig, Johann Ambrosius Barth Verlag: 231 str.

Selenium in nutrition. 1983. Washington, National Academy Press: 174 str.

Sirichakwal P.P., Puwastien P., Polngam J., Kongkachuichai R. 2004. Selenium content of Thai foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 1: 47-59.

Skoog D.A., West D.M., Holler F.J. 1988. Fundamentals of analytical chemistry. 5th ed. New York, Chicago, San Francisco, Saunders College Publishing: 39-43.

Smrkolj P. 2003. Ugotavljanje selena in njegove porazdelitve v izbranih živilih z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103 str.

Smrkolj P., Pograjc L., Hlastan-Ribič C., Stibilj V. 2004. Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*, 50: 691-697.

Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 2000. Food composition and nutrition tables. 6th ed. Stuttgart, Boca Raton, CRC Press: 181-181.

Souza Lima A.P., Souza Sarkis J.E., Shihomatsu M.H., Sarkis Müller R.C. 2004. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Pará State, Brazil. *Environmental Research*, 97: 236-244.

Spiegel M.R., Stephens L.J. 1989. Theory and problems of statistics. 3rd ed. New York, St. Louis, San Francisco, McGraw-Hill: 470-482.

Stibilj V., Dermelj M., Byrne A.R. 1996. Determination of selenium in biological materials by means of RNAA and comparison of spectrophotometric and ^{81m}Se radiotracer recovery. *Microchimica Acta*, 123: 311-315.

Stibilj V., Smrkolj P., Krbavčič A. 2005. Investigation of the declared value of selenium in food supplements by HG-AFS. *Microchimica Acta*, 150: 325-327.

Storelli M.M., Stuffer G., Marcotrigiano G.O. 2002. Total and methylmercury residues in tuna-fish from the Mediterranean sea. *Food Additives and Contaminants*, 19, 8: 715-720.

Sunde R.A. 1984. The biochemistry of selenoproteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61: 1891-1900.

Suzuki K.T. 2005. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science*, 51: 107-114.

Tinggi U. 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*, 137: 103-110.

Tinggi U., Reilly C., Patterson C.M. 1992. Determination of selenium in foodstuffs using spectrofluorometry and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5: 269-280.

Trace elements in human nutrition and health. 1996. Geneva, World Health Organization: 361 str.

Vandecasteele C., Block C.B. 1993. Modern methods for trace element determination. Chichester, New York, John Wiley & Sons: 330 str.

Vlieg P. 1990. Selenium concentration of the edible part of 74 New Zealand fish species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3: 67-72.

Wasowicz W. 2002. Selenium in Polish population. Nutritional status, dietary daily intake, and clinical aspects. V: Macro and trace elements. 21. Workshop 2002, Jena, 18-19 nov. 2002. Anke M., Mueller R., Schaefer U., Stoeppler M. (eds.). Leipzig, Schubert Verlag: 935-944.

Windisch W. 2002. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of the essential trace elements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372: 421-425.

Wyatt C.J., Meléndez J.M., Acuña N., Rascon A. 1996. Selenium (Se) in foods in northern Mexico, their contribution to the daily Se intake and the relationship of Se plasma levels and glutathione peroxidase activity. *Nutrition Research*, 16: 949-960.

Yoshida M., Abe M., Fukunaga K., Kikuchi K. 2002. Bioavailability of selenium in the defatted dark muscle of tuna. *Food Additives and Contamination*, 19, 10: 990-995.

Zhang P., Chen C., Zhao J., Li B., Xing L., Qu L., Chai Z. 2004. Correlations of mercury, selenium and other elements in fish tissues from the regions at different mercury-exposure levels. *RMZ-Materials and Geoenvironment. Revija za rudarstvo, metalurgijo in geologijo*, 51: 1457-1460.