

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara OREŠNIK

**VSEBNOST SELENA IN ARZENA V CELODNEVNIH
OBROKIH SLOVENSKE VOJSKE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara OREŠNIK

**VSEBNOST SELENA IN ARZENA V CELODNEVNIH OBROKIH
SLOVENSKE VOJSKE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF SELENIUM AND ARSENIC IN MILITARY
DAILY MEALS OF SLOVENIAN ARMY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obrok slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno na Institutu Jožef Štefan, na Odseku za znanost o okolju v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Terezijo Golob, za somentorico dr. Vekoslavo Stibilj in za recenzenta izr. prof. dr. Blaža Cigića.

Mentorica: izr. prof. dr. Terezija Golob

Somentorica: izr. prof. dr. Vekoslava Stibilj

Recenzent: izr. prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Barbara Orešnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 613.2-057.36:546.23:543.272.43:641.1(043)=163.6
KG	prehrana/prehrana vojakov/celodnevni obroki/Slovenska vojska/dnevni vnos/mikroelementi/selen/arzen/jedilniki v vojašnicah/hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
AV	OREŠNIK, Barbara
SA	GOLOB, Terezija (mentorica)/STIBILJ, Vekoslava (somentorica)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	VSEBNOST SELENA IN ARZENA V CELODNEVNIH OBROKIH SLOVENSKE VOJSKE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 42 str., 15 pregl., 9 sl.,
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Arzen in selen sta elementa, ki ju v svoje telo vnesemo predvsem s hrano. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti celodnevni vnos selena in arzena z obroki vojakov. Za določanje selena v 15 vzorcih celodnevni vojaških obrokov smo uporabili metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS). Pravilnost metode smo preverjali s standardnimi referenčnimi materiali. Ugotovili smo, da je povprečni dnevni vnos 62,5 µg selena. Vsebnosti so se nahajale v območju od 34 do 113 µg Se/dan. Rezultate naše raziskave smo primerjali z literaturo in ugotovili, da se dobljeni rezultati za selen ujemajo s priporočenimi vrednostmi. Arzen smo določali z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo, arzenove spojine pa smo določali z metodo HPLC-(UV)-HG-AFS. Za analizo arzenovih spojin smo poleg šestih vzorcev celodnevni vojaških obrokov, ki so vsebovali ribe, uporabili še 6 vzorcev ribjih izdelkov. Vsebnost arzena v obrokih, ki niso vsebovali rib, je bila od 4 do 20 µg, v obrokih, ki so vsebovali ribe, pa od 42 do 218 µg. Vsebnosti arzenita (As ^{III}), arzenata (As ^V), monometil arzenove kisline (MMA ^V), dimetil arzenove kisline (DMA ^V), trimetil arzonijevega iona (TETRA), trimetil arzenovega oksida (TMAO) in arzenoholina (AsC) so bile pod mejo detekcije. Vsebnost arzenobetaina (AsB) v obrokih, ki so vsebovali ribe, je bila med 0,01 µg/g in 0,27 µg/g. Tudi najvišja ugotovljena vsebnost arzena v naših vzorcih, ki je znašala 218 µg As/dan (3,1 µg na kilogram telesne teže na dan, pri povprečni teži 70 kg), je v območju BMDL ₀₁ (Benchmark Dose Lower Confidence Limit), v katerem s 95 % verjetnostjo pričakujemo, da se škodljiv učinek ne bo pojavil pri 99 % ljudi ali več.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 613.2-057.36:546.23:543.272.43:641.1(043)=163.6
 CX nutrition/military nutrition/daily meals/Slovenian army/daily intake/microelements/
 selenium/arsenic/military rations/ hydride generation atomic fluorescence
 spectrometry
 AU OREŠNIK, Barbara
 AA GOLOB, Terezija (supervisor)/ STIBILJ, Vekoslava (co-supervisor)/CIGIČ, Blaž
 (reviewer)
 PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Technology
 PY 2016
 TI THE CONTENT OF SELENIUM AND ARSENIC IN MILITARY DAILY
 MEALS OF SLOVENIAN ARMY
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO IX, 42 p., 15 tab., 9 fig.,
 LA sl
 AL sl/en
 AB Arsenic and selenium are elements that enter our bodies through ingestion of food
 products. The purpose of this thesis was to establish the daily intake of arsenic and
 selenium with military total diet. Selenium content in 15 samples of daily total diet
 was defined by using the hydride generation atomic fluorescence spectrometry
 method (HG-AFS). The accuracy of this method was tested with standard reference
 materials. The average daily intake 62.5 µg selenium was determined. Its contents
 ranged from 34 to 113 µg of Se / day. The results of our research were compared to
 those from literature and we found that the results gained in regards to selenium are
 in accordance with recommended values. Arsenic was defined by the radiochemical
 neutron activation analysis (RNAA) and arsenic compounds were defined with the
 HPLC-(UV)-HG-AFS method. In addition to six samples of daily military total diet
 containing fish, the analysis of arsenic compounds was also done on 6 samples of
 fish products. The content of arsenic in meals not containing fish ranged from 4 to
 20 µg, and in meals containing fish from 42 to 218 µg. The contents of arsenite
 (As^{III}), arsenate (As^V), methylarsonate (MMA^V), dimethylarsinate (DMA^V),
 tetramethylarsonium ion (TETRA), tetramethylarsine oxide (TMAO), and
 arsenocholine (AsC) were below the limit of detection. The content of
 arsenobetaine (AsB) in meals containing fish ranged from 0.01 to 0.27 µg/g. Even
 the highest determined arsenic content in our sample, which was 218 µg As / day
 (3.1 µg per kilogram of bodyweight per day at average weight of 70kg) falls within
 the scope of BMDL₀₁ (Benchmark Dose Lower Confidence Limit), where it can be
 expected with a 95 % probability that the adverse effects shall not manifest in 99 %
 of the population or more.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VOJAŠKA PREHRANA, ENERGIJA	3
2.1.1 Režim prehranjevanja.....	4
2.2 SELEN	5
2.2.1 Biološka vloga selena	5
2.2.1.1 Metabolizem selena	5
2.2.1.2 Selenobeljakovine v telesu	8
2.2.2 Selen in zdravje.....	9
2.2.2.1 Dnevni vnos selena.....	9
2.2.3 Selen v hrani.....	11
2.3 ARZEN	13
2.3.1 Presnova arzena in arzenove spojine.....	15
2.3.1.1 Absorpcija in izločanje arzena.....	15
2.3.1.2 Toksičnost arzena	17
2.3.1.3 Metilacija arzena.....	17
2.3.1.4 Interakcija arzena s selenom.....	20
2.3.2 Arzen v hrani	20
3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 MATERIAL	21
3.1.1 Vzorci	21
3.2 METODE DELA	27
3.2.1 Protokol za vzorčenje celodnevni obroki hrane (Stibilj in sod., 2002)	27
3.2.2 Homogenizacija celodnevni obroki	28
3.2.3 Določitev selena.....	28
3.2.3.1 Razkroj vzorcev.....	28
3.2.3.2 Določitev selena s HG-AFS	29
3.2.4 Določitev arzena in njegovih spojin	30
3.2.4.1 Določitev arzena z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA).....	30
3.2.4.2 Določitev arzenovih spojin.....	31
3.2.4.2.1 Ekstrakcija arzenovih spojin.....	32
3.2.4.2.2 Separacija in detekcija	32

4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33
4.1 PRIMERNOST IN ZANESLJIVOST UPORABLJENIH METOD	33
4.1.1 Metoda za določitev selena.....	33
4.1.2 Metoda za določitev arzena	35
4.2 VSEBNOST SELENA V CELODNEVNIH VOJAŠKIH OBROKIH	36
4.2.1 Primerjava vsebnosti selena z literaturo	39
4.2.2 Vsebnost arzena v celodnevni vojaški obroki.....	41
4.2.2.1 Arzenove spojine v celodnevni vojaški obroki.....	42
4.2.2.2 Primerjava vsebnosti arzena z literaturo.....	44
5 SKLEPI	45
6 POVZETEK.....	46
7 VIRI	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razmerja hranil jedilnika (Pograjc, 2001a).....	4
Preglednica 2: Priporočeni dnevni vnos selena ($\mu\text{g Se/dan}$).....	10
Preglednica 3: Arzenove spojine (Molin, 2015)	14
Preglednica 4.: Jedilniki celodnevni vojaških obrokov, vzorčenih v vojašnici Vipava leta 2005 (Pograjc, 2011)	21
Preglednica 5.: Seznam vzorcev ribjih izdelkov, kupljenih marca 2005 v Ljubljani (Volk, 2006).....	25
Preglednica 6: Izkoristek celotnega analiznega postopka za razkroj selena v zaprti teflonski posodi	33
Preglednica 7: Vsebnost selena v standardnih referenčnih materialih (ng/g suhe snovi vzorca)	34
Preglednica 8: Vsebnost celotnega arzena v certificiranem referenčnem vzorcu.....	35
Preglednica 9: Vsebnost selena v vzorcih celodnevni vojaških obrokov, podana v ng/g suhe snovi	36
Preglednica 10: Vnos selena ($\mu\text{g/dan}$) s celodnevnimi vojaškimi obroki.....	37
Preglednica 11: Dnevni vnosi selena (μg) v različnih državah.....	40
Preglednica 12: Dnevni vnos arzena s celodnevnimi vojaškimi obroki	41
Preglednica 13: Vsebnost DMAA (ng/g) v vzorcih ribjih izdelkov	43
Preglednica 14: Vsebnost arzena in kationskih arzenovih spojin v ribjih izdelkih in obrokih, ki vsebujejo ribe (ng As/g).....	43
Preglednica 15: Primerjava dnevnega vnosa arzena s celodnevnimi vojaškimi obroki z vnosom arzena v nekaterih drugih državah	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Presnovna pot anorganskega selen in selen vsebujočih aminokislin (Windisch, 2002).....	6
Slika 2: Proteini, ki vsebujejo selen (Suzuki, 2005).....	7
Slika 3: Delež vnosa selen s posameznimi skupinami živil (Foster in Sumar, 1997).....	12
Slika 4: Prikaz absorpcije, distribucije, presnove in izločanja arzenovih spojin iz morske hrane (Molin, 2015).....	16
Slika 5: Metabolne poti anorganskega arzena pri sesalcih (Cui in sod., 2008)	19
Slika 6: Shema sistema HG-AFS	29
Slika 7: Kontrolni diagram določanja selen v standardnem referenčnem materialu Typical Diet 1548a	35
Slika 8: Razlika med izračunanimi in analiziranimi vrednostmi hranil (Koroušić-Seljak in sod., 2013)	38
Slika 9: Vnos selen ($\mu\text{g}/\text{dan}$).....	39

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AsB	arzenobetain
AsC	arzenoholin
BMDL ₀₁	spodnja meja zaupanja primerjalnega odmerka (Benchmark Dose Lower Confidence Limit)
CRM	certificirani referenčni material
DMAA	dimetil arzenova kislina
DRI	Priporočen dnevni vnos (Dietary reference intake)
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (European Food Safety Authority)
ET-AAS	elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija
FAO	Mednarodna agencija za hrano (Food and Agriculture Organization)
GSHPx	glutation peroksidaza
HG-AAS	hidridna tehnika atomske absorpcijske spektrometrije
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo
JECFA	skupni strokovni odbor FAO/WHO za aditive v živilih (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
MMAA	monometil arzenova kislina
OPKP	Odporna platforma za klinično prehrano
PTWI	začasni dopustni tedenski vnos (Provisional Tolerable Weekly Intake)
RNAA	radiokemična nevtronska aktivacijska analiza
SeCys	selenocistein
SeMet	selenometionin
TETRA	tetrametil arzonijev ion
TMAO	trimetil arzenov oksid
TMSe	trimetil selenonijev ion
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

1 UVOD

Vojaki so populacija, ki je zaradi specifičnega delovanja izpostavljena večjim psihofizičnim obremenitvam. Zelo pomembno je, da se počutijo zdravi in imajo veliko energije, saj s svojim urjenjem in pripravo na krizne situacije vplivajo na varnost države. Za zagotovitev energije ter makro- in mikrohranil, ki jih telo potrebuje, je pomembno uživanje uravnotežene hrane. Zagotovitev ustrezne prehrane je odvisna od več medsebojno povezanih dejavnikov: kakovosti surovin za pripravo hrane, načina priprave obrokov, sestave in uravnoteženosti jedilnikov, količine hrane, ki jo vojaki pojedjo, okolja, v katerem se prehranjujejo, do tega, ali jedo sami ali v skupini, kulturne sprejemljivosti hrane, povezane s prehranjevalnimi navadami itd. (Tharion in sod., 2005).

Ko govorimo o uravnoteženi prehrani, mislimo tudi na uživanje zadostne količine prehransko pomembnih mikroelementov, ki imajo pomembno vlogo pri energijski presnovi. Enako velja tudi za vojake, za katere so predvsem zaradi fizičnega napora posamezni elementi še posebej pomembni.

Selen je element v sledovih. Spada med esencialne elemente za človeka, saj je v majhnih količinah bistven za življenjske procese. Pri vnosu velikih količin je lahko toksičen. Selenobeljakovine iz družine glutathion peroksidaz imajo antioksidativno vlogo, saj ščitijo celice pred oksidativnimi poškodbami, beljakovine iz družine jodotironin dejodinaz pa vplivajo na delovanje imunskega sistema in ščitnice (Brown in Arthur, 2001).

Primarni vir selena je hrana. Priporočen dnevni vnos selena znaša 55 μg Se/dan (DRI, 2000). Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004), ki veljajo za odraslo populacijo Slovenije, navajajo priporočen vnos v območju med 30 in 70 μg Se/dan. Enako vrednost navajajo tudi Prehranska priporočila za Slovensko vojsko. Vendar, kot poudarjajo raziskovalci (Combs, 2001), stanje preskrbljenosti s selenom ni odvisno le od količine zaužite s hrano, ampak tudi od kemijske oblike selena, ki vpliva na biorazpoložljivost in na porazdelitev le-tega v telesu.

Zaradi običajno majhne vsebnosti selena v hrani so za določanje tega elementa primerne metode, ki imajo nizko mejo zaznavnosti. Uporabljajo se radiokemična nevtronska aktivacijska analiza (RNAA), hidridna tehnika atomske absorpcijske spektrometrije (HG-AAS), induktivno sklopljena plazma z masno spektrometrijo (ICP-MS) in elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (ET-AAS), v zadnjem času pa tudi metoda hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS).

Arzen je dvajseti najpogostejši element v zemeljski skorji, štirinajsti v morski vodi in dvanajsti najpogostejši element v človeškem telesu. V organizem večinoma prihaja s hrano in vodo (Woolson, 1975).

Čeprav je med ljudmi razširjeno prepričanje o toksičnosti arzena, elementarni arzen ni strupen za ljudi in živali (Srebočan, 1993). Po nekaterih predvidevanjih naj bi bil za človeka celo esencialen.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Delo v okviru te diplomske naloge je le del obsežne raziskave o energijski in prehranski kakovosti celodnevni vojaški obrokov (Stibilj, Šlejkovec, 2004).

Poleg glavnih hranljivih snovi, energijske vrednosti in posameznih prehransko pomembnih komponent je treba poznati tudi vsebnost elementov.

Ker sta arzen in selen elementa, ki ju človek zaužije s hrano, smo v okviru naše raziskave, v petnajstih celodnevni vojaški obrokih, analizirali vsebnost selen, ki je esencialen za človeka in žival, in arzena, katerega esencialnost še ni potrjena.

Namen našega dela je bil določiti vsebnost arzena in selen v celodnevni obrokih hrane v vojašnici in rezultate primerjati z vojaškimi standardi in priporočili. V obrokih, ki so vsebovali ribe, smo določili tudi arzenove spojine.

Predvidevali smo:

- da so obroki sestavljeni tako, da je zagotovljen priporočen dnevni vnos selen,
- da je vsebnost arzen v obrokih v območju, kjer s 95 % verjetnostjo pričakujemo, da se škodljiv učinek pri človeku ne bo pojavil,
- da je arzenobetain glavna spojina v ribah in ribjih izdelkih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VOJAŠKA PREHRANA, ENERGIJA

Prehrana je za vojaka eden izmed najpomembnejših pogojev za vzdrževanje ustrezne telesne zmogljivosti in s tem tudi bojne pripravljenosti (Military Strategies ..., 1999).

Normativi za prehrano vojakov na služenju vojaških obveznosti so določeni na podlagi:

- splošnih načel in spoznanj stroke, ki veljajo za uravnoteženo, zdravo in sodobno prehrano,
- ocene telesnih obremenitev med urjenjem,
- rezultatov antropometričnih meritev,
- rezultatov prehranske ankete vojakov, ki vključuje mnenja, želje ter predloge vojakov (Pograjc, 2001b).

Primerna količina zaužite hrane in tekočine izboljšuje pripravljenost. Na splošno velja, da je količina zaužite energije enaka količini energije, ki se porabi (energija vnosa = energija iznosa). Preveč zaužite energijsko bogate hrane povzroča pridobivanje teže in s tem zmanjšanje kondicije, premalo hrane pa povzroča utrujenost (Giese, 2003).

Vojake lahko glede na energijske potrebe primerjamo s fizičnimi delavci oziroma športniki. Pri njih znaša delež energijske porabe na račun fizične obremenitve do tri četrtine celotnega energijskega vnosa (Pograjc in Dernovšek, 1996).

Energijska vrednost dnevnega jedilnika, prilagojena na fizično obremenitev med usposabljanjem za vojake v pehoti, znaša 15.000 kJ (3585 kcal). Dovoljeno jo je povečati z dodatkom kruha glede na individualno potrebo vojaka za približno 2000 kJ (478 kcal). Ob največjih obremenitvah, kot so celodnevni pohodi, izjemno naporno terensko usposabljanje ipd., znaša dnevna energijska poraba 20.000 kJ (4780 kcal). Med obremenitvijo se s prehrano pokrije le del energijskih potreb, kar je najmanj 14.000 kJ. Razlika se pokrije s prehranskimi dodatki. Za rodove, kjer je usposabljanje napornejše kot pri pehoti, se razlika v energijski vrednosti pokrije s predpisanimi prehranskimi dodatki (Pograjc, 2001a).

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obrokih slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Preglednica 1: Razmerja hranil jedilnika (Pograjc, 2001a)

Celodnevni obrok	Energijska vrednost hranil		
		od	do
	energijska vrednost (kJ)	14.250	15.750
	beljakovine (g)	89	134
	maščobe (g)	90	134
	ogljikovi hidrati (g)	446	625

Prehranska priporočila za Slovensko vojsko predpisujejo za napornejše telesne aktivnosti okoli 15.000 kJ na dan. Glavno energijsko živilo so ogljikovi hidrati, ki pokrijejo od 50 do 70 % potreb po energiji. Maščobe pokrijejo od 20 do 30 % (največ 35 %) dnevnih energijskih potreb, beljakovin pa naj bi bilo v dnevni prehrani od 10 do 15 %. V dnevni prehrani mora biti tudi od 20 do 35 gramov prehranskih vlaknin, prav tako pa so predpisani tudi dnevni vnosi makro-, mikro- in nekaterih elementov v sledovih ter vitaminov (Prehranska priporočila..., 2004; Referenčne vrednosti..., 2004).

2.1.1 Režim prehranjevanja

Jedilnik vojakov vsebuje štiri dnevne obroke: zajtrk, dopoldansko malico, kosilo in večerjo. V času celodnevnega usposabljanja oziroma urjenja na terenu pa v jedilniku izpustijo malico. Energijski delež, ki ga vsebuje malica, v takem primeru razporedijo med druge obroke.

Energijski deleži posameznih obrokov znašajo:

- zajtrk, od 20 do 30 %,
- malica, od 10 do 15 %,
- kosilo, od 35 do 40 %,
- večerja, od 20 do 30 % (Pograjc, 2001a).

Obseg obrokov narekuje celodnevna aktivnost vojakov. Tik pred večjim telesnim naporom naj vojakom ne bi ponujali glavnega obroka; v primeru, da vojaki pred naporom čutijo lakoto, je priporočljiv manjši ogljikohidratni obrok, ki ne obremeni presnove. Pri načrtovanju jedilnikov ni treba natančno količinsko odmerjati obrokov (zaradi različnih fizioloških potreb posameznih vojakov); treba pa je poudariti pomembne skupine živil: ogljikohidratna živila, sadje, zelenjava ter beljakovinska živila. Količino zaužite hrane bolj ali manj regulira tek posameznika (Pokorn, 1991).

2.2 SELEN

Selen je eden najbolj redkih elementov, vendar je kljub temu ključna sestavina življenja. Leta 1817 ga je na tleh svinčenih komor v tovarni žveplene kisline odkril švedski kemik Jöns Jakob Berzelius, njegovo toksičnost pa je najbrž že v 13. stoletju, med potovanjem po Kitajski, opisoval Marco Polo (Reilly, 1996).

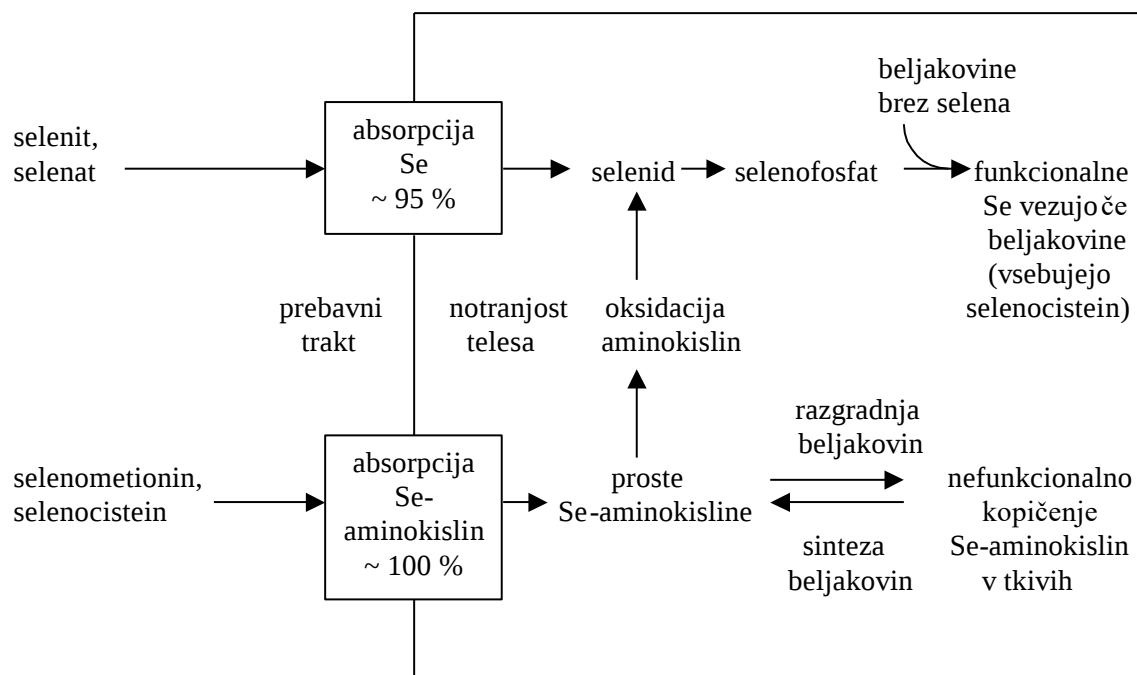
Selen je element, ki se nahaja v šesti skupini periodnega sistema. V tej skupini sta poleg selena še nekovini kisik in žveplo, kot tudi kovini telur in polonij. Selen spada med metaloide, saj ima tako kovinske kot nekovinske lastnosti. V anorganskih spojinah je lahko prisoten kot elementarni selen (Se^0) ali v oksidirani obliki kot selenit ($\text{SeO}(\text{OH})_2$) in selenat ($\text{SeO}_2(\text{OH})_2$) (Suzuki, 2005). Najbolj znani organski spojini, ki sta naravno prisotni v celicah in tkivih, sta selenoaminokislina selenocistein (SeCys) in selenometionin (SeMet). Selen ima 6 naravnih izotopov: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se in ^{82}Se (Reilly, 1996).

2.2.1 Biološka vloga selena

2.2.1.1 Metabolizem selena

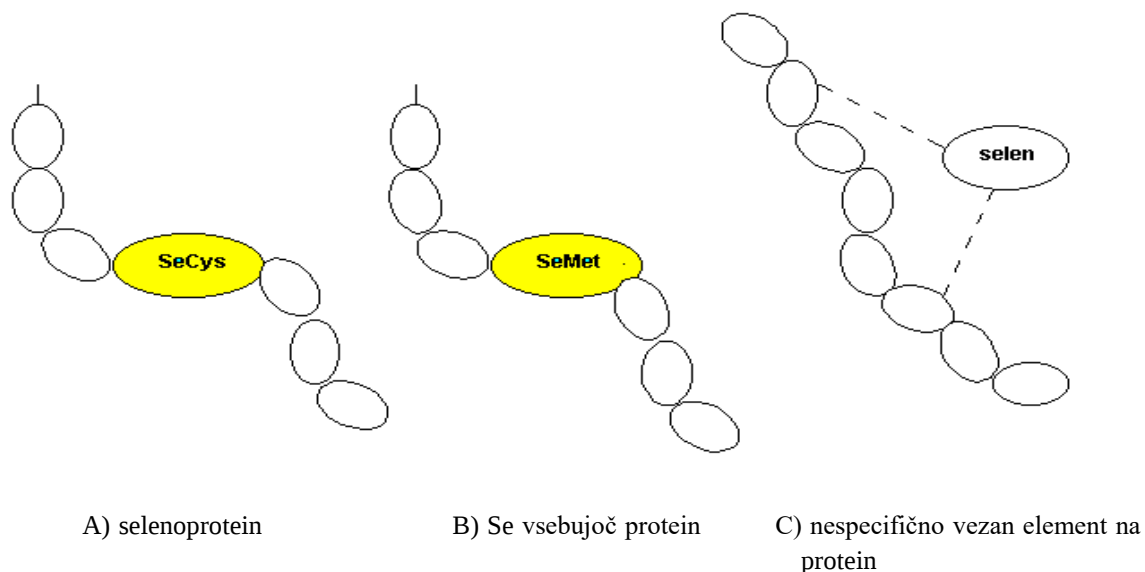
Selen pride v naš organizem preko prebavnega trakta, respiratornega trakta ali preko kože. Največ selena v telo vnesemo s hrano, njegova absorpcija pa poteka v dvanajstniku, slepiču in debelem črevesju (Klapec, 1998). S hrano zaužijemo selen predvsem v obliki selenoaminokislin (selenometionin in selenocistein) (Suzuki, 2005), in ko le-te prispejo do mesta absorpcije, se v procesu presnove pretvorijo v druge oblike (Reilly 2002). Na splošno se selen v organski obliki (selenocistein in selenometionin) absorbira bolje kot v anorganski obliki (selenit, selenat) (Reilly, 1996). Iz intestinalnega trakta se absorbira približno 95 % selena v anorganski obliki, v organski obliki pa skoraj 100 % (Windisch, 2002).

Metabolizem selena je odvisen od kemijske oblike Se (slika 1).



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

Anorganske selenove soli (selenit, selenat) vstopajo v redukcijo pot in nastane selenid. Aminokislina selenometionin (SeMet) lahko nadomesti metionin v beljakovinah ali pa se pretvori v selenocistein (SeCys), ki se s pomočjo β -liaze nato pretvori v selenid (Suzuki, 2005). Selenid ima dve možni metabolni poti. Ena izmed njiju je izločanje z urinom, druga pot pa je tvorba selenobeljakovin. Pri tvorbi selenobeljakovin se selenid poveže s tRNA in nastane kompleks $tRNA^{SeCys}$, ki se vgradi v selenobeljakovine s posebno UGA-kodon sekvenco (Finley, 2006). Selen se izliči z urinom v obliki selenosladkorjev. Kadar pa je vnos tako velik, da je toksičen, se izloča tudi kot dimetilselenid z izdihanim zrakom in kot trimetilselenonijev ion z urinom (Francesconi in Pannier, 2004).



Slika 2: Proteini, ki vsebujejo selen (Suzuki, 2005)

Selenove spojine se torej prenašajo po telesu s krvjo, večinoma vezane na beljakovinske albumine in β -lipoproteine, ki se nato odlagajo v telesnih organih (Reilly 1996). Največ selena vsebujejo jetra, nekoliko manj ledvice. V obeh organih poteka izgradnja večine selenobeljakovin (Suzuki, 2005).

Biorazpoložljivost selena je definirana kot kvantitativno merilo izkoriščenosti hranila pod specifičnimi pogoji za vzdrževanje normalne strukture organizma in fizioloških procesov. Odvisna je od količine selena, topnosti, absorpcije, vrste živila, kemijske oblike selena, fiziološkega stanja organizma (Reilly, 1996). Organske oblike selena so bolj biorazpoložljive kot anorganske (Navarro - Alarcon in Cabrera - Vique, 2008).

Izločanje selena iz telesa poteka v glavnem po treh poteh: z urinom preko ledvic, z blatom preko gastrointestinalnega trakta in z izdihanim zrakom preko pljuč (Reilly, 1996). Vse od prve objave leta 1969, ko so v urinu odkrili trimetilselenonijev ion (TMSe), je veljalo, da je to eden glavnih metabolitov presnove selena. Več kot trideset let kasneje so z uvedbo novejših analizičnih metod dokazali, da je TMSe v urinu prisoten le v zelo majhnih koncentracijah oziroma ga sploh ni (Francesconi in Pannier, 2004). Suzuki in sod. (2002) so odkrili, da je glavni metabolit v urinu selen vsebujoč sladkor oziroma selenoslador 2. V manjših količinah sta v urinu prisotna tudi selenoslador 1 in selenoslador 3. Skozi kožo ali pljuča se selen izloči v obliki dimetilselenida (zadah po česnu) (Suzuki, 2005). Ko je vnos selena nizek, je izločanje z urinom zmanjšano, ko pa je vnos povečan, je tudi izločanje povečano (Navarro - Alarcon in Cabrera - Vique, 2008).

2.2.1.2 Selenobeljakovine v telesu

Selenobeljakovine so skupina beljakovin, ki kot del polipeptidne verige vsebujejo selenocistein (Papp in sod., 2007), medtem ko beljakovine, ki vsebujejo selen v obliki selenometionina, imenujemo selen vsebujoče beljakovine (Suzuki, 2005). Vse do sedaj identificirane selenobeljakovine so selenoenzimi (Behne in Kyriakopoulos, 2001).

Pomembne selenobeljakovine so (Brown in Arthur, 2001):

- družina *glutation peroksidaz* (GSHPx):

- klasična glutathion peroksidaza (GPx 1),
- gastrointestinalna glutathion peroksidaza (GPx 2),
- ekstracelularna glutathion peroksidaza (GPx 3),
- fosfolipidna hidroperoksid glutathion peroksidaza (GPx 4).

Imajo antioksidativno delovanje, pomembno pri preprečevanju oksidativnih poškodb, ker razgrajujejo nastale perokside.

- *tioredoksin reduktaze* (TR)

Katalizirajo NADPH-odvisno redukcijo oksidirane tioredoksina, ki je ključen dejavnik pri regulaciji redoks procesov v celici.

- *selenoprotein P*

Približno 60 % selen v plazmi je vezanega v selenoprotein P, ki deluje kot prenašalec selen v tkiva. Povezujejo ga s celičnimi membranami, zato domnevajo, da deluje kot antioksidant.

- družina *jodotironin dejodinaz*:

- tip 1 jodotironin dejodinaza,
- tip 2 jodotironin dejodinaza,
- tip 3 jodotironin dejodinaza.

Katalizirajo aktivacijo in inaktivacijo ščitničnih hormonov.

- *selenofosfat sintetaza*

To je encim, ki je potreben za vključitev selenocisteina v selenobeljakovine (Brown in Arthur, 2001).

Funkcije ostalih selenobeljakovin (selenoprotein W, 15-kDa selenoprotein, 18-kDa selenoprotein itd.) do sedaj še niso popolnoma znane (FAO/WHO, 2001).

2.2.2 Selen in zdravje

Selen je element v sledovih z ozko mejo med pomanjkanjem in toksičnostjo, esencialen za normalno delovanje organizma (Suzuki, 2005). Je sestavni del pomembnejših metabolnih poti, vključno s sintezo ščitničnih hormonov in antioksidativnimi procesi (Brown in Arthur, 2001). Prepoznavanje esencialnosti Se se je začelo, ko sta Schwarz in Foltz leta 1957 odkrila, da lahko natrijev selenit prepreči nekrozo jeter pri podganah s pomanjkanjem vitamina E. Po tem odkritju so celemu nizu bolezni pripisali pomanjkanje tega elementa (Klapec in sod., 1998).

Prvi opisani bolezni, povezani s pomanjkanjem selena, sta Keshanova bolezen, kardiomiopatija, in Kashin-Beckova bolezen, bolezen povečanih sklepov ali osteoartropatija, ki se pojavljata na severnem Kitajskem, kjer prehrana vsebuje zelo malo selena (Reilly, 1996).

Na geografskih področjih, kjer je vsebnost selena v tleh visoka, lahko pride do zastrupitve s selenom, ki jo imenujemo selenoza. Najbolj tipičen znak prevelike količine zaužitega selena pri ljudeh je značilen zadah po česnu (izločanje dimetil selenida). Glavni simptomi letalne zastrupitve so: nekrotična degeneracija jeter, fibroza ledvic in miokardialna kongestija (Reilly, 1996).

Selen je potreben za pravilno delovanje imunskega sistema. Pomemben je v prehrani pacientov okuženih z virusom HIV, saj preprečuje razvoj virulence in napredovanju virusa HIV v AIDS. Vpliva na gibljivost spermijev in lahko zmanjša možnost splava (Rayman, 2000). Posebna pozornost raziskovalcev je posvečena tudi možni povezavi med vnosom selena in kroničnimi boleznimi, kot so rak in kardiovaskularne bolezni (Reilly, 1996).

2.2.2.1 Dnevni vnos selena

Dnevni vnos selena, ki naj bi pokril potrebe pri ljudeh, se po posameznih področjih zelo razlikuje. Odvisen je od koncentracije selena v hrani in od količine hrane, ki jo zaužijemo. Koncentracija selena v hrani je odvisna predvsem od vsebnosti tega elementa v zemlji (Kabata - Pendias, 2001).

Na podlagi raziskav je bil določen priporočen dnevni vnos selena (RDA – Recommended Daily Allowance), ki znaša 55 µg/dan. Pri dojenčkih in otrocih so te vrednosti manjše, medtem ko so priporočene vrednosti dnevnega vnosa za nosečnice in doječe matere večje (DRI – Dietary reference intakes, 2000). Referenčne vrednosti za vnos hranil (Ministrstvo za zdravje, 2004), ki veljajo tudi za Slovenijo, ocenjujejo, da se s 30–70 µg Se/dan doseže

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obroki slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

primeren vnos za odrasle. Enako vrednost opredeljujejo Prehranska priporočila za Slovensko vojsko (Pograjc, 2011; Prehranska priporočila ..., 2004).

Leta 1996 je WHO navajala potrebe po selenu (dvotretjinsko nasičenje aktivnosti glutationperoksidaze), za ženske 30 µg/dan in za moške 40 µg/dan (Referenčne vrednosti ..., 2004).

Preglednica 2: Priporočeni dnevni vnos selena (µg Se/dan)

Starostna skupina	Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004)	FAO/WHO (2001)	Reilly (1996)	DRI (2000)
Dojenčki				
Od 0 do manj kot 4 mesece	5–15			
0–6 mesecev		6	15	
Od 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	
Od 10 do manj kot 13 let	25–60			
Mladostniki				
Deklice, 10–18 let		26		
Fantje, 10–18 let		32		
Od 13 do manj kot 15 let	25–60			
14–18 let			55	
Mladostniki in odrasli				
Od 15 do manj kot 19 let	30–70			
Od 19 do manj kot 25 let	30–70			
19–30 let				55
Od 19 do manj kot 51 let	30–70			
Ženske, 19–65 let		26		
Moški, 19–65 let		34		
Od 25 do manj kot 51 let	30–70			
31–50 let				55
Od 51 do manj kot 65 let	30–70			
51–70 let				55

se nadaljuje

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obroki slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Nadaljevanje preglednice 2: Priporočeni dnevni vnos selena ($\mu\text{g Se/dan}$)

Starostna skupina	Referenčne vrednosti za vnos hranil (2004)	FAO/WHO (2001)	Reilly (1996)	DRI (2000)
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		

Vsebnost selena v obroku se lahko določi s kemijsko analizo ali z izračunom s pomočjo prehranskih tabel. Koroušić Seljak in sod. (2013) so v svoji raziskavi primerjali rezultate kemijskih analiz dvajsetih dnevnih obrokov, namenjenih fizično aktivnim moškim, z izračunanimi vrednostmi iz prehranskih tabel. Največji odklon med izračunanimi vrednostmi in vrednostmi dobljenimi s kemijsko analizo je bil pri vsebnosti Se in I, medtem ko je bil odklon pri ostalih elementih manjši. Tako so potrdili, da je spletni portal OPKP (Odprta platforma za klinično prehrano) primerno orodje za izračun makro hranil izbranih esencialnih elementov (Ca, Fe, Mg, Zn, Na, P in Cu), vode in energije, ne pa tudi za selen in jod.

Pokorn in sod. so v letih 1988–1989 in leta 1992 ugotavljali dnevni vnos selena v domovih za starejše občane. V celodnevni obroki hrane v sedmih domovih za starejše občane v Ljubljani so v letih 1988–1989 določili povprečen vnos selena na $40 \mu\text{g Se/dan}$. Leta 1992 so v raziskavo vključili 51 domov za starejše občane širom Slovenije. Določili so nižji povprečni vnos selena, ki je znašal $30 \mu\text{g Se/dan}$. Ugotavljali so, da je vzrok temu najverjetneje manjša masa obroka, ki jo potrebujejo starejši ljudje (Pokorn in sod., 1998).

Smrkolj in sod. (2004) so ugotavljali dnevni vnos selena v celodnevni obroki vojaške hrane v štirih slovenskih vojašnicah. V obrokih so določili povprečno $87 \mu\text{g Se/dan}$, s čimer so dokazali zadosten povprečen dnevni vnos selena.

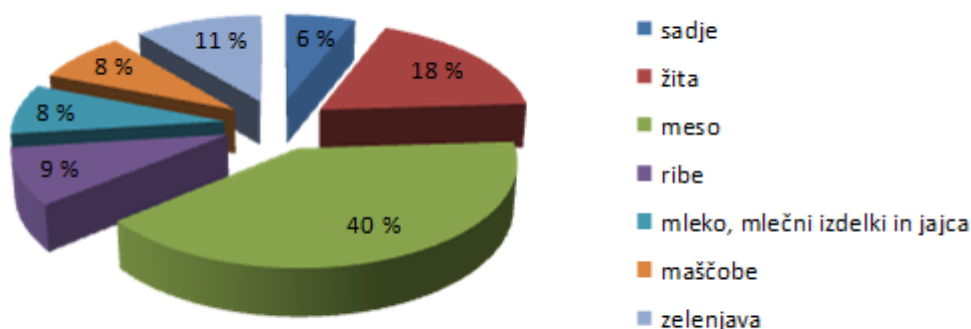
2.2.3 Selen v hrani

Hrana je glavni vir selena in približno 80 % le-tega se absorbira, odvisno od tipa zaužite hrane. Prehranska vloga selena je odvisna od tega, ali je selen v organski ali anorganski obliki. V hrani živalskega izvora je organski selen predvsem v obliki selenocisteina, v

rastlinski hrani pa v obliki selenometionina. Anorganske oblike selena, kot sta selenit in selenat, so v hrani prisotne v zelo majhnih količinah, običajno pa so prisotne le v prehranskih dopolnilih (Reilly, 2002). Selenometionin celo pri majhnem doziranju s prehranskimi dopolnili, po nasičenju glutathion peroksidaze pripelje do oblikovanja zalog selena (Referenčne vrednosti ..., 2004).

Na prisotnost selena v hrani vpliva tudi vsebnost beljakovin, saj zaradi fizikalno-kemijskih podobnosti selen lahko nadomesti žveplo v aminokislinah, kot SeMet, SeCys in selenocistationin (Navarro - Alarcon in Lopez - Martinez, 2000). Organizem iz selenovih spojin gradi selenoaminokisliline, te pa so sestavni del beljakovin (Navarro - Alarcon in Cabrera - Vique, 2008).

Delež vnosa selena s posameznimi skupinami živil prikazuje slika 3 (povzeto po Foster in Sumar, 1997).



Slika 3: Delež vnosa selena s posameznimi skupinami živil (Foster in Sumar, 1997)

Reilly (2002) navaja, da so najbolj bogat vir selena jetra (0,05–1,33 mg/kg), mišičnina (0,06–0,42 mg/kg) in ribe (0,05–0,54 mg/kg). Vsebnost selena v živilih živalskega izvora je v veliki meri odvisna od zemlje, na kateri rastejo krmne rastline ali se pasejo živali (Žlender, Bitenčevi dnevi, 2009). Živila rastlinskega izvora vsebujejo malo selena (< 0,1 mg Se/kg) (Trace elements, 1996). Ventura in sod. (2009) so to ugotavljali v raziskavi, kjer so določali selen v sadju in zelenjavi – v pomaranči, jabolku, paradižniku, krompirju, solati, zelju, cvetači, brokoliju in korenju. Od preiskovanih vzorcev je največ selena vseboval brokoli ($0,39 \pm 0,32$ mg/100 g svežega vzorca), najmanj pa paradižnik (0,03 mg/100 g svežega vzorca). Foster in Sumar (1997) ugotavljata, da je prispevek zelenjave k dnevnemu vnosu selena približno 11 %. Žita vsebujejo le 0,01–0,31 mg Se/kg, vendar imajo zaradi velike uporabe v prehrani prav tako velik prispevek k dnevnemu vnosu

selen. Najbogatejši naravni vir selena pa so brazilski oreški (53 $\mu\text{g/g}$), saj že z zaužitjem enega orečka zadovoljimo dnevno potrebo po tem elementu (Reilly, 2002).

Literatura navaja, da se je treba izogibati enostranskim prehranjevalnim navadam. Rizične skupine za nezadosten vnos selena so osebe z enostransko prehrano, npr. strogi vegani ter osebe s prehrano z malo energije in beljakovinami (Referenčne vrednosti ..., 2004).

Vsebnost selena v hrani in pijači variira. Poznamo predele po svetu, ki so bogati s selenom, kot tudi tiste, kjer zemlja in voda vsebujeta zelo malo selena, in s tem je posledično njegova vsebnost majhna tudi v živilih (Foster in Sumar 1997, Navarro - Alarcon in Cabrera - Vique, 2008). Pšenica iz ZDA in Kanade ima visoko koncentracijo selena, saj prihaja z območij, kjer so tla bogata s selenom, pšenica iz Evrope pa prihaja z območij z nizko koncentracijo selena (Reilly, 2002).

2.3 ARZEN

Nemški alkimist Albertus Magnus (1193–1280) je bil prvi, ki je leta 1250 izoliral arzen. Arzen spada v peto skupino periodnega sistema z atomskim številom 33 in relativno atomsko maso 74,92. Spada med metaloide, saj so fizikalne lastnosti arzena podobne kovinam (Molin, 2015).

Arzen je dvajseti najpogostejši element v zemeljski skorji, štirinajsti v morski vodi in dvanajsti najpogostejši element v človeškem telesu (Woolson, 1975). Prisotnost arzena v okolju je lahko:

- Naravnega izvora (60 %): v okolje pride s pomočjo vulkanske aktivnosti, spiranja mineralov, preperevanja kamnin ter z biološko aktivnostjo.
- Antropogenega izvora (40 %): v okolje pride s predelavo rudnin, z izgorevanjem fosilnih goriv, z odpadki kemijske in farmacevtske industrije, z uporabo pesticidov, farmacevtskih preparatov in detergentov ter z erozijo zemlje. Antropogeni izpust arzena v 20. stoletju naj bi znašal približno 110.000 ton letno, kar je 2,5-krat več kot pri preperevanju kamnin (Moore in Ramamoorthy, 1984; Codex alimentarius commission, 1999).

Arzen obstaja v štirih oksidacijskih stanjih: -3 (arzin), 0 (elementarni arzen), $+3$ (arzenit) in $+5$ (arzenat). Večina arzenovih spojin, ki jih najdemo v organizmih in hrani, je v petvalentnem oksidacijskem stanju (Molin, 2015).

Arzen se v naravi nahaja v različnih anorganskih in organskih spojinah. Metabolizem in toksičnost teh spojin se močno razlikujeta. Medtem ko je anorganski arzen (predvsem

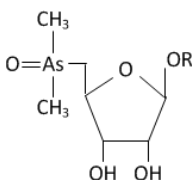
Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obroki slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

arzenit) praktično sinonim za strup, so metilirane spojine mnogo manj toksične, arzenobetain pa je po doslej znanih podatkih celo v 300-krat večji količini kot arzenit povsem neškodljiv (V. Stibilj, Z. Šlejkovec, LP 2004, MORS).

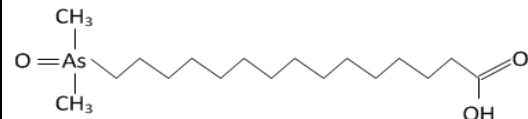
Običajne arzenove spojine v morski hrani ter njihovo strukturo prikazuje preglednica 3.

Preglednica 3: Arzenove spojine (Molin, 2015)

Spojina	Akronim	Kemijska struktura	Nahajanje
Arzenit	As(III)	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Zelo toksičen in karcinogen za ljudi.
Arzenat	As(V)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{As}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Zelo toksičen in karcinogen za ljudi. Predstavlja glavno obliko arzena v morski vodi in onesnaženi pitni vodi.
Anorganski arzen	Ias		Seštevek arzenita in arzenata običajno imenujemo anorganski arzen. Pri ljudeh se večinoma metabolizira v DMA in MA. Najdemo ga predvsem v morski travi, lupinarjih in rižu.
Arzenobetain	AB	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}^+-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Je netoksičen in naj ne bi bil karcinogen za ljudi. V urinu se izloči nespremenjen. Je glavna oblika arzena v večini morske hrane.
Arzeno-sladkorji			Njihova toksičnost še ni znana. So glavna oblika arzena v užitnih algah in lupinarjih. Več kot 20 arzenosladkorjev naj bi imelo različno R skupino. Pri ljudeh so obsežno metabolizirani v glavnem v DMA.
Trimetil arzenil propionat	TMAP	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Manj pomembna oblika, prisotna v večini morske hrane.
Monometil arzenova (V) kislina	MA(V)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Spada v skupino potencialno karcinogenih snovi za ljudi. Metabolit anorganskega arzena v urinu pri ljudeh.
Monometil arzenova (III) kislina	MA(III)	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Toksična spojina, pomembna za način toksičnega delovanja arzena. V hrani običajno ni prisotna, prisotna pa je v nekaterih človeških vzorcih urina kot metabolit anorganskega arzena.

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: Arzenove spojine (Molin, 2015)

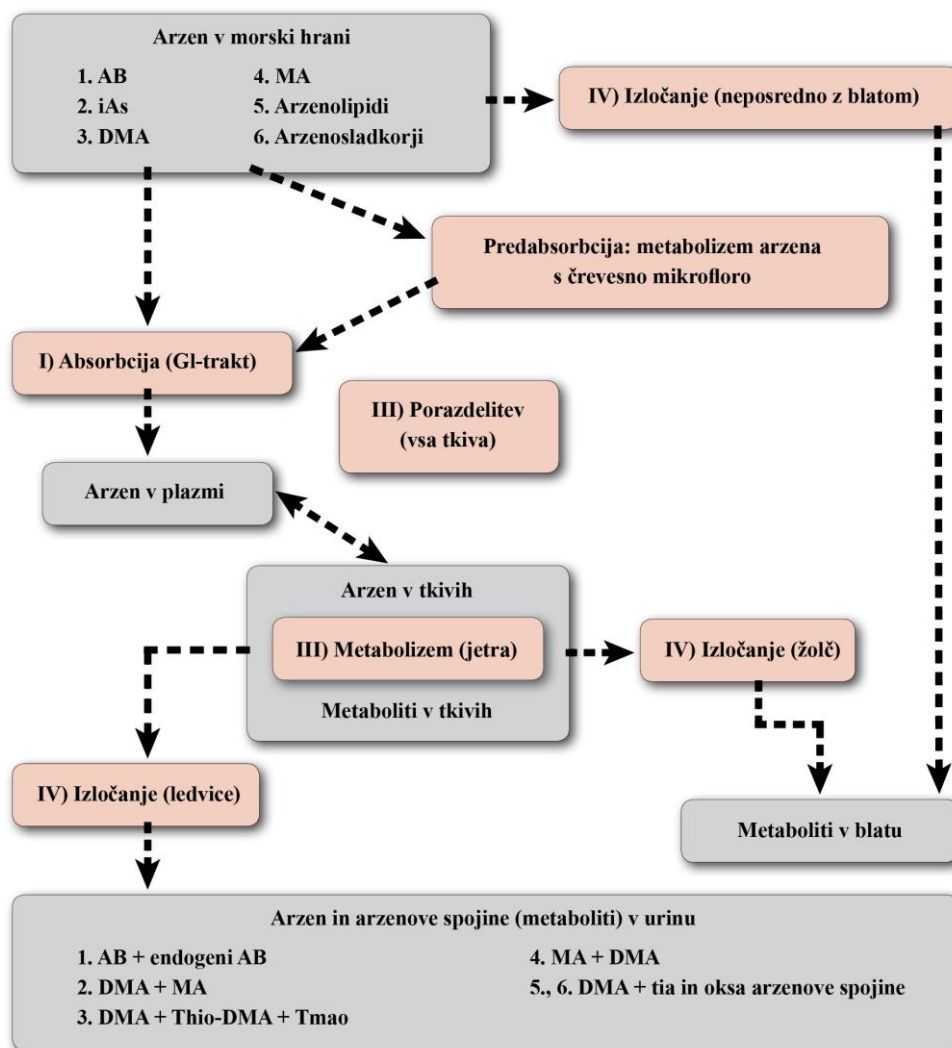
Spojina	Akronim	Kemijska struktura	Nahajanje
Dimetil arzenova (V) kislina	DMA(V)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Potencialno karcinogena za ljudi. V manjšini prisotna v morski hrani. Je glavni metabolit anorganskega arzena, arzenosladkorjev in arzenolipidov.
Dimetil arzenova (III) kislina	DMA(III)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Zelo toksična. Zelo nestabilna (reaktivna) spojina, ki jo je težko izmeriti. Ni prisotna v hrani, našli pa so jo v nekaterih človeških vzorcih urina kot metabolit anorganskega arzena.
Trimetil arzenov oksid	TMAO	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}=\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Manj pomembna arzenova spojina, prisotna v morski hrani.
Tetrametil arzonijev ion	TETRA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Velja za toksično spojino. Manj pomembna arzenova spojina, prisotna v morski hrani. Našli so ga tudi v morski hrani, ki je bila obdelana pri visoki temperaturi (> 150 °C).
Arzenoholin	AC	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Netoksična spojina. V morski hrani je prisotna v sledovih. V biološkem sistemu oksidira v AB.
	Thio-DMA	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Potencialno toksična spojina. Metabolit anorganskega arzena in arzenosladkorjev, verjetno kot rezultat predabsorpcijskega metabolizma v GI traktu.
Arzenolipidi	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{O}=\text{As} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$  So arzenove spojine: arzen vsebujoče maščobne kisline, arzen vsebujoče ogljikovodiki, arzenosladkorji – fosfolipidi in kationski trimetilarzeno maščobni alkoholi. Najdemo jih tako v ribjem olju in mastnih ribah kot tudi v drugi morski hrani. Skupaj z DMA se metabolizira kot glavni metabolit v urinu, pri tem pa nastajajo reaktivni vmesni produkti.		

2.3.1 Presnova arzena in arzenove spojine

2.3.1.1 Absorpcija in izločanje arzena

Večina arzena v organizem prihaja z absorpcijo iz prebavnega trakta, vstopa pa lahko tudi preko dihal in kože. Absorpcija arzena iz prebavil je odvisna od njegove zvrsti, topnosti in oblike (Srebočan, 1993). Sestava hrane kot tudi prisotnost drugih komponent hrane v prebavnem traktu vplivajo na absorpcijo arzena. Arzenove spojine, ki so topne v vodi, se lažje absorbirajo kot spojine topne v lipidih (EFSA, 2009).

Po resorpciji iz prebavnega trakta arzenove zvrsti prehajajo v jetra, nato pa v krvni obtok. Pri tem se lahko spremeni njihova kemijska oblika. Absorbirani arzen se v različna tkiva vgrajuje v različnih količinah. Na splošno velja, da se največ arzena naloži v jetra, ledvice in kostni mozeg (Srebočan, 1993).



Slika 4: Prikaz absorpcije, distribucije, presnove in izločanja arzenovih spojin iz morske hrane (Molin, 2015)

Večji del arzena se iz organizma izloči z urinom, v manjši količini pa tudi z blatom in žolčem. Ostale poti izločanja so v glavnem nepomembne, čeprav se nekaj arzena izloči tudi z znojem ali preko kože, nekaj pa se ga naloži v dlako in nohte (Molin, 2015). Na izločanje arzena preko ledvic močno vpliva stopnja metiliranosti spojin. Iz organizma se najhitreje izločajo monometilirane spojine, počasneje dimetilirane, najpočasneje pa nemetilirane spojine. Tudi petvalentne spojine se izločajo hitreje kot trivalentne (Buchet in sod., 1981).

2.3.1.2 Toksičnost arzena

Toksičnost arzena je precej poznana, saj so njegovo strupenost poznali že stari Grki. Arzenov (III) oksid (As_2O_3), prah belo-rumene barve brez vonja in okusa, je bil pogosto uporabljen v morilske namene (Srebočan, 1993).

Zastrupitvi z arzenom sledi slabost, bruhanje, diareja, pekoče bolečine v ustih in grlu, bolečine v trebuhu, glavobol, zaspanost in zmedenost (Šlejkovec, 1994). Posledice dolgotrajnega uživanja arzena (kronična izpostavljenost) so lahko kožne spremembe, vključno s spremembami pigmentacije in debeljenjem kože, kasneje pa tudi kožni rak ter rak ledvic in mehurja (Timbrell, 2005).

Anorganske arzenove spojine so na splošno bolj strupene od organskih. Znano je, da so petvalentne anorganske spojine arzena (npr. arzenati) manj toksične od trivalentnih (npr. arzeniti). Najbolj toksična oblika anorganskega arzena pa je plin arzin ali arzenov hidrid (AsH_3), ki po absorpciji v krvi povzroči hemolizo in s tem vpliva na dihanje celic v tkivih. Strupenost organskih spojin je ravno tako odvisna od oksidacijskega stanja arzena, saj to vpliva na resorpcijo, razporeditev arzena v organizmu ter izločanje spojin. Enako kot pri anorganskih spojinah so tudi trivalentne organske spojine bolj strupene od petvalentnih. Trivalentne organske in anorganske spojine arzena imajo afiniteto do sulfhidrilnih (-SH) skupin, zato inhibirajo nekatere encimske sisteme. Za arzenate je dokazano, da preprečujejo oksidativno fosforilacijo v mitohondrijih, in sicer tako, da pride do substitucije anorganskega fosforja z arzenom. Te spojine povzročajo tudi abnormalnosti na kromosomih, kjer ravno tako prihaja do substitucije fosfata v DNA-verigi z arzenatom (Srebočan, 1993).

Čeprav je med ljudmi razširjeno prepričanje o toksičnosti arzena, pa elementarni arzen ni strupen za ljudi in živali (Srebočan, 1993). Za podgane, kokoši, morske prašičke in koze je celo esencialen, po nekaterih predvidevanjih pa naj bi bil esencialen tudi za človeka. Potrebe odraslega človeka po tem elementu naj bi bile med 12 in 25 μg na dan (Anke 1986, Nielsen 1991). Pri človeku arzen katalizira sintezo glutationa, stimulira izločanje žolča ter se vključuje v metabolizem arginina, membranskih fosfolipidov in cinka (Mayer in sod., 1993).

2.3.1.3 Metilacija arzena

Pri večini sesalcev, vključno z ljudmi, se anorganske arzenove spojine obsežno presnavljajo in izločajo večinoma kot njihovi metaboliti. Presnova arzena vključuje procese redukcije in metilacije. Metilacija arzenovih spojin je proces detoksifikacije, ker se

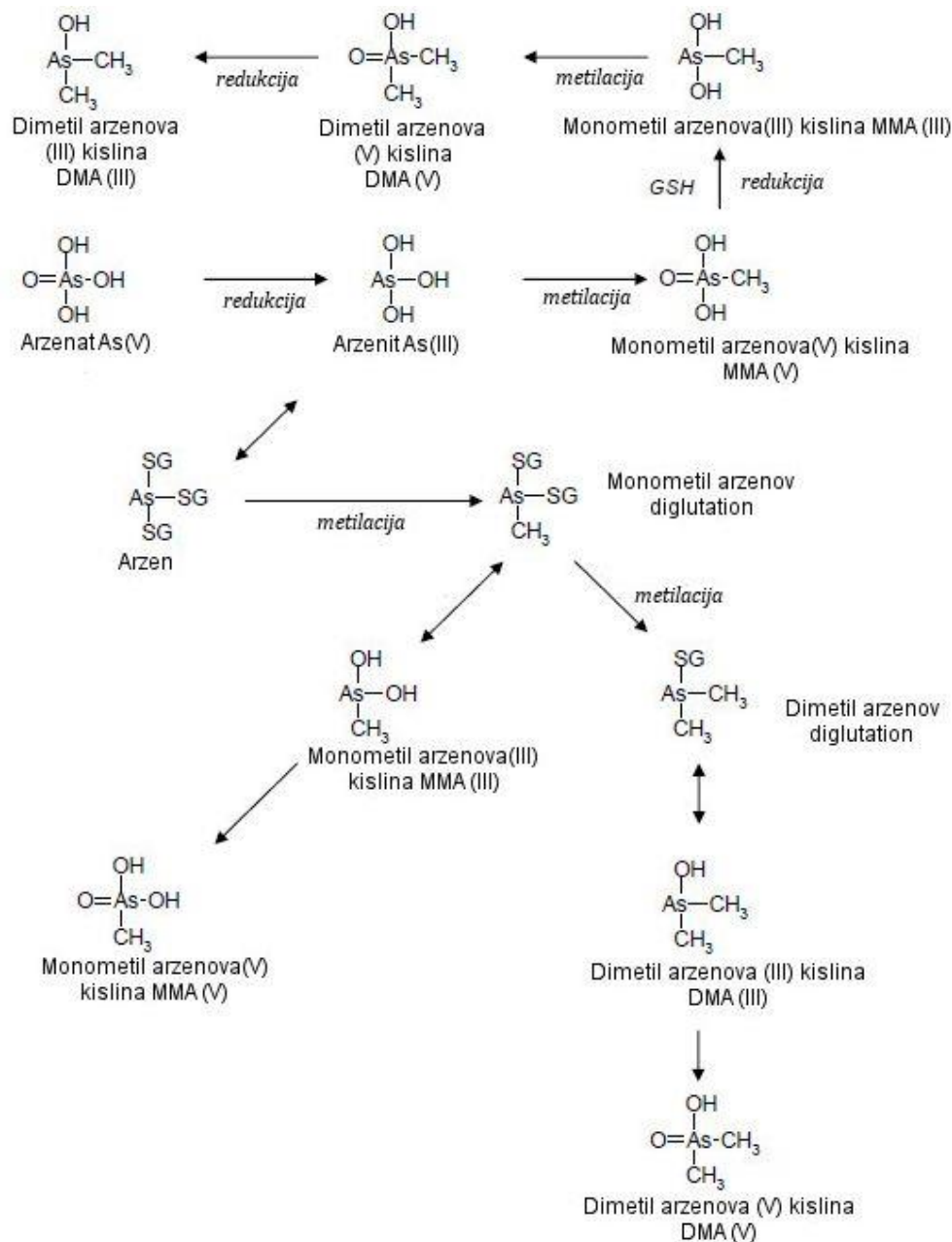
metilirani metaboliti manj pogosteje in rahleje vežejo na sestavine tkiv kot anorganske oblike arzena (Vahter in Marafante, 1983, cit. po Vahter in Marafante, 1993).

Arzenat As(V) vstopa v celice in se z glutathion reduktazo in tudi purin-nukleozid fosforilazo (PNP) encimsko presnavlja (50–70 % pri sesalcih) v bolj reaktiven arzenit As(III) (Aposhian in sod., 2004).

Pri sesalcih je As(III) podvržen oksidativni metilaciji v jetrih. Z dodajanjem metilnih skupin, katerih donor je S-adenozilmetionin, nastane MMA(V). Metilacija poteka pod vplivom arzenove metiltransferaze. MMA(V) se potem reducira do MMA(III) z glutathion S-transferazo ω 1, znano tudi kot MMA reduktaza (Tseng, 2008).

Dimetil arzenova (V) kislina (DMA^{V}) je prevladujoča oblika presnove anorganskega arzena pri sesalcih. Iz organizma se izloča zelo hitro in tudi na tak način zmanjšuje njegovo toksičnost (Hughes, 2002).

Ob odkritju DMA^{III} in MMA^{III} se poraja dvom, da metilacija ne pomeni nujno samo mehanizma detoksifikacije, saj sta MMA^{III} in DMA^{III} bolj toksična od anorganskega arzena. MMA^{III} predstavlja najbolj strupen metabolit anorganskega arzena (Molin, 2015).



Slika 5: Metabolne poti anorganskega arzena pri sesalcih (Cui in sod., 2008)

Pri presnovi arzena obstajajo precejšnje razlike med organizmi. Večina živali ima večjo sposobnost metilacije arzena v DMA kot ljudje, izjema pa so šimpanzi in opice črne marmozetke, ki arzena sploh ne metilirajo (Cui in sod., 2008), saj nimajo ali pa jim primanjkuje arzenove metiltransferaze v jetrih (Aposhian, 1997). Na presnovo arzena pri ljudeh vpliva več različnih faktorjev, kot so starost, spol, prehranjenost in rasa.

2.3.1.4 Interakcija arzena s selenom

Pri mnogih živalskih vrstah in tudi pri ljudeh so bili potrjeni antagonistični učinki ali medsebojna detoksikacija med arzenom in selenom. Povečanje vsebnosti enega od elementov povzroča sproščanje, ponovno porazdelitev ali izločanje drugega elementa preko urina, žolča ali z dihanjem. Sposobnost arzena, da pospešuje izločanje selen v črevesje, je bila opažena pri mnogih eksperimentih, pri katerih so bile uporabljene različne količine, oblike arzena in selen ter različni časovni intervali med vnosom arzena in selen. Posledično arzen znižuje količino selen v okostju, krvi in izdihanem zraku. Ugotovili so, da arzen in selen reagirata v jetrih in oblikujeta konjugat z glutationom, ki se izloči v žolč (Berry in Galle, 1994).

2.3.2 Arzen v hrani

V normalnih razmerah je dnevna količina arzena, ki pride v organizem z vodo in zrakom zanemarljiva, saj znaša le nekaj μg . Poglavitni vir arzena je hrana. Obstajajo pa precejšnje razlike v količini zaužitega arzena, ki so posledica različno sestavljenih obrokov. Velik vpliv ima predvsem delež hrane morskega izvora (Environmental ..., 1981, cit. po Knez, 1995).

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) je leta 1988 kot sprejemljiv vnos anorganskega arzena v telo postavil PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake), ki znaša $15 \mu\text{g/kg}$ telesne teže na teden. Odbor za onesnaževala v prehranski verigi Evropske agencije za varno hrano EFSA (European Food Safety Authority) je v poročilu iz leta 2009 na podlagi novih toksikoloških študij zaključil, da predlagani PTWI ni več primeren. Študije so namreč pokazale, da anorganski arzen povzroča raka pljuč, sečnega mehurja in kože ter ima vrsto drugih škodljivih učinkov pri izpostavljenosti nižji od tiste, ki jo je postavil JECFA. Območje BMDL_{01} (Benchmark Dose Lower Confidence Limit je odmerek, pri katerem s 95% verjetnostjo pričakujemo, da se škodljiv učinek ne bo pojavil pri 99 % ljudi ali več), določeno s strani EFSA, se giblje od 0,3 do $8 \mu\text{g}$ na kilogram telesne teže na dan, kar pomeni, da za določene ljudi ni izključeno tveganje (EFSA, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci

Naš vzorčni material so bili celodnevni obroki vojaške hrane, skupaj 15 vzorcev. Hrana je bila pripravljena skladno s predpisanimi jedilniki in recepturami za pripravo jedi v Slovenski vojski (Pograjc, 2001). Jedilniki so predstavljeni v preglednici 1. Vzorce smo vzorčili v vojašnici Vipava v letu 2005, in sicer v mesecih: maj, oktober in november.

Za določanje arzena smo uporabili tudi nekaj vzorcev ribjih izdelkov, kupljenih v večjih trgovskih centrih v Ljubljani marca 2005 (Volk, 2006). Ti vzorci so predstavljeni v preglednici 2.

Preglednica 4.: Jedilniki celodnevni vojaških obrokov, vzorčenih v vojašnici Vipava leta 2005 (Pograjc, 2011)

Celodnevni obrok	Zajtrk	Kosilo	Večerja
1	bela kava	cvetačna juha	rižota s svinjskim mesom
	med	mesne kroglice	paradižnikova solata
	maslo	paradižnikova omaka	sadna pijača
	šunka, prešana, pust	pire krompir	kruh
	jabolko	sestavljena solata	
	kruh	sadna pijača	
		kruh	
		sadje (banana)	
2	čaj	paradižnikova juha z rižem	golaževa juha
	sirni namaz	dunajski zrezek, svinjski	krof
	mortadela	pečeni krompir	kruh
	rulada	sestavljena solata	ledeni čaj
	jabolko	pomaranča	
	kruh	kruh	
		sadna pijača	

se nadaljuje

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obrokih slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Nadaljevanje preglednice 4: Jedilniki celodnevni vojaških obrokov, vzorčenih v vojašnici Vipava leta 2005 (Pograjc, 2011)

Celodnevni obrok	Zajtrk	Kosilo	Večerja
3	čaj	gobova juha, instant	bograč golaž
	pariška salama	puranov zrezek	kruh
	maslo	smetanova omaka	banana
	jogurt, tetrapak	kruhovi cmoki, ind.	
	bombeta	sestavljena solata	
	hruška	sadna pijača	
	kruh	kruh	
		pomaranča	
4	čaj	zdrobova juha	pišč. obara z zelenjavo
	ribe z zelenjavo	goveji zrezek	vaniljeva rezina
	topljeni sir	kranjska omaka	gosti sok, breskev, 0,2 l
	štrukelj	peteršiljev krompir	sadje (hruške)
	jabolko	sestavljena solata	kruh
	kruh	sadna pijača, 0,5l	
		sadje (pomaranča)	
		kruh	
5	bela kava	krompirjeva enolončnica	makaronovo meso
	sirni namaz, 100 g	hrenovke	zelena solata
	mortadela, 50 g	sladica (napolitanke)	sadje (jabolko)
	sadje (hruške)	sadje (banana)	kruh
	kruh	kruh	
		Fruc, 500 ml	
6	kruh, 2 kosa	juha prežganka	ričet s suhim mesom
	jabolko, 2x	zelenjavni riž	kruh, polbeli
	sirni namaz s smetano	ocvrto piščančje bedro	kompot
	muesli z mlekom, 126 g Mlinotest	zelena solata + radič s krompirjem	
	ledeni čaj, breskev, 0,5 l	kruh, polbeli	
		mini rulada Gorenjka	
		pomaranča	
		ledeni čaj, breskev, 0,5l	

se nadaljuje

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obrokih slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Nadaljevanje preglednice 4: Jedilniki celodnevni vojaških obrokov, vzorčenih v vojašnici Vipava leta 2005 (Pograjc, 2011)

Celodnevni obrok	Zajtrk	Kosilo	Večerja
7	čaj, zeliščni	grahova kremna juha	oslič po dunajsko
	zimska salama, 70 g	čebulna bržola	krompirjeva solata
	čokoladni namaz, 40 g	omaka	ledeni čaj
	kruh, polbeli	krompirjevi svaljki	kruh, polbeli
	sok, redek, 2 dcl, pakirano	zelena solata + radič s krompirjem	
	jabolko (slaba)	kruh, polbeli	
		Fruc, kor., pomaranča, 0,5 l	
8	mleko	gobova juha	sirovi ravioli
	čokoladni namaz	postrv po tržaško	omaka
	kruh, polbeli	petersiljev krompir	zeljna solata s fižolom
	sendvič, ind.	brokoli z margarino	sadje
	ledeni čaj	radič s krompirjem	kruh, polbeli
	banana	kruh, polbeli	
		rulada	
9	bela kava	zelenjavna juha	goveji golaž
	maslo, 20 g	svinjska pečenka	polenta
	marmelada, 25 g	zelenjavni riž + omaka	zelena solata
	jetrna pašteta, 50 g	rdeča pesa v solati	rulada
	kruh, polbeli	kompot, mešani	kruh, polbeli
	jabolko	kruh, polbeli	
		Fruc, korenje	
10	čaj, zeliščni	paradižnikova juha z rižem	krompirjeva musaka
	kranjska klobasa	ocvrte sardele	konzervirana mešana solata
	kruh, polbeli	krompirjeva solata	jabolko
	kolač s koščki čokolade	kruh, polbeli	tekoči sadni jogurt, 250 g
	hruške	gosti sok, breskev, Fructal	kruh, polbeli
	gorčica		

se nadaljuje

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obrokih slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Nadaljevanje preglednice 4: Jedilniki celodnevni vojaških obrokov, vzorčenih v vojašnici Vipava leta 2005 (Pograjc, 2011)

Celodnevni obrok	Zajtrk	Kosilo	Večerja
11	bela kava	cvetačna juha	rižota s svinjskim mesom
	med	mesne kroglice	radič s krompirjem
	maslo	paradižnikova omaka	banana (neto)
	šunka	krompirjev pire	ledeni čaj
	kruh	fižolova solata	kruh
	jabolko	sok, 2 dcl	
		kruh	brokolijeva juha
12	čaj	kostna juha z zakuho	skutini štruklji
	sir, lahki Jošt	puranov zrezek v smetanovi omaki	kompot, hruškov
	šunka, prešana	krompirjevi ocvrtki	kruh, polbeli
	žemlja, velika	zelenjavna obloga	
	kruh, polbeli	radič s krompirjem	
	jabolko	kruh, polbeli	
		jabolko	
13	čaj, zelenjavni	pasulj	carski praženec
	topljeni sir	suho meso	jabolčni pire
	ribe z zelenjavo	paprika, vložena	
	kruh, polbeli	kruh, polbeli	
	sirova štručka	vaniljeva rezina, ind.	
	čokoladno mleko	jabolko	
	hruške	gorčica	
		ledeni čaj	
14	bela kava	kostna juha z zakuho	špageti z gobami
	trdo kuhano jajce	sesekljana pečenka	zelena solata
	pašteta iz zelenjave in morskih rib	kremna špinača	banana cela
	kruh, polbeli	krompirjev pire	ledeni čaj
	francoski rogljič	kruh, polbeli	kruh, polbeli
	jabolko	nektar iz pomaranč	

se nadaljuje

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obroki slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Nadaljevanje preglednice 4: Jedilniki celodnevni vojaških obrokov, vzorčenih v vojašnici Vipava leta 2005 (Pograjc, 2011)

Celodnevni obrok	Zajtrk	Kosilo	Večerja
15	čaj, sadni, filter	goveja juha z zakuho	kuhana govedina
	piščančje prsi v ovitku, 50 g	pečen piščanec, bedra	kremna špinača
	maslo, 2 x 15 g	ohrovtova prikuha s krompirjem	peteršiljev krompir
	kruh, polbeli	konzervirana solata, mešana	jabolčni zavitek
	štrukelj	zdrobov narastek	kruh
	hruška	kruh	
		jabolčni nektar, 2 dcl	

Preglednica 5.: Seznam vzorcev ribjih izdelkov, kupljenih marca 2005 v Ljubljani (Volk, 2006)

Ribji izdelek	Naziv izdelka	Vrsta dodatka	Lot številka	Neto masa (g)	Masa mesa (g)	Rok uporabe	Proizvajalec*/država
1	Sardine v rastlinskem olju	Rastlinsko olje	PA 1	115	85,5	31. 12. 2010	A/Hrvaška
2	Tuna v olivnem olju	Oljčno olje	L4099 B	160	114,7	31. 12. 2008	A/Italija
3	Fileti skuše v semenskem olju	Semensko olje	P29 U04 02	125	91,8	Do konca leta 2005	B/Hrvaška
4	Tunina v naravnem soku	Naravni (lastni) sok	B L4279N	160	102,7	31. 12. 2007	A/Italija
5	Fileti skuše v lastnem soku		L-031 021	125	80,3	21. 4. 2005	A/Slovenija
6	Losos v lastnem soku		3113P08 13C	170	126,9	17. 8. 2005	A/ZDA

*Z velikimi črkami so označeni različni proizvajalci

Certificiran referenčni material (CRM)

Za preverjanje pravilnosti in obnovljivosti analizne metode pri določanju vsebnosti arzena in selena smo analizirali dva certificirana referenčna materiala:

- Certificiran referenčni material (CRM) Typical Diet 1548a,
- Certificiran referenčni material (CRM) DORM-2 Dogfish Muscle and Liver Certified Reference Materials for Trace Metals.

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.),
- metanol (Merck p. a.),
- NaOH (Fluka),
- NaBH_4 (Karl Erbach),
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Fluka),
- V_2O_5 (Merck, p. a.),
- 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 v temnem prostoru,
- 1,2 % NaBH_4 v 0,1 mol/l NaOH : 2 g NaOH smo raztopili v 500 ml Milli Q vode, dodali 6 g NaBH_4 in shranili pri 4 °C do porabe; raztopino smo pripravljali dnevno,
- standardna raztopina na zalogo Se(IV) v 5 % HNO_3 (Merck, 1005 ± 10 mg/l),
- standardna mesečna raztopina Se(IV) (10 µg/l); 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 0,2–5 ng Se/g, z redčenjem z 0,5 M HCl zaradi nestabilnosti raztopin,
- AsB (Community Bureau of Reference – BCR; CRM 626, arsenobetaine solution),
- MMAA (darilo Karl-Franzens University Graz, Avstrija),
- raztopine arzenovih spojin, ki vsebujejo 1000 mg/l arzena (As(III) , As(V) , MMAA, DMAA, vse Merck, Nemčija) ali 1000 mg/l AsB, so pripravljene v vodi in shranjene v hladilniku,
- delovne raztopine arzenovih spojin s koncentracijo 10–100 ng/ml so pripravljene dnevno sveže.

Aparature:

- analitska tehtnica (METTLER AE 240 S),
- avtomatska tehtnica (METTLER PM 460 DR),
- mlin (FRITSCH),
- ahatni planarni mikro mlin (FRITSCH, Pulverisette 7),
- grelni blok (Termoproc TBGE),

- atomski fluorescenčni spektrometer (EXCALIBUR, PS Analytical),
- peristaltična črpalka (ISMATEC, MCP 380),
- rekorder (SERVOGOR 102),
- rotavapor (Büchi),
- ultrazvočna kopel,
- HPLC peristaltična črpalka (KNAUER).

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

3.2 METODE DELA

Odvzem in priprava vzorcev za analizo

Obroke, ki so jih pripravili v vojašnici v Vipavi, smo vzorčili po vnaprej določenem protokolu. Za analizo smo odvzeli 15 celodnevni vojaški obroki. Vsak celodnevni obrok smo odvzeli v treh ponovitvah (Pograjc, 2011). Obroki so vsebovali zajtrk, kosilo in večerjo. Vzorce smo v vojaški kuhinji odvzeli enkrat dnevno in jih predhodno stehtane dostavili na Oddelek za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

3.2.1 Protokol za vzorčenje celodnevni obroki hrane (Stibilj in sod., 2002)

Celodnevne jedilnike smo vzorčili meseca maja, oktobra in novembra 2005. Za pravilne analize rezultate je odvzem tipičnega vzorca na ustrezen način zelo pomemben in lahko odločilno vpliva na rezultate analize. Pri odvzemu celodnevnega jedilnika smo upoštevali naslednje:

- Odvzeli smo posebej vsak obrok in vedno vse tri dnevne obroke. Vsak je predstavljal povprečen vojaški obrok in je vseboval vse z jedilnikom predpisane jedi. Celodnevni jedilniki so bili vzorčeni v vojaški kuhinji, kjer dnevno pripravijo vsaj 100 obroki.
- Obroke smo odvzeli neposredno z delilne linije. Odvzeli smo približno deseti, petdeseti in osemdeseti vzorec, torej je bil vsak analizirani celodnevni obrok povprečje treh celodnevni obroki.
- Vsako jed smo pred tem, ko smo jo dali v posodo, stehtali. Mase smo vpisovali v priložen obrazec.
- Obrok smo s krožnika stresli neposredno v suho in čisto plastično posodo s pokrovom. Do dostave vzorca na dogovorjeno lokacijo smo vzorec hranili v hladilniku.

- Vzorec smo dostavili v hladilni torbi ali izolirani (termo-) posodi na Oddelek za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.
- Jedi, ki so industrijsko pakirane, kot npr. porcijska marmelada, pašteta, jogurti, pakirane pijače in sadje, smo prav tako hranili v hladilniku v PE vrečki in jih oddali v analizo skupaj z vzorcem, ki je bil v posodi.
- Pijačo, ki je sestavni del obroka, smo zbrali posebej v čisti posodi.
- Kruh, ki je sestavni del celodnevnega jedilnika (vojaki si lahko dodatno vzamejo do 500 g), smo priložili preostalemu vzorcu ter ga shranili v čisto PE vrečko.

3.2.2 Homogenizacija celodnevni obrok

Celodnevne obroke hrane smo najprej stehali že v vojaški kuhinji. Na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani smo iz obrok odstranili neužitni del (kost, olupek, koža) in jih ponovno stehali. Za homogenizacijo smo uporabili mešalnik s titanovimi noži. Po končanem homogeniziranju smo celotno količino vzorca razdelili na podvzorce in jih shranili v zamrzovalniku pri $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorce smo nato liofilizirali.

Petnajst liofiliziranih podvorcev smo prenesli na Odsek za znanost o okolju na IJS. Vzorce smo zmleli v mlinu Fritsch, Pulverisette 7 (hitrost 4, čas mletja 9 minut). Velikost delcev je bila manjša od 0,2 mm. Do analize smo vzorce hranili v dobro zaprtih posodah v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Določitev selen

3.2.3.1 Razkroj vzorcev

Visoke 50-mililitrske teflonske posodice smo 24 ur namakali v raztopini reagenta (10% Micro 90), potem 24 ur v raztopini $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1$ in jih nato sprali z deionizirano vodo Milli Q (Millipore). V te stehane posodice smo odtehtali od 0,2 do 0,3 g vzorca.

Za razkroj smo dodali 0,5 ml koncentrirane H_2SO_4 in 1,5 ml 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 eno uro. Raztopine smo ohladili na sobno temperaturo, dodali 2 ml konc. H_2O_2 in v odprtih posodicah segrevali še 15 minut pri $115\text{ }^{\circ}\text{C}$, ponovno dodali 2 ml H_2O_2 in segrevali pri isti temperaturi še 10 minut. Na sobno temperaturo ohlajenim vzorcem smo dodali 0,1 ml razt. V_2O_5 v H_2SO_4 in približno 20 minut segrevali pri $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ do pojava modre raztopine. Za redukcijo smo ohlajenim raztopinam dodali 2,0 ml konc. HCl in segrevali 10 minut pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po redukciji smo ohlajene raztopine redčili na 20 g z Milli Q.

Na enak način kot vzorce smo pri vsaki seriji pripravili tudi certificiran referenčni material (Total Diet 1548a) in slepe vzorce (samo reagenti).

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

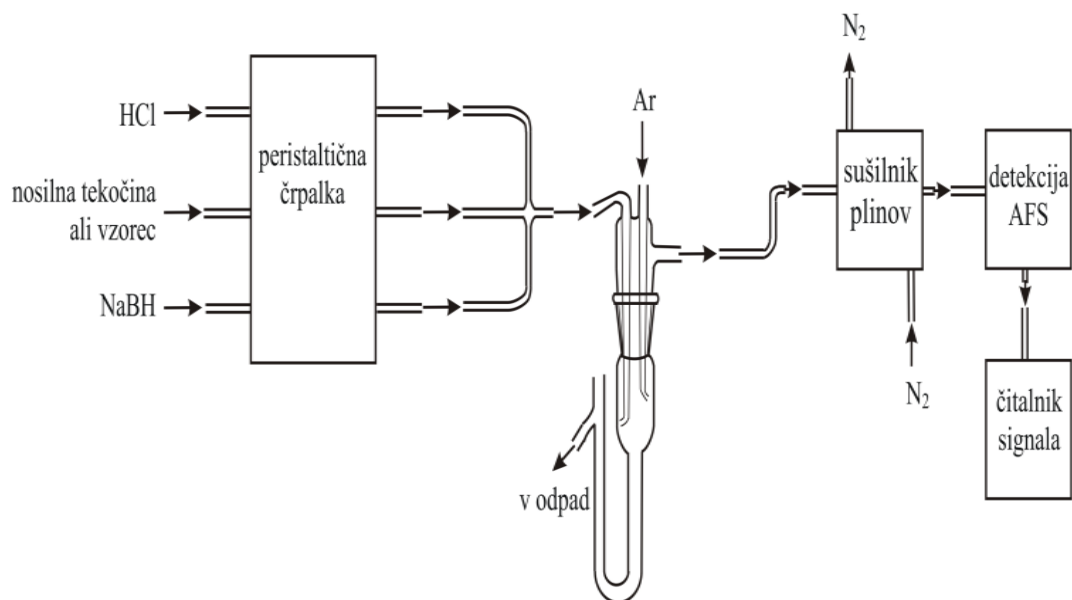
- enako maso selen, kot je bila ugotovljena v alikvotu vzorca,
- 2-krat večjo maso selen, kot je bila ugotovljena v alikvotu vzorca,
- 3-krat večjo maso selen, kot je bila ugotovljena v alikvotu vzorca.

Masa alikvota vzorca je bila 0,2 g.

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

3.2.3.2 Določitev selen s HG-AFS

Vsebnost selen v naših vzorcih smo določali s HG-AFS. Shema sistema HG-AFS je predstavljena na sliki 6.



Slika 6: Shema sistema HG-AFS

Hidridna tehnika v povezavi z AFS je metoda z visoko občutljivostjo, saj hidridna tehnika vključuje ločitev analita od osnove, s tem pa se izognemo interferencam (Dedina, 1995). Uporablja se za določitev elementov v sledovih, kot so As, Se, Sn in Te. Osnova hidridne

tehnike je ločitev elementov, ki tvorijo hlapne hidride, od osnove vzorca. Sestavljena je iz dveh procesov:

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

Princip AFS je absorpcija svetlobe, ki jo prosti atomi absorbirajo iz črtastega ali kontinuiranega izvora, pri prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje pa fluorescirajo. Poznanih je več vrst fluorescence, ki imajo različen način vzbujanja in oddajanja svetlobe. 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 običajno fotopomnoževalka (Vandecasteele in Block, 1993).

Merili smo pri optimalnih pogojih, ki so navedeni v literaturi (Mazej, 2002). Za nosilno tekočino smo uporabili 2 mol/l HCl s pretokom 1 ml/min. V križnem spoju sta reagirali nosilna tekočina z 2 mol/l raztopino HCl (pretok 8 ml/min) in 1,2 % raztopino NaBH₄ v 0,1 mol/l raztopini NaOH (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 plinske in tekoče faze. 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 dodatnim napajanjem (Super Lamp Photron, valovna dolžina 196 nm; primarni tok 20 mA; sekundarni tok 25 mA). Odziv detektorja smo zabeležili z rekorderjem in izmerili višine vrhov.

Pravilnost in obnovljivost metode smo preverili z uporabo standardnih referenčnih materialov Typical Diet 1548a in DORM 2.

3.2.4 Določitev arzena in njegovih spojin

3.2.4.1 Določitev arzena z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA)

RNAA uporabljamo za določanje nekaterih elementov, ki so problematični za analizo z drugimi kemijskimi metodami (npr. Au, As, I, Se) v nizkih koncentracijskih območjih. Ta vrsta analize je primerna za biološke materiale in kot referenčna metoda za ostale analize

tehnike. Pri tej metodi po obsevanju vzorca sledi separacija motečih komponent matriksa oz. koncentriranje posameznega inducirane nuklida. Ker odstranimo negativen vpliv matrice, RNAA metoda omogoča določanje elementov v sledovih.

Vsebnost arzena v vzorcih smo določili z RNAA, kot je opisana v literaturi (Byrne in Vaskelj, 1974).

Metoda zahteva posebne pogoje dela, zato je že tehtanje in priprava vzorcev za analizo potekala v drugem laboratoriju, v čisti sobi. Najprej smo v polietilenske ampule, očiščene z raztopino HNO_3 in vode (1 : 1), odtehtali približno 2,0 g vzorca, ampule zatalili ter zavarili v PVC vrečke. Vzorce smo skupaj s standardi z znano koncentracijo (10 ng As/g) obsevali v pnevmatskem sistemu jedrskega reaktorja TRIGA MARK II Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani, kjer je bil fluks nevtronov $1,5 \cdot 10^{12} \text{ ncm}^2\text{s}^{-1}$ in pa v vrtiljaku reaktorja, s pretokom nevtronov $1,8 \cdot 10^{12} \text{ ncm}^2\text{s}^{-1}$. Čas obsevanja smo prilagodili pričakovanim koncentracijam arzena v vzorcu.

Po razpadu kratkoživih izotopov, to je 1–2 dneva po obsevanju, je sledila radiokemična separacija arzena. Obsevane vzorce smo s spiranjem polietilenske ampule z nekaj mL koncentrirane HNO_3 prenesli v kvarčno Kjeldahlovo bučko. Pred kemijskim razkrojem smo v bučko dodali 200 mg raztopine arzenovega nosilca (1 mg As mL^{-1}) in 7 mL H_2SO_4 (1 : 1, v/v). Nato smo s segrevanjem in dodajanjem koncentrirane HNO_3 vzorce razkrojili do SO_3 par, do svetlo rumene barve. Sledila je popolna odstranitev dušikovih oksidov, in sicer z dodajanjem H_2O_2 ter ponovnim segrevanjem do SO_3 par, do brezbarvne raztopine. Raztopino smo iz bučke prelili v lij ločnik ter bučko spirali z 2 mL H_2SO_4 (1 : 1) in vodo do volumna 15 mL. Po ohladitvi raztopine smo v ločnik odpipetirali 4 mL 5 M KJ in 6 mL toluena, raztopino 2 minuti stresali ter vodno fazo zavrgli. 5 mL organske faze smo odpipetirali v števno kiveto (Byrne in Vaskelj, 1974).

Gama aktivnost izoliranega nuklida ^{76}As smo merili na Ge-detektorju z utorom (Well New – type). Čas merjenja gama aktivnosti vzorca je bil odvisen od pričakovane vsebnosti arzena v vzorcu. Pri enaki geometriji smo izmerili tudi aktivnost ^{76}As v standardni raztopini.

3.2.4.2 Določitev arzenovih spojin

Za separacijo in določitev arzenovih zvrsti smo uporabili tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z uporabo UV-fotoreaktorja ter atomske fluorescenčne spektrometrijo (AFS) s hidridno tehniko (HG) (Šlejkovec in sod., 1999).

3.2.4.2.1 Ekstrakcija arzenovih spojin

V centrifugirko smo zatehtali 1 g vzorca in dodali 35 ml metanolno-vodne mešanice (9 + 1). Mešanico smo 24 ur stresali na stresalniku pri sobni temperaturi. Po stresanju je sledilo centrifugiranje ekstraktov na 3200 o/min, 5–10 minut. Tekočo fazo smo prelili v bučko, ostanek pa ponovno ekstrahirali s 15 ml topila metanol-voda (9 : 1) in topilo nato odstranili z rotavaporjem. Tako pridobljene posušene ostanke smo raztopili v 5 ml destilirane vode in jih prefiltrirali skozi 0,45 µm membranski filter. Vodne raztopine ekstraktov smo do analize hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.4.2.2 Separacija in detekcija

Za določitev As(III), As(V), MMAA in DMAA smo uporabili metodo HPLC-HG-UV-AFS. Vzorec smo injicirali z injektorjem, ki vbrizga preko in-line filtra (0,45 µm) v predkolono in dalje v anionsko kolono (Hamilton PRP-X100). Sledilo je on-line nakisanje s HCl in mešanje z NaBH₄ (oba smo dodali s peristaltično črpalko). H₂, ki se je tvoril, je reagiral z As(III), DMAA, MMAA in As(V) in tvoril ustrezne hidride – dimetilarzin (DMA), monometilarzin (MMA) in AsH₃. Mešanica tekočine in plinov (mobilna faza z vzorcem, kislina, borohidrid, H₂ in hidridi) se je v separatorju plina in tekočin A-tipa (GLS, PS Analytical) ločila na tok tekočine (odpadek) in plinov. Argon (nosilni plin) je odnesel iz GLS vse pline, ki so se on-line posušili v Perma-pure sušilcu (on-line sušenje s tokom dušika) in prišli v AFS. V AFS je H₂ zgorel z majhnim difuzijskim plamenom, v katerem je arzenov hidrid razpadel. Koncentracijo arzena smo izmerili z AFS-detektorjem. Za umerjanje smo uporabljali mešanico standardnih raztopin As(III), As(V), MMAA in DMAA. Stabilnost sistema smo preverjali s periodičnim injiciranjem standardov na kolono (2 standarda, 4–6 vzorcev, 2 standarda).

Za separacijo AsB smo uporabljali kationsko (Alltech Adsorbosphere SCX) kolono. Efluentu smo on-line s peristaltično črpalko dodali raztopino kalijevega persulfata (K₂S₂O₈) in NaOH. Efluent s persulfatom in NaOH je nato tekel skozi UV-enoto (FEP Teflon cevka navita okrog UV žarnice) in nato v enoto za tvorbo hidridov, kot je že opisano pri določanju anionskih spojin (As(III), As(V), MMAA in DMAA).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIMERNOST IN ZANESLJIVOST UPORABLJENIH METOD

Vsebnost selena smo analizirali z metodo HG-AFS. Z metodo standardnega dodatka, izračunom izkoristka celotnega analiznega postopka in določitvijo vsebnosti selena v standardnih referenčnih materialih smo ugotavljali primernost metode na tako kompleksnih vzorcih, kot so celodnevni vojaški obroki.

4.1.1 Metoda za določitev selena

- **Izkoristek celotnega postopka**

Izkoristek celotnega analiznega postopka smo določili tako, da smo vzorcu z znano predhodno določeno vsebnostjo selena dodali različne mase standardnih raztopin selena in jih razkrojili v zaprtih teflonskih posodah. Za ta postopek smo izbrali tri vzorce obrokov, in sicer vzorec z najmanjšo, vzorec s srednjo in vzorec z največjo vsebnostjo selena. Vsebnost selena po razkroju smo določili iz umeritvene krivulje. V preglednici 6 so rezultati posameznih določitev izkoristka in njegova povprečna vrednost. Povprečen izkoristek celotnega postopka je bil $92,6 \pm 8,4 \%$.

Preglednica 6: Izkoristek celotnega analiznega postopka za razkroj selena v zaprti teflonski posodi

Vzorec	Določitev	Masa Se (ng)				Izkoristek (%)
		V alikvotu vzorca	Dodana	Pričakovana	Izmerjena	
Obrok 1	1a	9,96	10,37	20,33	18,16	89,33
	1b	10,09	10,34	20,43	16,75	81,99
	2a	9,63	20,70	30,33	26,90	88,69
	2b	10,02	20,68	30,70	25,53	83,16
	3a	9,63	31,07	40,70	37,60	92,38
	3b	9,83	31,10	40,93	38,00	92,84
Obrok 13	1a	17,52	20,94	38,46	32,03	83,28
	1b	16,99	21,10	38,09	34,55	90,71
	2a	17,70	41,62	59,32	59,57	100,42
	2b	17,45	41,72	59,17	61,41	103,79
Obrok 8	1a	27,90	26,33	54,23	47,55	87,68
	1b	27,86	26,17	54,03	48,17	89,15
	2a	27,79	52,24	80,03	85,09	106,32
	2b	26,93	52,19	79,12	83,90	106,04
povprečje $\pm$ SD						92,6 $\pm$ 8,4

Maso selena v alikvotu vzorca smo izračunali na osnovi predhodno določene koncentracije selena v vzorcu. Maso selena smo dodali s standardnimi raztopinami s koncentracijami: 103,76 ng/g v vzorec 1 in 523,46 ng/g v vzorca 8 in 13.

- **Zanesljivost in pravilnost metode za določanje selena**

Zanesljivost in pravilnost metode smo preverili z določitvijo vsebnosti selena v standardnih referenčnih materialih. Uporabili smo standardni referenčni material Typical Diet 1548a, ki je po naravi najbolj podoben našim vzorcem in standardni referenčni material Dogfish Muscle Certified Reference Material for Trace Metals (DORM 2). Podatke smo podali kot povprečje $\pm$ standardni odmik (preglednica 7).

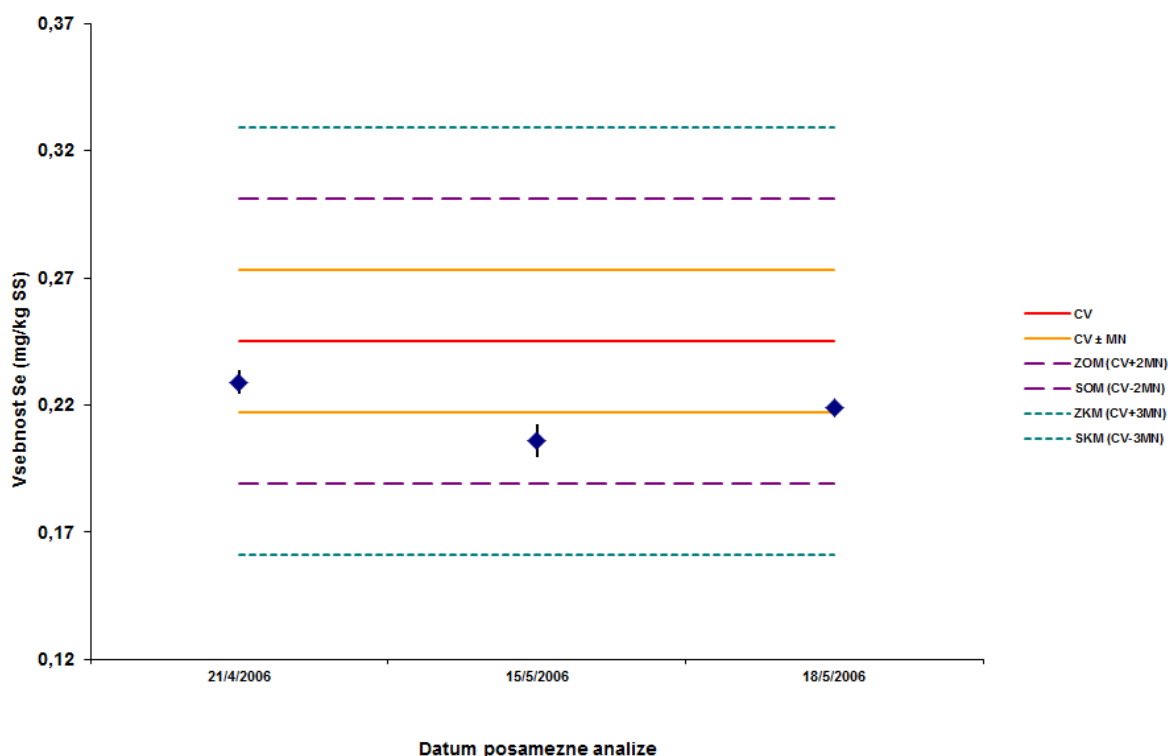
Preglednica 7: Vsebnost selena v standardnih referenčnih materialih (ng/g suhe snovi vzorca)

Vzorec	Vsebnost selena (ng/g)* $\bar{x} \pm SD$	Certificirana vrednost (ng/g)
Typical Diet (SRM 1548a)	218 ± 11 (n = 9)	245 ± 28
Dogfish Muscle Certified Reference Material for Trace Metals	1267 ± 63 (n = 3)	1400 ± 90

*n = število določitev, vsaka določitev je bila narejena v treh ponovitvah

Kot je razvidno iz preglednice 7, smo z našo analizo v referenčnem materialu Typical Diet določili 218 ± 11 ng Se/g, medtem ko je certificirana vrednost 245 ± 28 ng Se/g. V referenčnem materialu DORM 2 je naša vrednost znašala 1267 ± 63 ng Se/g, certificirana vrednost pa je 1400 ± 90 ng Se/g.

Za preverjanje pravilnosti in zanesljivosti smo uporabili tudi kontrolni diagram za določanje selena v standardnem referenčnem materialu Typical Diet. Rezultati so znotraj območja med spodnjo in zgornjo opozorilno mejo.



CV – certificirana vrednost (0,245 mg/kg), MN – merilna negotovost (0,028 mg/kg), SOM – spodnja opozorilna meja ($CV - 2 \cdot MN$), ZOM – zgornja opozorilna meja ($CV + 2 \cdot MN$), SKM – spodnja kritična meja ($CV - 3 \cdot MN$), ZKM – zgornja kritična meja ($CV + 3 \cdot MN$)

Slika 7: Kontrolni diagram določanja selena v standardnem referenčnem materialu Typical Diet 1548a

4.1.2 Metoda za določitev arzena

- Rezultati pravilnosti in ponovljivosti metode za določanje arzena**

Pravilnost in obnovljivost postopka smo preverili s certificiranim referenčnim materialom Typical Diet 1548a (preglednica 8).

Preglednica 8: Vsebnost celotnega arzena v certificiranem referenčnem vzorcu

Referenčni material	Celokupni arzen ($\mu\text{g/g}$)	
	Certificirana vrednost	Naša študija
CRM 1548a Typical Diet	$0,20 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$

Primerjava rezultatov za vsebnost arzena v certificiranem referenčnem vzorcu naše analize s certificirano vrednostjo kaže na dobro ujemanje.

4.2 VSEBNOST SELENA V CELODNEVNIH VOJAŠKIH OBROKIH

Namen našega dela je bil ugotoviti vsebnost selen v petnajstih celodnevni vojaški obrokih Slovenske vojske, vzorčeni v vojašnici Vipava. Vzorčili smo po 5 vzorcev v treh različnih obdobjih, in sicer od 9. do 16. maja, od 20. do 27. oktobra in od 14. do 22. novembra leta 2005. Rezultati so predstavljeni v preglednicah 9 in 10 ter shematsko prikazani na sliki 8.

Preglednica 9: Vsebnost selen v vzorcih celodnevni vojaški obrokov, podana v ng/g suhe snovi

Vzorec	Suha snov (%)	Vsebnost selen (ng/g SS) $\bar{x} \pm SD$
Obrok 1	18,61	56 $\pm$ 1
Obrok 2	21,25	50 $\pm$ 3
Obrok 3	22,76	85 $\pm$ 4
Obrok 4	20,02	83 $\pm$ 4
Obrok 5	23,36	77 $\pm$ 2
Obrok 6	20,97	64 $\pm$ 2
Obrok 7	21,36	112 $\pm$ 7
Obrok 8	24,86	136 $\pm$ 3
Obrok 9	22,64	59 $\pm$ 2
Obrok 10	24,40	115 $\pm$ 5
Obrok 11	23,13	56 $\pm$ 6
Obrok 12	26,27	52 $\pm$ 4
Obrok 13	24,17	95 $\pm$ 3
Obrok 14	22,66	138 $\pm$ 4
Obrok 15	26,14	71 $\pm$ 5

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obrokih slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Preglednica 10: Vnos selena ($\mu\text{g}/\text{dan}$) s celodnevnimi vojaškimi obroki

Opis vzorca		Masa vzorca (g)	Vsebnost Se (ng/g svežega vzorca)	Dnevni vnos Se (μg)
Sestava	Vzorec			
Obroki, ki ne vsebujejo rib	Obrok 1	3635	10,35	37,64
	Obrok 2	3181	10,60	33,71
	Obrok 3	3260	19,32	62,97
	Obrok 5	3150	18,04	56,81
	Obrok 6	3766	13,33	50,21
	Obrok 9	3090	13,29	41,08
	Obrok 11	3284	13,04	42,83
	Obrok 12	2748	13,72	37,69
	Obrok 15	3706	18,46	68,40
Povprečje			14,46	47,93
Obroki, ki vsebujejo ribe	Obrok 4	3392	16,59	56,28
	Obrok 7	3444	23,90	82,30
	Obrok 8	3330	33,89	112,83
	Obrok 10	2975	28,11	83,61
	Obrok 13	3040	22,87	69,51
	Obrok 14	3268	31,29	102,27
Povprečje		3285	26,11	84,47
Povprečje vseh obrokov				62,54

V preglednici 10 so podani rezultati vsebnosti selena v celodnevni vojaških obrokih. Povprečni dnevni vnos selena 15 vojaških obrokov je bil $62,5 \mu\text{g Se}/\text{dan}$. Najnižji vnos selena je bil $33,7 \mu\text{g Se}/\text{dan}$ z obrokom št. 2, najvišji vnos pa je bil $112,8 \mu\text{g Se}/\text{dan}$ z obrokom št. 8. Dnevni vnosi selena se med seboj zelo razlikujejo.

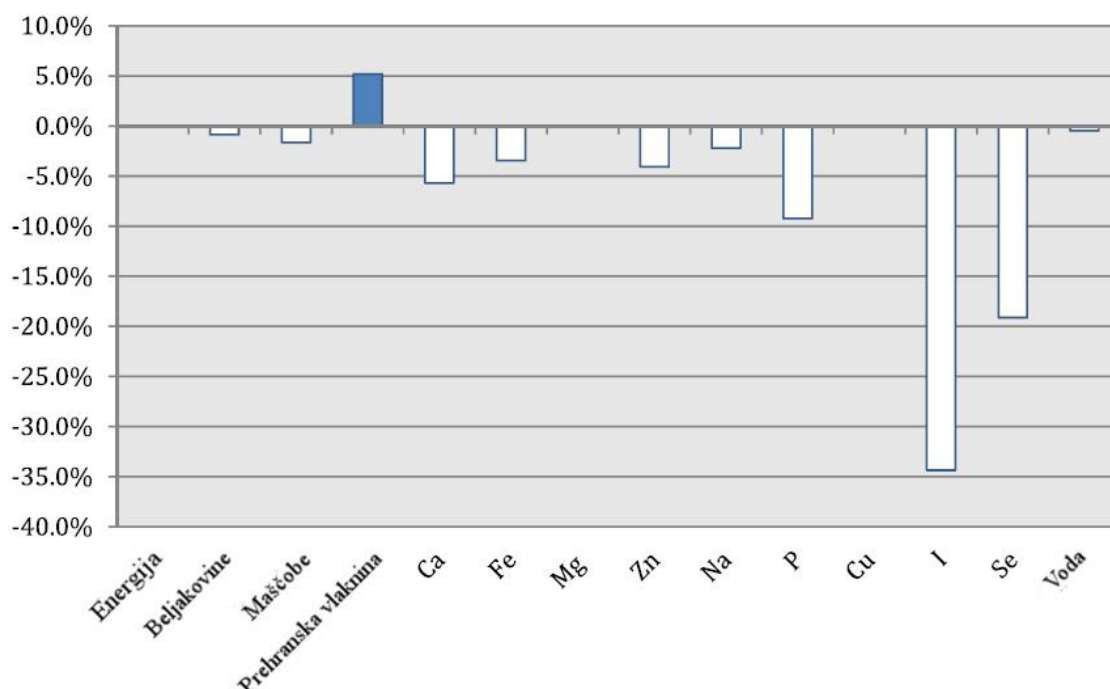
Največji vnos selena je bil z obroki, ki so vsebovali ribe. Povprečen dnevni vnos selena z obroki, ki so vsebovali ribe (obrok 4, 7, 8, 10, 13 in 14), je znašal $84,5 \mu\text{g Se}$, medtem ko je bil povprečen dnevni vnos selena z obroki, ki niso vsebovali rib, $47,9 \mu\text{g Se}$.

Ugotavljamo, da je vnos selena s celodnevnimi vojaškimi obroki ustrezal Prehranskim priporočilom za Slovensko vojsko (2004), ki ocenjujejo, da je primeren vnos dosežen s $30\text{--}70 \mu\text{g Se}/\text{dan}$.

Analizirani jedilniki so bili hranilno ustrezni. Pograjc in sod. (2010) so ugotovili, da je bila energijska vrednost večine obrokov glede na priporočen celodnevni energijski vnos pod

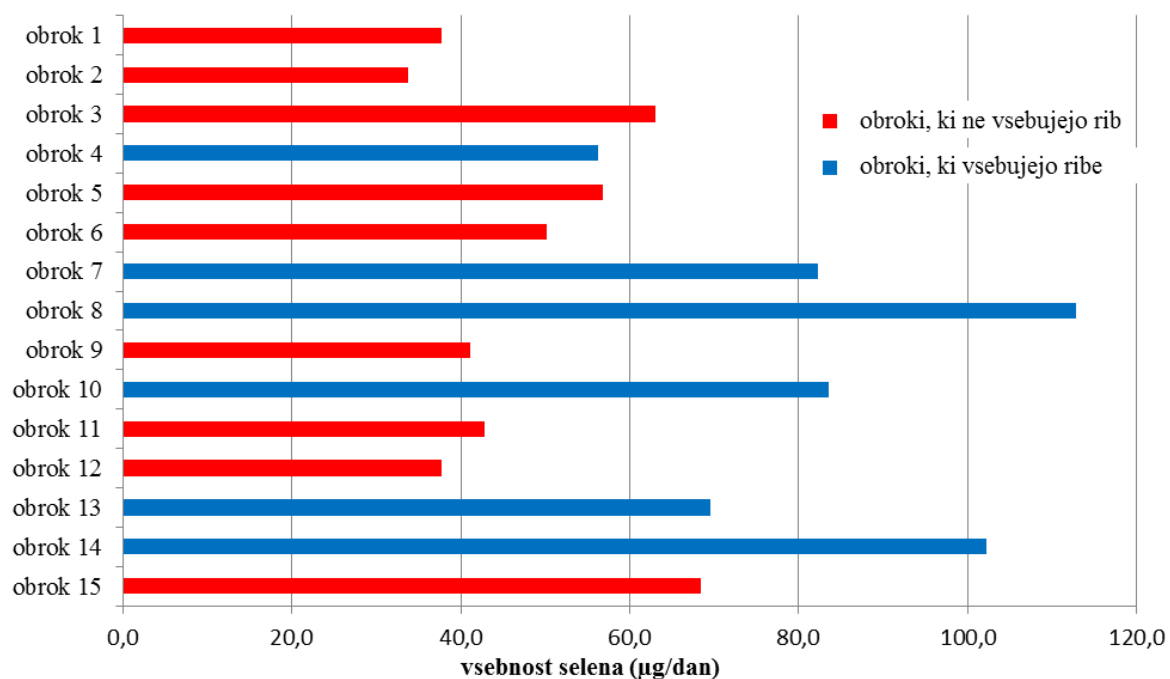
priporočenimi vrednostmi za naporne telesne aktivnosti. Energijsko ustreznost so zagotovili z dodatkom kruha za 2000 kJ na dan. Razlog za nižjo energijsko vrednost, glede na raziskavo v letu 2002, je lahko zmanjšanje števila obrokov.

Neujemanje izračunanih vrednosti in vrednosti dobljenih z analizo je lahko posledica tega, da je vzorčenje potekalo le v eni vojašnici in so bili obroki manjši, kot je predpisano. Koroušić Seljak in sod. (2013) so izračunali vsebnost selena v teh obrokih s pomočjo prehranskih tabel. Ugotovili so, da je razlika med izračunanimi in analiziranimi vrednostmi velika (slika 8). Za izboljšanje izračunavanja vrednosti iz prehranskih tabel, bi bilo potrebnih več analiz živil.



Slika 8: Razlika med izračunanimi in analiziranimi vrednostmi hranil (Koroušić-Seljak in sod., 2013)

Dnevni vnos selena ni odvisen samo od sestave obrokov, ampak tudi od količine obroka. Koncentracija selena v obroku 6 je znašala 13,3 ng Se/g svežega vzorca, v obroku 12 pa 13,7 ng Se/g svežega vzorca. Zaradi velike razlike v masi celotnega dnevnega obroka je bil dnevni vnos Se z obrokom 6 50,2 µg Se, z obrokom 12 pa le 37,7 µg Se.



Slika 9: Vnos selena (μg/dan)

Na sliki 9 je razvidna razlika v količini selena, ki so jo s celodnevni vojaškimi obroki zaužili vojaki Slovenske vojske. Z modro barvo so označeni vzorci obrokov, ki so vsebovali ribe oziroma ribje izdelke. Izstopata vzorca obrok 8 s 112 μg Se/dan in vzorec obrok 14 s 102 μg Se/dan. Najmanjši vnos Se je bil z vzorcem obroka 2, čeprav je bil po masi peti najlažji vzorec.

Med obroki, ki niso vsebovali rib, vsebujejo največ selena vzorci obrokov 3, 5, 6 in 15. Na večjo vsebnost selena v teh vzorcih so vplivali meso in mesni izdelki, ki so prav tako bogat vir selena v hrani.

4.2.1 Primerjava vsebnosti selena z literaturo

Referenčne vrednosti za vnos hranil 2004 ocenjujejo, da je primeren dnevni vnos selena za odrasle med 30 in 70 μg. Enako vrednost opredeljujejo tudi Prehranska priporočila za Slovensko vojsko (Prehranska priporočila..., 2004). Rezultate naše študije smo primerjali s podatki iz literature (preglednica 11).

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obroki slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Preglednica 11: Dnevni vnosi selena (μg) v različnih državah

Država	Dnevni vnos Se (μg)	Vir
Slovenija	40 87 63	Pokorn in sod., 1991 Smrkolj in sod., 2004 Naša študija
Hrvaška	27,3 33,9	Klapec in sod., 1988 Matek in sod., 2000
ZDA	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	10–95	
Italija	25	
Poljska	19–32	Ratkovska in sod., 2003
Velika Britanija	44,7	Foster in Sumar, 1997
Švica	70	
Finska	125	
Avstralija	57–87	Reilly, 1996
Belgija	28–61	Rayman, 2000
Francija	29–43	
Nizozemska	67	
Danska	38–47	
Nemčija	35	
Slovaška	38	
Avstrija	37–52	Li in sod., 1999

Rezultati kažejo, da je vnos s celodnevnimi vojaškimi obroki hrane, dobljen z našo študijo, primerljiv z dnevnimi vnosi selena v drugih državah. Podoben dnevni vnos selena kot v Sloveniji je ugotovljen na Nizozemskem in v Švici, veliko nižji dnevni vnos selena pa ugotavljajo v Italiji, Nemčiji in na Hrvaškem. Večja vsebnost selena je ugotovljena na Japonskem, Kitajskem, v ZDA in Kanadi. Vsebnost selena v hrani je odvisna predvsem od vsebnosti tega elementa v zemlji, kar pojasnjuje razlike v dnevnem vnosu med državami po svetu (Reilly, 2002).

Orešnik B. Vsebnost selen in arzena v celodnevni obrokih slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

4.2.2 Vsebnost arzena v celodnevni vojaški obrokih

Vsebnost arzena v petnajstih celodnevni vojaški obrokih smo analizirali z radiokemično nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA). Ta metoda je zelo občutljiva, meja detekcije je 0,1 ng/g vzorca in nam omogoča zanesljivo določitev arzena v ultra nizkih koncentracijah, kot smo jih pričakovali v vzorcih, ki ne vsebujejo rib. Pri analizi dveh vzorcev celodnevni obrokov, ki sta vsebovala ribe, smo med postopkom naredili napako, zato za obroka številka 10 in 13 nimamo podatkov. Rezultate, dobljene v preostalih 13 vzorcih celodnevni vojaški obrokov, prikazuje preglednica 12.

Preglednica 12: Dnevni vnos arzena s celodnevni vojaški obroki

Opis vzorca		Masa vzorca (g)	Vsebnost As ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ svežega vzorca)	Dnevni vnos As (μg)
Sestava	Vzorec			
Obroki hrane, ki ne vsebujejo rib	Obrok 1	3635	0,52	19
	Obrok 2	3181	0,28	9
	Obrok 3	3260	0,24	8
	Obrok 5	3150	0,14	4
	Obrok 6	3766	0,41	15
	Obrok 9	3090	0,66	20
	Obrok 11	3284	0,61	20
	Obrok 12	2748	0,22	6
	Obrok 15	3706	0,21	8
Povprečje			0,37	12
Standardni odklon			0,19	6
Obroki hrane, ki vsebujejo ribe	Obrok 4	3392	3,36	114
	Obrok 7	3444	3,63	125
	Obrok 8	3330	6,54	218
	Obrok 14	3268	1,29	42
Povprečje		3327	3,71	125
Standardni odklon		274	2,16	72

V trinajstih celodnevni vojaških obrokih, s povprečno maso 3327 ± 274 g, je bila vsebnost arzena od 0,14 do 6,54 $\mu\text{g}/100$ g svežega vzorca. Podatki v preglednici 13 so podani glede na izvor hrane v obrokih, saj je v obrokih, ki vsebujejo ribe in/ali ribje izdelke večja vsebnost arzena kot v hrani, ki ne vsebuje živil morskega izvora. Kot lahko vidimo iz preglednice, obroki hrane, ki niso vsebovali rib, vsebujejo v povprečju $0,37 \pm 0,19$ $\mu\text{g As}/100$ g svežega vzorca, obroki, ki so vsebovali ribe pa $3,71 \pm 2,16$ $\mu\text{g As}/100$ g svežega vzorca. Dnevni vnos arzena s hrano, ki ne vsebuje rib, se giblje med 4 in 20 μg in je precej nižji od dnevnega vnosa arzena s hrano, ki vsebuje ribe, ki je v območju od 42 do 218 μg . Najvišja ugotovljena vsebnost arzena v naših vzorcih torej znaša 218 $\mu\text{g As}/\text{dan}$ (3,1 μg na kilogram telesne teže na dan, pri povprečni teži 70 kg) in je v območju BMDL₀₁, v katerem s 95% verjetnostjo pričakujemo, da se škodljiv učinek ne bo pojavil pri 99 % ljudi ali več.

4.2.2.1 Arzenove spojine v celodnevni vojaških obrokih

Poleg vsebnosti arzena smo želeli določiti tudi prisotnost oziroma vsebnost posameznih arzenovih spojin, in sicer vseh tistih, za katere smo imeli na razpolago standarde. Te spojine so: arzenit (As(III)), arzenat (As(V)), monometil arzenova kislina (MMAA), dimetil arzenova kislina (DMAA), arzenobetain (AsB), trimetil arzenov oksid (TMAO), tetrametil arzonijev ion (TETRA) in arzenoholin (AsC). Zaradi majhne vsebnosti arzena v obrokih, ki niso vsebovali rib, smo na prisotnost arzenovih spojin analizirali le vzorce obrokov, ki so vsebovali ribe, in poleg teh obrokov smo analize opravili še v šestih ribjih izdelkih. Ti vzorci so predstavljeni v preglednici 5.

Ločitev arzenovih spojin v vodnih raztopinah ekstraktov vzorcev ribjih izdelkov in celodnevni vojaških obrokov smo izvedli s HPLC-UV-HG-AFS tehniko na anionski in kationski koloni. Z anionsko kolono smo ugotavljali prisotnost arzenovih spojin: As(III), As(V), MMAA in DMAA. Vsebnosti teh spojin v metanol-vodnih ekstraktih liofiliziranih vzorcev celodnevni vojaških obrokov so bile pod mejo zaznavnosti. Meje zaznavnosti so za vse spojine reda velikosti 0,5 ng/ml ekstrakta, kar pomeni približno 3 ng/g suhega vzorca. Našli smo le eno anionsko zvrst, in sicer DMAA v vzorcih ribjih izdelkov številka 3 in 5 (preglednica 13).

Orešnik B. Vsebnost selena in arzena v celodnevni obroki slovenske vojske.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2016

Preglednica 13: Vsebnost DMAA (ng/g) v vzorcih ribjih izdelkov

Vzorec ribjih izdelkov	Vsebnost DMAA (ng/g)	Masa jedilnega dela* (g)	µg DMAA/jedilni del
Fileti skuše v semenskem olju	7,4	91,8	0,7
Fileti skuše v lastnem soku	15,9	80,3	1,3

* Masa mesa ribe (podatek pridobljen iz deklaracije na embalaži ribjega izdelka, (Volk, 2006))

S kationsko analizo smo ugotavljali vsebnost arzenovih spojin: AsB, TMAO, TETRA in AsC.

Preglednica 14: Vsebnost arzena in kationskih arzenovih spojin v ribjih izdelkih in obrokih, ki vsebujejo ribe (ng As/g)

Vzorec Spojine	Vsebnost arzena			
	Celotni As (ng/g)	AsB (ng As/g)	AsC (ng As/g)	TMAO (ng As/g)
Sardine v rastlinskem olju	6575	3663		
Tuna v olivnem olju	292	200		
Fileti skuše v semenskem olju	2002	232	10	18
Tunina v naravnem soku	409	223		
Fileti skuše v lastnem soku	1560	157	9	12
Losos v lastnem soku	301	69		18
Povprečje		757		
Obrok 4	158	/		
Obrok 7	158	126		
Obrok 8	263	176		
Obrok 10	/	265		
Obrok 13	/	/		
Obrok 14	54	14		
Povprečje		145		

Kot je razvidno iz preglednice 14, je arzenobetain glavna identificirana organska arzenova spojina, ki smo jo našli v celodnevni obroki hrane, ki so vsebovali ribe, in v vzorcih

ribjih izdelkov. Po doslej opravljenih raziskavah arzen v obliki arzenobetaina ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, saj spada med netoksične oblike arzena in naj ne bi bil karcinogen.

Povprečna vsebnost arzenobetaina v naših vzorcih je bila 0,15 µg/g. Najmanjša vsebnost je bila v obroku 14, 0,01 µg/g, največja pa v obroku 10, 0,27 µg/g. Vsebnost ostalih kationskih arzenovih spojin (AsC, TMAO) v obrokih so bile pod mejami detekcije, ki so reda velikosti 0,5 ng/ml ekstrakta oziroma približno 3 ng/g suhega vzorca.

4.2.2.2 Primerjava vsebnosti arzena z literaturo

Preglednica 15: Primerjava dnevnega vnosa arzena s celodnevnimi vojaškimi obroki z vnosom arzena v nekaterih drugih državah

Država	Vnos arzena (µg/dan)	Vir
Španija	291	Urieta in sod., 1996
Velika Britanija	120	Ysart in sod., 1999
Hrvaška	11,7	Sapunar - Postružnik, 1996
Belgija	< 30–766	Robberecht in sod., 2002
Slovenija	13–545 12–218	Stibilj in sod., 2004 Naša raziskava
Japonska	195	Yamauchi in sod., 1992

S primerjavo rezultatov naše raziskave s podatki raziskav v nekaterih drugih državah ugotavljamo precejšnjo raznolikost. Najnižje vrednosti navaja Sapunar - Postružnik (1996) za Hrvaško, le 11,7 µg/dan, najvišjo vrednost pa podajajo Robberecht in sod. (2002) za Belgijo, od 30 do 766 µg/dan. Zanimiva je primerjava naših rezultatov s podobno raziskavo v Sloveniji iz leta 2004, kjer so Stibilj in sod. določali vsebnost arzena v celodnevni vojaški obrok hrane. Avtorji navajajo spodnjo mejo zelo podobno naši vrednosti (13 oziroma 12 µg/dan), medtem ko je zgornja meja 2,5-krat višja. V omenjeni raziskavi so določali vsebnost arzena v 20 celodnevni vojaški obroki in povprečna masa obrokov je bila 3972 ± 405 g, kar je 16 % več kot v naši raziskavi.

SKLEPI

Na podlagi rezultatov analiz, ki smo jih opravili, lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Povprečna masa celodnevni obrok je bila 3285 g. Najnižja masa posameznega obroka je bila 2748 g in najvišja masa 3766 g.
- Vsebnost selena se je med posameznimi obroki razlikovala. Povprečen dnevni vnos selena z obroki, ki niso vsebovali rib, je bil 47,9 µg, medtem ko je bil dnevni vnos selena z obroki, ki so vsebovali ribe, 84,5 µg.
- Glede na referenčne vrednosti za vnos hranil (2004) in Prehranska priporočila za Slovensko vojsko je priporočen dnevni vnos selena pri odraslem človeku med 30 in 70 µg. Povprečen dnevni vnos selena 15 celodnevni vojaški obrok je bil 62,5 µg, kar pomeni, da so rezultati v omenjenem območju in da so vojaki z analiziranimi celodnevni obroki pokrili dnevne potrebe po tem elementu.
- Za pravilen izračun vnosa selena z obroki je potrebno imeti zanesljive podatke o njegovi vsebnosti v posameznih živilih.
- Vsebnost arzena se je močno razlikovala med obroki, ki so vsebovali ribe, in obroki, ki niso vsebovali rib. Najnižji dnevni vnos arzena je bil 4 µg, najvišji pa 218 µg. Povprečen dnevni vnos arzena z obroki, ki niso vsebovali rib, je bil 12 µg. Dnevni vnos arzena z obroki, ki so vsebovali ribe, je bil 125 µg.
- Vsebnosti arzenovih spojin As(III), As(V), MMAA, DMAA, TMAO, TETRA in AsC v celodnevni vojaški obrokih so bile pod mejami detekcije, ki so za vse spojine reda velikosti 0,5 ng/ml ekstrakta, kar pomeni približno 3 ng/g suhega vzorca.
- V vzorci obrok, ki so vsebovali ribe, smo določili visoko vsebnost arzenobetaina (AsB). Na podlagi dobljenih rezultatov ugotavljamo, da je to glavna organska arzenova spojina v izbrani celodnevni obrokih in ribjih izdelkih. Arzen v obliki arzenobetaina je po doslej znanih podatkih zdravju neškodljiv.
- Najvišje vsebnosti selena in arzena smo določili v celodnevni obrokih, ki so vsebovali ribe.

5 POVZETEK

Namen naše raziskave je bil ugotoviti dnevni vnos selen in arzena z vojaškimi obroki. Za določanje selen smo uporabili metodo HG-AFS. Zanesljivost in pravilnost metode smo preverjali z določanjem vsebnosti selen v standardnih referenčnih materialih Typical Diet 1548a in DORM2. Arzen smo določali z metodo RNAA, njegove spojine pa s HPLC-UV-HG-AFS.

Z analizo petnajstih celodnevni vojaških obrokov, namenjenih profesionalnim vojakom v vojašnici Vipava, smo ugotavljali, ali dnevni vnos selen ustreza prehranskim priporočilom za Slovensko vojsko, ki znaša 30–70 $\mu\text{g Se/dan}$. Povprečen dnevni vnos selen, dobljen z našo raziskavo, je bil 62,5 $\mu\text{g Se/dan}$, vsebnosti pa so nihale od 34 do 113 $\mu\text{g Se/dan}$.

Primerjava dobljenih rezultatov s podatki iz literature kaže, da je vsebnost selen v celodnevni vojaških obrokih iz naše raziskave primerljiva z dnevnimi vnosi na Nizozemskem in v Švici. Povprečen dnevni vnos selen 63 $\mu\text{g Se/dan}$ je nižji od podatkov, dobljenih iz raziskave Smrkoljeve in sod. (2004), ki so na podlagi 20 celodnevni vojaških obrokov ugotovili, da je dnevni vnos selen 87 μg . Veliko večja vsebnost selen v celodnevni obrokih je bila ugotovljena na Japonskem, Kitajskem, v ZDA in Kanadi.

Določili smo, da je bila vsebnost arzena v obrokih, ki niso vsebovali rib, od 4 do 20 μg , v obrokih, ki so vsebovali ribe, pa od 42 do 218 μg . Rezultati, dobljeni v vzorcih, ki so vsebovali ribe, so odvisni od vrste ribe oziroma ribjega izdelka, ki ga je vseboval obrok.

Za analizo vsebnosti arzenovih zvrsti smo uporabili 6 vzorcev ribjih izdelkov (sardine v rastlinskem olju, tuna v olivnem olju, fileti skuše v semenskem olju, tunina v naravnem soku, fileti skuše v lastnem soku in losos v lastnem soku). Le v vzorcih 3 (fileti skuše v semenskem olju) in 5 (fileti skuše v lastnem soku) smo določili anionsko arzenovo zvrst DMAA.

V celodnevni vojaških obrokih, ki so vsebovali ribe, smo našli le arzenovo spojino arzenobetain. Njegova vsebnost v vzorcih je bila med 0,01 $\mu\text{g/g}$ in 0,27 $\mu\text{g/g}$.

Povprečna ugotovljena vsebnost arzena v vzorcih, ki so vsebovali ribe, je bila 125 $\mu\text{g As/dan}$ (1,8 μg na kilogram telesne teže na dan, pri povprečni teži 70 kg) in je v območju BMDL₀₁, v katerem s 95 % verjetnostjo pričakujemo, da se škodljiv učinek ne bo pojavil pri 99 % ljudeh ali več.

Precejšno raznolikost smo ugotavljali pri primerjavi podatkov iz literature in dobljenih rezultatov o vsebnosti arzena. Zanimiva je predvsem primerjava rezultatov naše raziskave in rezultatov Stibiljeve in sodelavci (2004), ki so prav tako ugotavljali vsebnost arzena v celodnevni vojaški obrok. Spodnji vrednosti sta si zelo podobni, in sicer 12 oziroma 13 $\mu\text{g As/dan}$. Najvišji vnos naše raziskave je 218 $\mu\text{g As/dan}$, pri raziskavi Stibiljeve in sodelavcev (2004) pa kar 545 $\mu\text{g As/dan}$.

6 VIRI

- Anke M. 1986. Arsenic V: Trace elements in human and animal nutrition. Mertz W. (ed.). Orlando, Academic Press: 347–372.
- Aposhian H. V. 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other approaches to arsenic toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37: 397–419.
- Aposhian H. V., Zakharyan R. A., Avram M. D., Sampayo - Reyes A., Wollenberg M. L., 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198, 3: 327–335.
- Behne D., Kyriakopoulos A. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annual Review of Nutrition*, 21: 453–473.
- Berry J. P., Galle P. 1994. Selenium-arsenic interaction in renal cells: role of lysosomes. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 26: 203–210.
- Buchet J. P., Lauwerys R., Roels H. 1981. Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 48: 71–79.
- Brown K. M., Arthur J. R. 2001. Selenium, selenoproteins and human health. *Public Health Nutrition*, 4, 2B: 593–599.
- Browning E. 1969. *Toxicity of Industrial Metals*. London, Butterworths: 383 str.
- Byrne A. R., Vakselj A. 1974. Rapid neutron activation analysis of arsenic in a wide range of samples by solvent extraction of the iodide. *Croatica Chem Acta*, 46: 225–235.
- Combs G. F., Combs S. B. 1986. *The role of selenium in nutrition*. Orlando, Academic Press: 453 str.
- Combs G. F. Jr. 2001. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*; 85: 517–547.
- Cui X., Kobayashi Y., Akashi M., Okayasu R. 2008. Metabolism and the paradoxical effects of arsenic: carcinogenesis and anticancer. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 22, 2293–2304.
- Dedina J. 1995. *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, John Wiley & Sons: 526 str.
- DRI. 2000. *Dietary Reference Intake for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. Institute of Medicine Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Washington, National Academies Press.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225470/> (januar 2015)
- EFSA. 2009. *Scientific Opinion on Arsenic in Food*, *EFSA Journal*; 7, 10: 1351: 199 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1351> (september 2015)

eNBOZ. 2013. IVZ RS: 39 str.

http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/enboz_jul_avg_2013.pdf (maj 2016)

FAO/WHO. 2001. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation: selenium, 15: 235–255.

Finley J. W. 2006. Bioavailability of selenium from foods: brief critical review. *Nutrition Reviews*, 64, 3: 146–151.

Foster L. H., Sumar S. 1997. Selenium in health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 3: 211–228.

Francesconi K. A., Pannier F. 2004. Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status. *Clinical Chemistry*, 50, 12: 2240–2253.

Gibičar D. 2002. Arzenove zvrsti v jajcih kokoši krmljenih s krmo z dodanim As_2O_3 . Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 47 str.

Hughes M. F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133: 1–16.

Kabata Pendias A. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press: 365 str.

Kastelec M. 2004. Energijska gostota, vsebnost maščob in beljakovin v celodnevni vojaški obroki. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 108 str.

Klapec T., Mandić M. L., Grgić J., Primorac L., Perl A., Krstanović V. 2004. Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. *Food Chemistry*, 85: 445–452.

Klapec T., Mandić M. L., Primorac L. 1998. Značenje selen za zdravlje. Osijek, Prehrambeno tehnološki fakultet: 34–40.

Knez V. 1995. Vpliv različnih koncentracij arzena (As_2O_3) v krmi za kokoši nesnice na njegovo porazdelitev v jajcih. Diplomsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 63 str.

Koroušić Seljak B., Stibilj V., Pograjc L., Fidler Mis N., Benedik E. 2013. Food composition databases for effective quality nutritional care. *Food Chemistry*, 140: 553–561.

Li F., Rossipal E., Micetić - Turk D. 1999. Determination of selenium in serum by FI-HG-AAS and calculation of dietary intake. *Biological Trace Element Research*, 73, 3: 201–210.

Matek M., Blanuša M., Grgić J. 2000. Determination of the daily dietary selenium intake in Croatia. *European Food Research and Technology*, 210: 155–160.

Mayer D. R., Kosmus W., Poggitsch H., Mayer D., Beyer W. 1993. Essential trace elements in humans: serum arsenic concentrations in hemodialysis patients in comparison to healthy controls. *Biological and Trace Element Research*, 37: 27–38.

- 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.
- Military strategies for Sustainment of nutrition and immune function in the field. 1999. Washington, National Academy Press: 708 str.
- Molin M. 2015. Arsenic in the human food chain, biotransformation and toxicology – review focusing on seafood arsenic. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31: 249–159.
- Navarro - Alarcon M., Cabrera - Vique C. 2008. Selenium in food and the human body. *Science of the Total Environment*, 400: 115–141.
- 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.
- Nielsen F. H. 1991. Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel and arsenic: current knowledge and speculation. *FASEB Journal*, 5, 12: 2661–2667.
- Papp L. V., Lu J., Holmgren A., Khanna K. K. 2007. From Selenium to Selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 7: 775–806.
- Pernat P., 2005. Vpliv arzenovega trioksida na metabolizem selena. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 47 str.
- Pograjc L., Dernovšek Z. M. 1996. Antropometrične meritve in prehrabena anketa vojakov slovenske vojske. V: *Tehnologija, hrana, zdravje. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo*, Bled, 21–25 april 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 406–409.
- Pograjc L. 2001a. Jedilniki za prehrano v vojašnicah slovenske vojske v miru. Ljubljana, Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije, Služba za publicistiko: 151 str.
- Pograjc L. 2001b. Normativi jedi z navodili za pripravo in z energetskimi in hranilnimi vrednostmi. Ljubljana, Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije, Služba za publicistiko: 129 str.
- Pograjc L., Stibilj V., Ščančar J., Jamnik M. 2010. Determination of macronutrients and some essential elements in the Slovene military diet. *Food Chemistry*, 122: 1235–1240.
- Pograjc L. 2011. Vpliv prehrane in psihofizičnega stresa na status selena pri vojaki. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 140 str.
- Pokorn D. 1991. Prehrana športnika in rekreativca. Ljubljana, Forma 7: 128 str.
- 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: 259–71.

- 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.
- Prehranska priporočila za Slovensko vojsko. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije: 7 str.
- Ratkovska B., Marzec Z., Stibilj V., Wojtasik A., Kunachowicz H. 2003. Assessment of selenium content in diets using two analytical methods-comparative studies. Neobjavljeni rezultati, Warsaw, Food Institute: 9str.
- Rayman M. P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356, 7: 233–241.
- Recommended dietary allowances. 1989. 10th ed. Washington, National Academy Press: 217–224.
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izd. 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.
- Robberecht H., Van Cauwenbergh R., Bosscher D., Cornelis R., Deelstra H. 2002. Daily dietary total arsenic intake in Belgium using duplicate portion sampling and elemental content of various foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 214: 27–32.
- Sapunar - Postružnik J., Bažulić D., Kubala H. 1996. Estimation of dietary intake of arsenic in the general population of the Republic of Croatia. *Science of the Total Environment*, 191: 119–123.
- Skoog D. A., West D. M. Holler F. J. 1988. Fundamentals of analytical chemistry. 5th ed. New York, 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*, 90: 691–697.
- Srebočan V. 1993. Kovine (metali). Veterinarska toksikologija. Zagreb, Medicinska naklada: 155–167.
- Stibilj V., Pokorn D., Hlastan - Ribič C., Milačič R., Smrkolj P., Trkov Z. 2002. Ustreznost vojaške prehrane in skladnost s fiziološkimi normativi: delovno poročilo. Ljubljana, Inštitut Jožef Stefan: 23 str.

- Stibilj V., Šlejkovec Z. 2004. Uravnotežena in varna hrana bojevnika – PREBOJ. Vmesno poročilo za projekt M4-007. Ljubljana, Institut Jožef Stefan: 5 str.
- Suzuki K. T., Ogra Y. 2002. Metabolic pathway for selenium in the body: Speciation by HPLC-ICP MS with use of enriched Se. *Food Additives and Contaminants*, 19: 974–983.
- Suzuki K. T. 2005. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science*, 51: 107–114.
- Šlejkovec Z. 1994. Separacija arzenovih zvrsti v bioloških vzorcih in njihova določitev z nevtronsko aktivacijsko analizo. Disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo: 3–20.
- Šlejkovec Z., Elteren J. T., Byrne A. R. 1999. Determination of arsenic compounds in reference materials by HPLC-(UV)-HG-AFS. *Talanta*, 49:619–627.
- Tharion W. J., Lieberman H. R., Montain S. J., Young A. J., Baker - Fulco C. J., DeLany J. P., Hoyt R. W. 2005. Energy requirements of military personnel. *Appetite*, 44, 1: 47–65.
- Trace elements in human nutrition and health. 1996. Geneva, World Health Organization: 361 str.
- Tseng CH. 2008. Cardiovascular disease in arsenic-exposed subjects living in the arseniasis-hyperendemic areas in Taiwan. *Atherosclerosis*, 199, 1: 12–18.
- Urieta I., Jalón M., Eguileor I. 1996. Food surveillance in the Basque Country (Spain). II. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron and zinc through the Total Diet Study, 1990/91. *Food Additives & Contaminants*, 13: 29–52.
- Vahter M., Marafante E. 1993. Metabolism of alkyl arsenic and antimony compounds. *Metal Ions in Biological Systems*, 29: 161–184.
- Van Elteren J. T., Šlejkovec Z. 1997. Ion-exchange separation of eight arsenic compounds by high-performance liquid chromatography-UV decomposition-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry and stability tests for food treatment procedures. *Journal of Chromatography A*, 789: 339–348.
- Vandecasteele C., Block C. B. 1993. Modern methods for trace element determination. Chichester, John Wiley & Sons: 330 str.
- Ventura M. G., Stibilj V., do Carmo Freitas M., Pacheco A. M. G. 2009. Determination of ultratrace levels of selenium in fruit and vegetable samples grown and consumed in Portugal. *Food Chemistry*, 115: 200–206.
- Vidmar M. 2009. Določanje selena v mesu in mesnih izdelkih slovenskega porekla. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53 str.
- Volk S. 2006. Določanje selena v ribah in ribjih izdelkih na slovenskem tržišču. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 84 str.

- 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.
- Woolson E. A. 1975. Arsenical pesticides. V: 168th Meeting of the American Chemical Society, Atlantic City. Washington, ACS: 176 str.
- WHO. 1996. Trace elements in Human Nutrition and Health. WHO, Geneva: 343 str.
- Yamauchi H., Takahashi K., Mashiko M., Saitoh J., Yamamura Y. 1992. Intake of different chemical species of dietary arsenic by the Japanese, and their blood and urinary arsenic levels. *Applied organometallic Chemistry*, 6, 4: 383–388.
- Ysart G., Miller P., Crews H., Robb P., Baxter M., De L'Argy C., Lofthouse S., Sargent C., Harrison N. 1999. Dietary exposure estimates of 30 elements from the UK Total Diet Study. *Food Additives & Contaminants*, 16: 391–403.
- Žlender B., Gašperlin L., Polak T. 2009. Meso in mesni izdelki kot izvor biološko pomembnih mineralov. V: Vloga mineralov v živilski tehnologiji in prehrani. 26. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 26. in 27. november 2009. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 157 – 164.
- Žnidar A. 2007. Vsebnost beljakovin in prehranske vlaknine v celodnevni obrok slovenske vojske. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 str.