

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

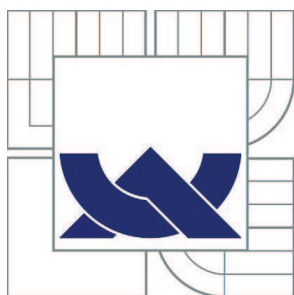
SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU V KVASINKÁCH KULTIVOVANÝCH V
MÉDIU S PŘÍDAVKEM SELENU

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. TEREZA MOTLOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU V KVASINKÁCH KULTIVOVANÝCH V MÉDIU S PŘÍDAVKEM SELENU

SPECIATION ANALYSIS OF SELENIUM IN SELENIZED YEAST

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. TEREZA MOTLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0396/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Tereza Motlová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Pavel Diviš, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Speciální analýza selenu v kvasinkách kultivovaných v médiu s přídavkem selenu

Zadání diplomové práce:

Cílem diplomové práce je stanovit specie selenu v kvasinkách, které byly kultivované v médiu, do kterého byly přidány anorganické formy selenu. Teoretická část práce by měla shrnovat problematiku speciální analýzy, účinků selenu na lidský organismus, přehled extrakčních metod a souhrn detekčních metod, vhodných pro stanovení specií selenu. Experimentální část práce bude rozdělena na kultivační část a analytickou část. V kultivační části budou pěstovány kvasinky a bude sledován vliv přídavku selenu na růst kvasinek. V analytické části budou sloučeniny selenu z kvasinek extrahovány a stanoveny spojením metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie a atomové fluorescenční spektrometrie s generací hydridů.

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Tereza Motlová
Student(ka)

Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo stanovení specií selenu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* kultivovaných v médiu, do kterého byla přidána anorganická forma selenu (seleničitan sodný). Koncentrace seleničitanu sodného v kultivačním médiu byly 0,1; 1; 10 a 100 mg.l⁻¹. Kultivace byla prováděna ve fermentoru po dobu 72 hodin. Nakultivované obohacené kvasinky byly enzymaticky extrahovány a poté byly stanoveny specie selenu v jednotlivých částech kvasinek.

Ke stanovení specií selenu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s atomovým fluorescenčním spektrometrem a s technikou generací hydridů.

Analýzou různých frakcí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že během kultivace dochází k sorpci selenu ve formě Se⁴⁺ v buněčných membránách, zatímco v cytoplasmě nebyly anorganické formy selenu nalezeny. Dále bylo zjištěno, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou schopny metabolicky přeměňovat anorganické formy selenu na organické formy (selenomethionin), přičemž tyto formy jsou přítomny v cytoplasmě a jsou také pravděpodobně vázány na bílkovinné struktury buněčných membrán. Se zvyšující se koncentrací seleničitanu sodného v kultivačním médiu docházelo k nárůstu koncentrace Se⁴⁺ v buněčných membránách. V bílkovinných strukturách buněčných membrán se koncentrace organických forem selenu zvyšovala pouze do koncentrace 10 mg.l⁻¹ seleničitanu sodného v kultivačním médiu.

KLÍČOVÁ SLOVA

selen, speciální analýza, kvasinky, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), generace hydridů (HG), atomová fluorescenční spektrometrie (AFS), extrakce

ABSTRACT

The aim of the theses was determination of selenium species in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in medium with added inorganic form of selenium (Sodium Selenite). Concentrations of Sodium Selenite in cultivation medium were 0,1; 1; 10 and 100 mg.l⁻¹. Cultivation was undertaken in fermenting tub for period of 72 hours. Cultivated yeasts were extracted by use of enzymes and subsequently the species of selenium in particular parts of yeasts were determined.

In order to determine selenium species, the method of high-performance liquid chromatography in combination with atomic fluorescent spectrometer and technique of hydride generation was used.

Having analysed different fractions of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* it was ascertained that during cultivation the sorption of selenium occurred in form of Se⁴⁺ in cell membranes while in cytoplasm no inorganic forms of selenium were found. Furthermore, it was stated that yeasts *Saccharomyces cerevisiae* are able to metabolically change inorganic forms of selenium to organic forms (selenomethionine), while these forms are present in cytoplasm and they are likely to be bound to proteinic structures of cell membranes. An increase of concentration of Se⁴⁺ in cell membranes could be observed as a result of increasing concentration of Sodium Selenite in cultivation medium. In proteinic structures the concentration of organic selenium forms increased only to concentration 10 mg.l⁻¹ of Sodium Selenite in cultivation medium.

KEY WORDS

Selenium, speciation analysis, yeast, high performance liquid chromatography (HPLC), hydride generation (HG), atomic fluorescence spectrometry (AFS), extraction

MOTLOVÁ, T. *Speciační analýza selenu v kvasinkách kultivovaných v médiu s přísávkem selenu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 70 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, čas a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří se mnou sdíleli své zkušenosti a bez jejichž účasti by tato práce nemohla vzniknout. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině za pochopení a velkou dávku podpory.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	ROZDĚLENÍ A VÝSKYT CHEMICKÝCH FOREM KOVŮ	9
2.1	Základní rozdělení	9
2.1.1	Organokovové sloučeniny v životním prostředí	9
2.1.2	Organokovové sloučeniny v průmyslu	10
2.1.3	Organokovové sloučeniny v klinické biochemii	10
2.1.4	Organokovové kovy v biochemii zvířat a rostlin	10
2.2	Speciační analýza	10
2.2.1	Úvod do speciační analýzy	10
2.2.2	Definice pojmů specie a speciační analýza	11
2.2.3	Speciační analýza v biologických materiálech	11
3	SELEN	13
3.1	Výskyt v prostředí, distribuce a transport	13
3.2	Výskyt v potravinách a doporučené dietární dávky	14
3.3	Biochemické funkce	14
3.4	Metabolismus, toxické účinky a příznaky při nedostatku	15
3.5	Specie selenu	16
4	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ SPECÍ SELENU	17
4.1	Příprava vzorků pro celkovou analýzu	17
4.1.1	Mineralizace na suché cestě	17
4.1.2	Mineralizace na mokré cestě	18
4.1.3	Mineralizace za použití mikrovlnného záření	19
4.2	Příprava vzorků pro speciační analýzu – extrakční metody	19
4.2.1	Extrakce vodou	20
4.2.2	Extrakce organickými rozpouštědly	20
4.2.3	Extrakce neutrálními puframi	20
4.2.4	Extrakce kyselinami	20
4.2.5	Extrakce amoniakem	20
4.2.6	Enzymatická extrakce	21
5	SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU	22
5.1	Metody využívané při speciační analýze selenu	22
5.1.1	Spojení separačních a detekčních technik ve speciační analýze	22
5.2	Separací část - Kapalinová chromatografie	24
5.2.1	Chromatografie	24
5.2.2	Princip kapalinové chromatografie	24
5.2.3	Stacionární fáze v HPLC	24
5.2.4	Mobilní fáze v HPLC	24
5.2.5	Instrumentace	25
5.3	Detekční část I - Generování a atomizace těkavých sloučenin	28
5.3.1	Generování hydridů	28
5.3.2	Atomizace hydridů	29
5.4	Detekční část II - Atomová fluorescenční spektrometrie	29

5.4.1	Princip atomové fluorescenční spektrometrie	29
5.4.2	Vznik fluorescenčních spekter	30
5.4.3	Základní vztahy	31
5.4.4	Schéma atomového fluorescenčního spektrometru.....	32
5.4.5	Zdroje primárního záření.....	32
5.4.6	Detekce a registrace signálu.....	33
6	KVASINKY SACCHAROMYCES CEREVISIAE	34
6.1	Selenem obohacené kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
6.2	Kultivace kvasinek ve fermentoru	35
7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
7.1	Použité přístroje a chemikálie.....	36
7.1.1	Použité přístroje	36
7.1.2	Použité chemikálie	37
7.2	Analýza celkového množství selenu pomocí metody ICP-MS.....	38
7.2.1	Instrumentace	38
7.2.2	Příprava vzorků	38
7.3	Analýza specií selenu spojenými metodami HPLC-HG-AFS.....	38
7.3.1	Schéma pro speciaci selenu.....	38
7.3.2	Podmínky HPLC a jejich optimalizace	39
7.3.3	Podmínky HG-AFS a jejich optimalizace.....	40
7.4	Příprava standardních roztoků pro speciační analýzu selenu	41
7.5	Vzorky pro speciační analýzu selenu.....	41
8	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
8.1	Výsledky optimalizace pH mobilní fáze pro HPLC	44
8.2	Výsledky optimalizace podmínek pro ICP MS	46
8.3	Výsledky kultivace kvasinek	47
8.3.1	Stanovení celkového množství selenu v kultivačním médiu	47
8.4	Stanovení specií selenu v různých částech kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	49
8.4.1	Analýza specií selenu navázaných uvnitř buněk.....	54
8.4.2	Analýza specií selenu navázaných na buněčnou membránu.....	56
8.4.3	Analýza specií selenu navázaných na bílkovinné struktury.....	58
9	ZÁVĚR.....	60
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	62
11	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	67
12	SEZNAM PŘÍLOH	68
13	PŘÍLOHY	69

1 ÚVOD

Pro každý organismus na naší planetě a tedy i pro člověka jsou velmi důležité stopové prvky, které ovlivňují správné fungování živých organismů. Některé prvky mohou být i při nízkých koncentracích pro různé organismy vysoce toxické (např. Pb, Cd, Sb, As, Hg); jiné prvky (např. Co, Mn, Fe, Zn) jsou považovány za esenciální a nezbytné pro životní funkce [1].

Mezi nezbytné esenciální prvky se řadí selen. Díky antioxidačním účinkům je selen hojně využíván v prevenci proti rakovině a jiným nemocem. Obsah selenu ve stravě je v některých oblastech světa nedostatečný, což zapříčiňuje vzrůst zájmu o produkci selenem obohacených potravin a potravních doplňků [2].

Potravní doplňky obohacené selenem se obvykle nachází ve formě kvasinek obohacených anorganickou formou selenu, která je však pro organismus hůře vstřebatelná. Selen může být v kvasinkách přítomen i v organické formě, začleněn do struktury proteinů. Organické formy selenu jsou obecně lépe vstřebávány organismem, až dvojnásobně ve srovnání s anorganickou formou selenu. Organické formy selenu jsou v těle také dlouhodobě uchovávány především v játrech, kosterní svalovině a albuminu plasmy a selen může být z těchto zdrojů podle potřeby dále využíván [2], [3].

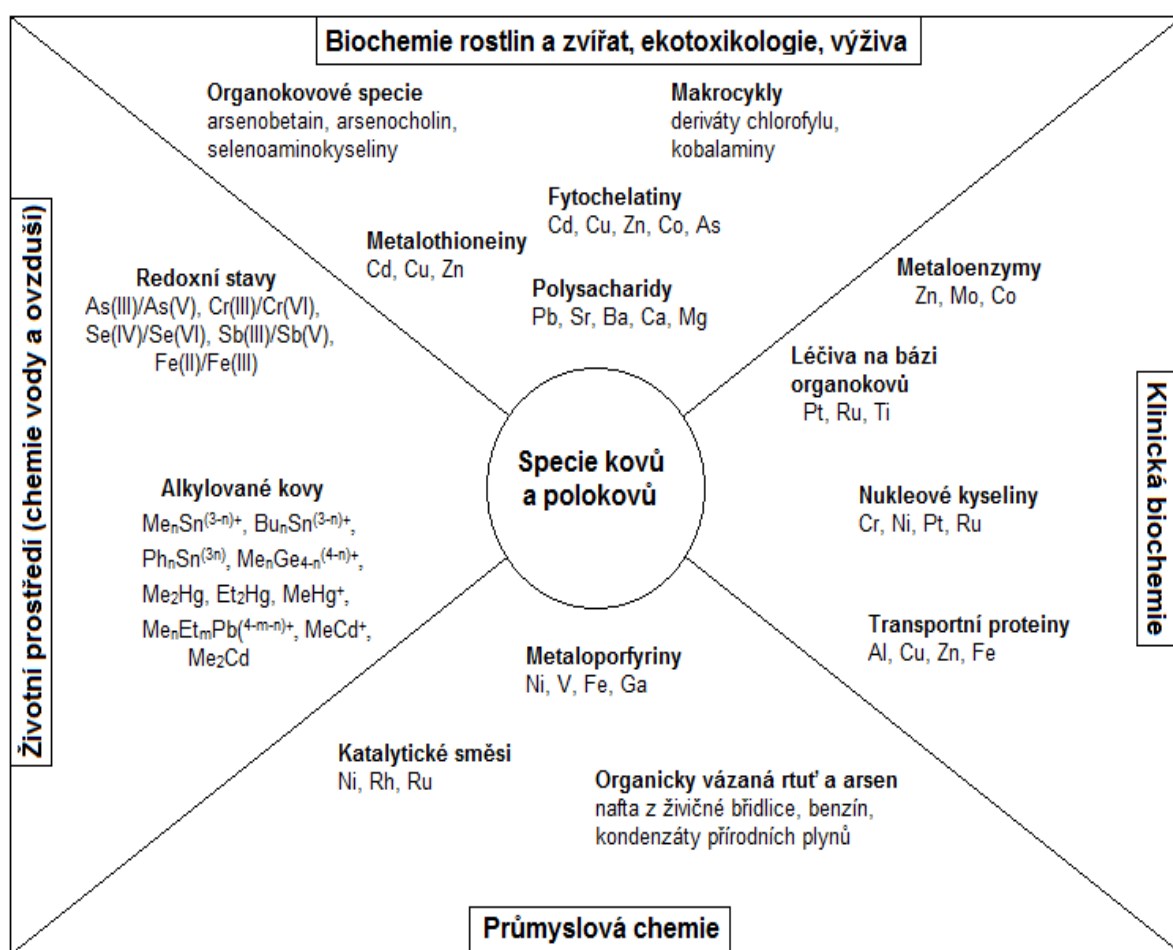
Nejen v případě selenu, ale i u ostatních kovů jsou účinky na organismus obecně závislé na chemické formě, ve které se kov nachází. Stanovení celkové koncentrace kovů se tedy v poslední době ukazuje jako nedostatečné a dochází k rychlému rozvoji nového odvětví analytické chemie – speciální analýzy [4].

Diplomová práce se zabývá studiem akumulace selenu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* a studuje možnosti přeměny selenu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* na organické formy. Ke stanovení specií selenu v různých částech kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byla využita technika HPLC-HG-AFS. Selenem obohacené kvasinky obsahující přirozeně vytvořené organické formy selenu by mohly být vhodným potravinovým doplňkem. Doposud se organické formy selenu do potravních doplňků uměle přidávají.

2 ROZDĚLENÍ A VÝSKYT CHEMICKÝCH FOREM KOVŮ

2.1 Základní rozdělení

Chemické formy kovů (specie) mohou být rozděleny na endogenní a exogenní. Mezi endogenní specie se řadí např. kovové komplexy s bioligandy nebo přírodní metabolity. Exogenní specie jsou například léčiva na bázi organokovů nebo chemické formy kovů vstupující do životního prostředí antropogenní činností. Z hlediska chemického lze specie elementárně rozdělit na koordinační komplexy, redoxní sloučeniny a organokovové specie (obsahující kovalentní vazbu uhlík-kov) [5], [6]. Na Obr. 1 je zobrazeno rozdělení chemických specií v závislosti na jednotlivých oborech.



Obr. 1 Pole zájmu a specie ve speciální analýze [6]

2.1.1 Organokovové sloučeniny v životním prostředí

Organokovové sloučeniny lze nalézt ve všech složkách životního prostředí, tedy ve vzduchu, ve vodě i v půdě. Nejčastěji vyskytujícími organokovovými plyny v atmosféře jsou např. dimethylselenid, dimethylrtuť, metylované arziny, metyl- a butylcín, trimethylstibín, alkylované olovo a dimethyltelurid. Koncentrace těchto plynů v atmosféře se pohybují v řádech od $ng \cdot m^{-3}$ do $\mu g \cdot m^{-3}$. Původ organokovových plynných látek v atmosféře může být antropogenního, ale i přírodního charakteru. Z antropogenních zdrojů se nejvíce organokovových plynů uvolňuje ze skládek odpadů. Z přírodních zdrojů se organokovové plyny do atmosféry dostávají především vulkanickou činností a z termálních minerálních

pramenů. Organokovové sloučeniny ve vodách a v půdách mají převážně antropogenní původ a pochází z průmyslových a farmaceutických odpadních vod a z aplikací různých podpůrných agrochemikálií [8].

2.1.2 Organokovové sloučeniny v průmyslu

Organické sloučeniny cínu, např. butyl- a fenylcín se používají jako ochranné nátěry konstrukcí ve vodním prostředí a sloučeniny tetraalkylolova se dříve přidávaly jako aditiva do benzínu [5].

2.1.3 Organokovové sloučeniny v klinické biochemii

Porfyriny, které jsou přítomny v přírodních zdrojích energie jako je nafta nebo uhlí mají schopnost vázat různé kovy, např. Fe, Ni, V, Ti, Ga do termicky stabilních komplexů [5].

Mezi exogenní specie se například řadí léčiva obsahující sloučeniny Pt (cis-platina, karboplatina), Ru³⁺ a Au používané při léčbě rakoviny a velký rozsah sloučenin Tc, které se používají při diagnostickém zobrazování cévních a mozkových funkcí a různých formách rakoviny [8].

2.1.4 Organokovové kovy v biochemii zvířat a rostlin

Do této skupiny se řadí aminokyseliny selenu a jejich vyšší analogy, tj. selenopeptidy a selenoproteiny. Dále do této kategorie patří sloučeniny organicky vázaného arsenu: metylarsenové kyseliny, kvartérní sloučeniny (arsenobetain) a cukry arsenu [9].

Komplexy kovů s proteiny, zahrnující enzymy, jsou nositeli biochemických funkcí. Peptidy, které jsou komplexně vázané s kovovými ionty jsou známé širokou paletou specifických funkcí (transport, regulace, katalýza, skladování) spojených s procesy v živých organismech [8].

2.2 Speciační analýza

2.2.1 Úvod do speciační analýzy

Studium chování stopových prvků v jednotlivých složkách životního prostředí přineslo v minulosti množství cenných informací o jejich výskytu, o zdrojích kontaminace, možnostech pohybu a o toxických účincích na organismy. Vývoj analytických metod, zejména technik atomové spektrometrie a elektrochemické rozpouštěcí analýzy, umožnil sledování mnoha prvků ve vzorcích z životního prostředí i na ultrastopových hladinách. Informace získané kvantitativní analýzou, tj. údaje o celkovém obsahu určitého prvku ve zkoumaném materiálu, však nemusí být vždy dostatečné pro posouzení možných účinků této hladiny prvku v daném prostředí [4].

Poznatky různých chemických oborů ukázaly, že chemické, toxikologické a biologické účinky prvků jsou rozhodujícím způsobem závislé na formě, ve které se prvek nachází ve vzorku a dále podnět pro rychlý rozvoj části analytické chemie nazývané speciační analýza [8].

V šedesátých letech došlo k vývoji postupů pro stanovení vysoce toxické methylrtuti ve vzorcích ryb, vajec, masa, jater a tělních tekutin plynovou chromatografií. Jiný způsob diferenciací mezi organickými a anorganickými formami rtuti byl proveden při selektivní

redukci sloučenin rtuti při stanovení rtuti technikou studených par atomovou absorpční spektrometrií (AAS). Tyto postupy lze považovat za první metody pro speciaci stopových množství tohoto toxického kovu.

2.2.2 Definice pojmů specie a speciační analýza

Pojem speciace byl organizací IUPAC Interdivisional Working Party vymezen jako popis distribuce prvku mezi definované chemické specie v systému. Specie byla definována jako forma prvku určená izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem, komplexem nebo molekulovou strukturou. K rozšíření termínu speciace došlo na přelomu sedmdesátých a osmdesátých let. V dnešní době je používán ve dvou významech. Zpravidla označuje postup, který má za cíl rozlišení, případně stanovení jednotlivých forem prvku ve studovaném vzorku. Pojem speciace je synonymní s jednoznačnějším výrazem speciační analýza. Jiným významem slova speciace může být také forma nebo formy prvku, v nichž se prvek ve vzorku vyskytuje, tedy fyzikálně-chemický stav prvku [4].

Speciační analýzou byly označeny analytické aktivity, které se používají k identifikaci anebo měření množství jedné nebo více specií, které jsou přítomny ve vzorku [7], [10].

Speciační analýzu definuje Florence [11] jako stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Rozlišované formy prvku mohou být různá chemická individua (např. ionty v různých oxidačních stupních, komplexy, organoprkové a organokovové sloučeniny atd.), případně mohou být definovány vazbou na jednotlivé fáze vzorku, subsystemy, skupiny sloučenin (např. bílkoviny a polysacharidy apod.) nebo na biologické struktury. Někdy se formy odlišují a definují na základě rozdílných fyzikálně-chemických vlastností jako je extrahovatelnost různými rozpouštědly, rozpustnost nebo afinita k chemicky modifikovaným fázím nebo různá reaktivita těchto forem se selektivními činidly. Analytické postupy, které nevedou k úplné identifikaci chemické specie, ale charakterizují pouze skupiny specií, jsou označovány jako frakcionace.

2.2.3 Speciační analýza v biologických materiálech

Speciační analýza v biologických materiálech je velmi obtížná. Je to způsobeno rozdílností vazebných forem stopových prvků v biologických materiálech, malou stabilitou těchto forem i samostatných bioligandů stopových prvků a skutečností, že je nutné detekovat až ultrastopová množství příslušného prvku v připravené frakci.

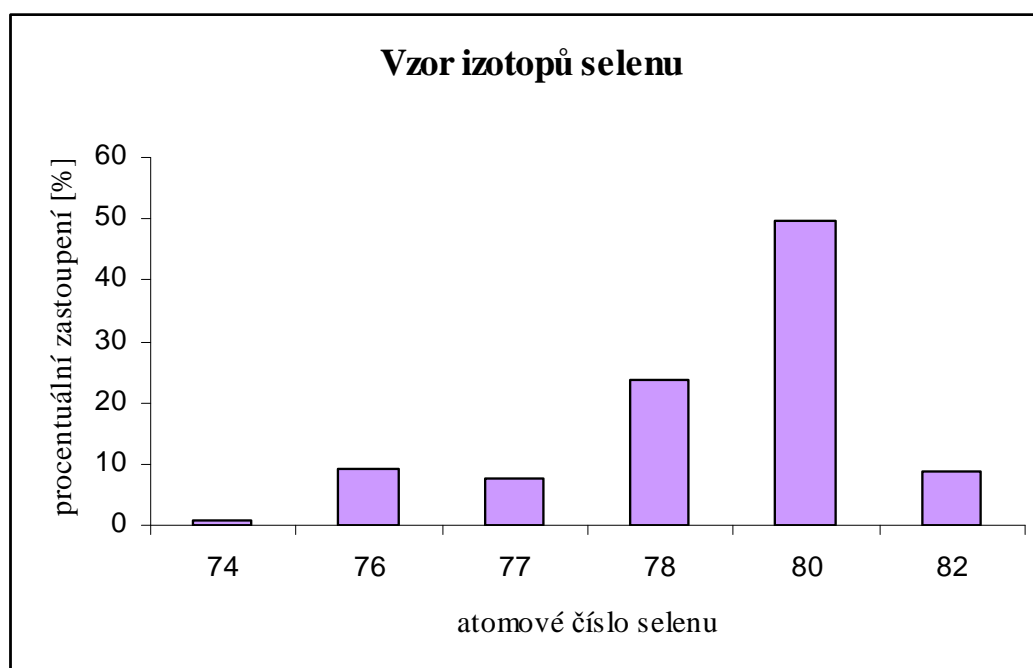
Biologické prvky obsažené v biologických materiálech interagují s přítomnými biomolekulami a ostatními složkami biologické matrice. Mohou se vyskytovat v následujících formách např. volné nebo hydratované ionty kovů a nekovů v různých oxidačních stupních, elementární forma, málo rozpustné sloučeniny (sulfidy, sírany, fosforečnany, šťavelany, hydroxidy, fyty), organokovové sloučeniny anebo kovové ionty či komplexy vázané na povrchu nerozpustných biopolymerů [4].

U většiny biologických materiálů při speciační analýze je třeba brát v úvahu, že stopové prvky a majoritní složky jsou ve vzorku distribuovány nerovnoměrně a navíc jsou obsaženy v různých nemolekulárních strukturách, buněčných stěnách nebo buněčných kompartmentech. Z tohoto důvodu se tedy používá k separaci jednotlivých podílů vzorku diferenciální

centrifugace. Způsob frakcionace a izolace analytů se musí volit s ohledem na možné změny distribuce stopových prvků mezi jednotlivé fáze nebo chemicky definované frakce účinkem chemických a fyzikálních činitelů při izolaci a frakcionaci. Proto je nutné uvažovat o důsledcích možné denaturace biopolymerů, parciální hydrolyzy určitých složek nebo chemických změn způsobených vlastními enzymy vzorku, které po rozrušení buněčných kompartmentů přicházejí do styku s reaktivními substráty [4].

3 SELEN

Prvek selen, objevený roku 1817 Jönsem Jacobem Berzeliem se řadí do skupiny p prvků nazývaných chalkogeny. Při vysokých koncentracích může být selen toxický, zatímco v nízkých koncentracích je důležitým krokem pro některé enzymy savců. Selen se podílí na mnoha reakcích, které jsou nezbytné pro správné funkce v lidském organismu. V přírodě se vyskytuje v šesti stabilních izotopech s atomovými čísly ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se a ^{82}Se a následujícím procentuálním zastoupením 0,87 %, 9,36 %, 7,63 %, 23,78 %, 49,61 % a 8,73 % (Obr. 2) [2].



Obr. 2 Procentuální zastoupení jednotlivých izotopů selenu v přírodě [2]

3.1 Výskyt v prostředí, distribuce a transport

Obsah selenu v zemské kůře je průměrně $0,09 \text{ mg.kg}^{-1}$. Jeho zastoupení v přírodě je však velmi nerovnoměrné. V přírodě selen doprovází síru, tudíž je minoritní složkou sulfidů mědi, stříbra, olova a rtuti. Nejvyšší koncentrace selenu se nacházejí v sedimentačních a vyvřelých horninách. V těchto oblastech jsou zvýšené koncentrace selenu v půdě ($30\text{-}300 \text{ mg.kg}^{-1}$). Normální hladiny selenu v půdě se pohybují v rozmezí $0,1\text{-}2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ sušiny. Přírodní vody obsahují pouze stopová množství selenu. V jezerních a říčních vodách je koncentrace selenu $0,02\text{-}10 \text{ }\mu\text{g.dm}^{-3}$. Mořská voda obsahuje selen v rozmezí $0,03\text{-}0,25 \text{ }\mu\text{g.dm}^{-3}$ [1].

V jednotlivých oblastech existují místa s nízkými nebo naopak s vysokými koncentracemi selenu v půdě. Koncentrace selenu v plodinách a v tělech zvířat jsou charakteristické pro příslušnou oblast, je-li určitá půda zemědělsky využívána pro pěstování plodin nebo pastvu. Využitelnost selenu pro rostliny je závislá na obsahu vlhkosti a kyslíku v půdě, pH půdního roztoku a obsahu železa. V aerobním mírně alkalickém prostředí je dostupnost selenu pro rostliny nejvyšší. Nejlépe rozpustné v půdě jsou sloučeniny šestimocného selenu.

Sloučeniny čtyřmocného selenu jsou méně rozpustné a rozpustnost klesá v přítomnosti oxidu železitého [1].

Vegetace z lokalit s vysokým obsahem selenu v půdě může mít obsah až desítky $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ tohoto prvku v sušině. Tyto koncentrace mohou vyvolat otravu zvířat, která spásají vegetaci. Dále existují rostliny s mimořádnou schopností akumulace selenu z půdy, tzv. selenomilné rostliny (koncentrace dosahují až tisíců $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). U většiny rostlin obsah selenu nepřesahuje $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Selen, který se silně akumuluje v rostlinách, je ve formě volných selenových aminokyselin a peptidů, jako jsou Se-methylselenocystein, Se-methylselenomethionin a selenocystathionin [1], [12].

3.2 Výskyt v potravinách a doporučené dietární dávky

V potravinách se selen vyskytuje většinou ve formě selenových aminokyselin, které jsou součástí molekul proteinů. U potravin rostlinného původu je pro obsah selenu rozhodující jeho obsah v použitých hnojivech, v půdě a jeho využitelnost pro rostlinu. Hlavní formou selenu ve většině potravin rostlinného původu je selenomethionin. Koncentrace selenu v zelenině a ovoci je velmi nízká ($0,02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [1]. Brokolice, ředkev a česnek jsou rozsáhle konzumovanou zeleninou, která se vyznačuje schopností přeměny anorganické formy selenu na selenomethylselenocystein a γ -glutamylselenomethylselenocystein (česnek). U potravin živočišného původu je selen vázán v selenocysteinu. Obsah selenu v potravinách živočišného původu je dán výživou zvířete, resp. obsahem selenu v krmivech. Některá krmiva pro zvířata se záměrně fortifikují sloučeninami selenu. Bohatým zdrojem selenu jsou mořské plody, měkkýši, koryši, krabi, sladkovodní ryby a vnitřnosti (především ledviny) jatečných zvířat [2], [13].

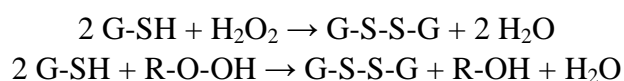
Doporučené denní dietární dávky selenu se pohybují v rozmezí $10\text{-}15\text{ }\mu\text{g}$ pro děti do 1 roku, $20\text{ }\mu\text{g}$ pro děti od 1 roku do 6 let, $30\text{ }\mu\text{g}$ pro děti od 7 do 10 let, $40\text{ }\mu\text{g}$ pro chlapce a $45\text{ }\mu\text{g}$ pro dívky od 11 do 14 let, $55\text{ }\mu\text{g}$ pro dospělé ženy a $70\text{ }\mu\text{g}$ pro dospělé muže. U těhotných a kojících žen by měla být denní dávka zvýšena na $65\text{-}75\text{ }\mu\text{g}$ [1].

Skutečný denní příjem selenu stravou je v různých zemích odlišný. V České republice je obsah selenu v potravinách velmi nízký vzhledem ke stopovým množství v půdě ($0,07\text{-}0,12\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Denní dávky se odhadují na $25\text{-}40\text{ }\mu\text{g}$ [1].

3.3 Biochemické funkce

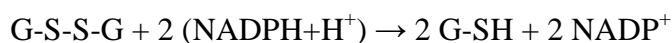
Esencialita selenu byla prokázána v roce 1957 (Schwarz and Foltz) tím, že selen zabraňuje nekróze jater u krys při nedostatku vitamínu E. Tento objev poskytl důkaz, že selen je důležitým prvkem pro savce a pro určité bakterie [1], [2].

V roce 1973 byl objeven první enzym obsahující selen glutathionperoxidasa. Tento enzym katalyzuje redukci peroxidu vodíku a hydroperoxidů mastných kyselin glutathionem:



Tyto reakce probíhají např. v erythrocytech a zajišťují odstraňování hydroperoxidů lipidů (lipoproteinů) z poškozených biologických membrán. Glutathionperoxidasa zajišťuje ochranu

proti oxidačnímu poškození biologických struktur. Po odstranění hydroperoxylové skupiny mohou být hydroxylované lipidy normálně metabolizovány β -oxidací. Redukovaný glutathion je regenerován NADPH za katalýzy glutathionreduktasy:



Izolovaná glutathionperoxidasa z erythrocytů má relativní molekulovou hmotnost 85-95 kDa a skládá se ze čtyř podjednotek (každá obsahuje v peptidovém řetězci jeden selenocystein).

Byl také objeven další selenoenzym jodtyronin-5'-dejodasa. Této dejodasy existují dva typy a to typ I, který se vyskytuje v játrech, svalch, ledvinách a štítné žláze, a typ II přítomný v mozku, nadledvinkách a hypofýze. Jodtyronin-5'-dejodasa katalyzuje dejodaci hormonu štítné žlázy tyroxinu na aktivnější trijodtyronin. Tudíž tento selenoenzym významně ovlivňuje metabolismus jodu a hormonů štítné žlázy [1], [14].

Selenu se připisují antikarcinogenní účinky. Dále je pravděpodobné, že sloučeniny selenu jsou významné pro reprodukční funkci. Selen rovněž zmírňuje toxické účinky thalia, rtuti, arsenu, kadmia a teluru [1].

3.4 Metabolismus, toxické účinky a příznaky při nedostatku

Dospělý člověk obsahuje asi 15 mg selenu. Nejvyšší koncentrace selenu jsou obsaženy v ledvinách ($0,2-1,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), játrech ($0,24-0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), kostech ($1-9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a vlasech ($0,2-1,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). V krvi se koncentrace selenu pohybuje v rozmezí od 40 do $350 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [1].

Selen je kovalentně vázán do násobných chemických vazeb. Na chemické formě závisí fyziologický účinek spotřeby selenu. Účinnost resorpce selenu v gastrointestinálním traktu člověka je vysoká, ale je závislá na přítomné formě selenu. Některé formy jsou přednostně zahrnuty do selenoproteinů (proteiny, které vyžadují selen pro katalytickou aktivitu), jiné nejsou specificky začleněny a další jsou vylučovány. Mezi převládající sloučeniny selenu nacházejících se v přírodě jsou selenan sodný, seleničitan sodný a aminokyselina selenocystein [1], [2].

Selenomethionin je resorbován z 95-97 %, zatímco seleničitan se vstřebává z 44-76 %. Selenomethionin je resorbován aktivním transportem, který využívá aktivních míst pro methionin. Seleničitan a také selenocystein se resorbují pasivně.

Vstřebaný selen je v krvi přijímán krevními buňkami, a také transportován ke tkáním krevní plazmou, která obsahuje specifický selenoprotein [1].

Seleničitan je metabolizován na hydrogenselenid (H_2Se) přes selenodigluthation a glutathion persulfid. Při nadbytku glutathionu vzniká nestálá sloučenina G-S-SeH, která se rozkládá na selan (selenovodík) a glutathion. Aminokyseliny, které obsahují selen se metabolizují metylačními reakcemi. Např. metylací selenocysteinu vzniká sloučenina $(\text{CH}_3)_2\text{Se}^+ \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, která se rozkládá na alanin a těkavý dimethylselenid $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$. Další metylací dimethylselenidu vzniká trimethylselenoniový ion $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$ [1], [2].

Selen metabolizovaný přes metylaci je z těla vylučován primárně jako trimethylselenonium močí (cca 60 %) nebo vydechován plícemi ve formě těkavých sloučenin (selan, dimethylselenid, dimethyldiselenid) [2].

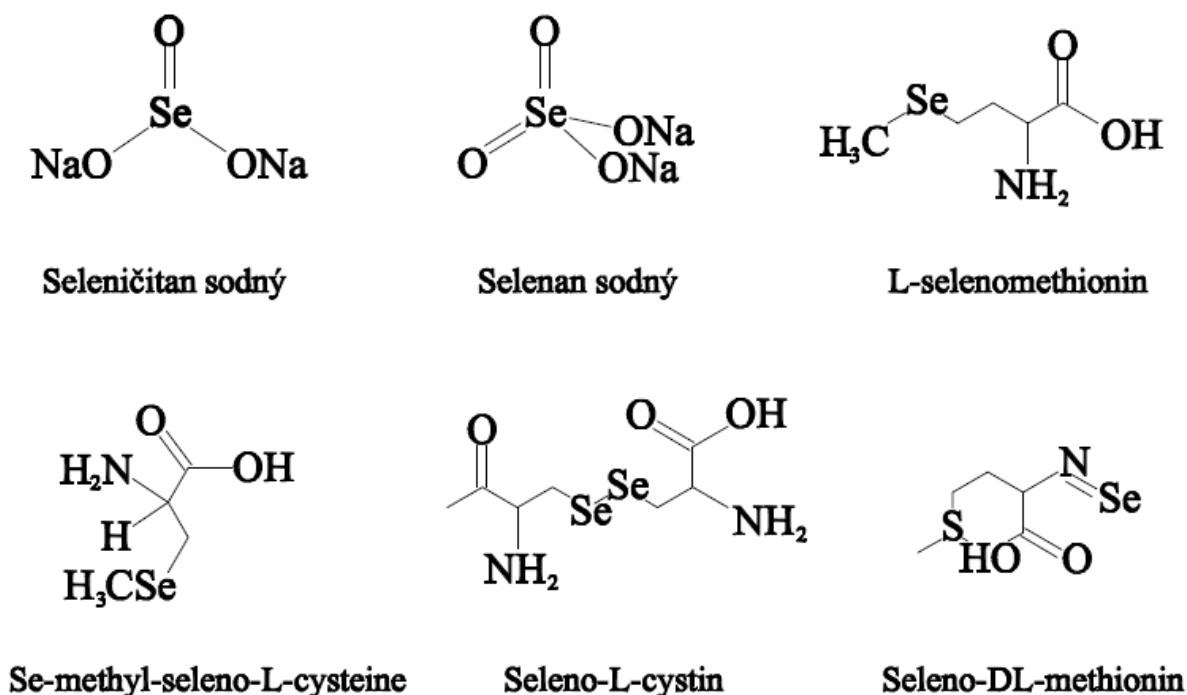
Prospěšné účinky selenu na lidské zdraví jsou závislé na jeho koncentraci. Koncentrační rozsah, ve kterém je selen považován za toxický či esenciální je velmi omezený. Odhaduje se, že příjem potravin s obsahem selenu nad 1 mg Se kg⁻¹ může působit toxicky a koncentrace pod 0,1 mg Se kg⁻¹ vede k nedostatku [2], [14].

Nemoci způsobené nedostatkem selenu jsou např. poruchy reprodukce, onemocnění bílých svalových vláken, srdeční a svalové myopatie a potlačený růst. Deficit selenu může způsobit poruchy funkce jater i svalů, předčasnou ztrátu kondice, nepříznivě ovlivňuje vnímavost vůči nemocem a optimální zdraví [1], [2], [3]. Při trvalém příjmu selenu nižším než denní doporučené dávka může docházet ke zvýšenému výskytu rakoviny, srdečních onemocnění, zánětlivých stavů všeho druhu (zvláště kožních) a také k výskytu imunitních problémů. Nedostatek selenu v průběhu těhotenství zvyšuje riziko vrozených vad [3].

Příznaky otravy se mohou u člověka objevit už při dávkách rovných dvacetinásobku denní dávky. Nadbytek selenu se projevuje zánětem dýchacích cest, edémem plic, krvácivostí, depresemi a kožními změnami. Dalšími příznaky mohou být nervozita, nevolnost a zvracení, česnekový dech, jehož nositelem je dimethylselenid a kovová chuť v ústech. Ve vážných případech se může vyskytnout žloutenka, cirhóza jater, vypadávání vlasů, nehtů, zubní kaz a selhání ledvin [1], [3].

3.5 Specie selenu

V biologických systémech se selen vyskytuje ve velmi rozmanitých chemických formách (anorganických a organických). Anorganicky vázaný selen může být ve formě Se (VI) – selenan (SeO₄²⁻), Se (IV) – seleničitan (SeO₃²⁻) nebo ve formě selenidů (H₂Se). Mezi sloučeniny, ve kterých je selen vázán organicky, patří nejjednodušší MeSeH až po složité komplexy selenoproteinů [2]. Jednotlivé specie selenu jsou uvedeny na Obr. 3.



Obr. 3 Specie selenu v biologických materiálech

4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ SPECIÍ SELENU

4.1 Příprava vzorků pro celkovou analýzu

Při rozkladu organických a biologických materiálů pro stanovení obsahu anorganických prvků je nezbytné rozložit přítomné složitější organické látky na jednodušší anorganické látky. V průběhu rozkladu organických látek na vzduchu, resp. v přítomnosti kyslíku, nebo jiné, vhodné směsi plynů, vzniká z uhlíku plynný CO_2 , z dusíku NO_x a síry SO_2 . Předpokladem pro stanovení minerálních prvků je tedy mineralizace vzorků, tj. odstranění organického podílu buď suchým anebo mokrým spalováním. Výběr metody rozkladu organických látek závisí na cíli analýzy a na povaze biologického materiálu.

V ojedinělých případech lze jednotlivé složky stanovit přímo bez mineralizace v kapalných vzorcích nebo extraktech.

Jestliže sledujeme jen jednotlivé minerální látky (zejména mikroelementy), je výhodné použít mineralizaci na mokré cestě, kdy dochází k oxidačnímu rozkladu vzorku v silně kyselém prostředí. Suchý způsob mineralizace se používá při stanovování množství a alkality popela, případně písku a rozděluje se podle použité teploty na rozklady při vysoké a nízké teplotě. Mineralizaci na mokré cestě lze dále dělit na mineralizaci v otevřeném či v uzavřeném systému. Mineralizace v uzavřeném systému může být nízkotlaká nebo vysokotlaká. Ohřev může být mikrovlnný či tepelný. V současnosti se nejvíce používá rozklad na mokré cestě za pomoci kyselin, poté následuje mineralizace na suché cestě v otevřeném systému [16], [17], [18].

Mineralizace může být častou kontaminací vzorku. Během přípravy vzorku je proto nutné pracovat s takovými zařízeními a chemikáliemi, aby byl vzorek kontaminován co nejméně. Příčinou kontaminace je např. použití nevhodných mlécích elementů (např. kontaminace niklem z nerezových součástí, hliníkem z korundových součástí atd.). Nejčastěji jde o kontaminaci mineralizátů borem při styku s chemickým borosilikátovým sklem, niklem při používání niklových kleští v průběhu manipulace se spalovacími kelímky a hliníkem při mineralizaci na suché cestě při použití oxalových kelímků [19].

4.1.1 Mineralizace na suché cestě

U této metody se uplatňují různé tepelné operace jako jsou např. tavení, pražení nebo žíhání. Mineralizace na suché cestě se provádí buď v otevřeném nebo v uzavřeném systému [15].

Klasický suchý rozklad na vzduchu, za atmosférického tlaku se řadí mezi nejdéle využívané rozklady organických a biologických vzorků. A to i navzdory nedostatkům, z kterých k nejzávažnějším patří ztráty prchavých (As, Cd, Hg, Pb, Se apod.) a někdy i neprchavých analytů (Cr, Fe atd.) ve fázi spalování, resp. zpopelňování.

Mineralizace na suché cestě se skládá ze čtyř základních kroků a to sušení, spalování (zuhelňování), zpopelňování a louhování popela [19].

Při použití suchého spalování se nejprve vzorek vysuší při $105\text{ }^\circ\text{C}$ (používá se horkovzdušná sušárna, topná deska nebo písková lázeň), zuhelní v platinovém, porcelánovém nebo křemíkovém kelímku ($400\text{ }^\circ\text{C}$) a dále se žíhá od 500 až do $900\text{ }^\circ\text{C}$ podle druhu vzorku. Zuhelnatělý vzorek se žíhá až do doby, kdy se získá bílý anebo světle bílý popel, který neobsahuje uhlíkové částice.

Rychlost mineralizace lze zvýšit přidávkem oxidačních látek, např. několik kapek peroxidu vodíku (do vychladlého vzorku), oxidu hořečnatého, dusičnanu hořečnatého, kyseliny sírové a síranu draselného. Přídavek pomocného činidla však může vzorek kontaminovat.

Jakost výrobků se posuzuje podle obsahu popela anebo jeho alkality. Celkový obsah popela se stanoví žháním při optimální teplotě, tj. 500 až 600 °C; zřídka i při vyšší teplotě (např. až při 900 °C u mouky).

Vzorky obsahující mnoho draselných solí, fosforu a síry se doporučují nejprve zuhelnatit, rozpustné látky vymýt vodou a zbytek na filtru znovu zuhelnatit a vyžít. Výluh se potom přidá k popelu a přežihá. Někdy se ke vzorku přidává octan hořečnatý anebo chlorid hlinitý a zmineralizuje se. Při stanovení popela se výsledek koriguje o množství oxidu hořečnatého, který odpovídá množství přidaného octanu hořečnatého. Na odstranění případných ztrát prchavých složek popela se přidává také chlorid hlinitý.

Suchá mineralizace je poměrně zdlouhavá, a proto se do vzorku přidávají různé katalyzátory (např. H_2O_2) nebo se přivádí do žhacích pecí proud kyslíku urychlujícího proces oxidace. Na stanovení popela lze také využít vodivost, která je úměrná obsahu popela (např. u cukrovarnických výrobků) [16], [17].

Podle Zbírala [18] je pro stanovení celkového selenu metodou AAS s generací hydridů vhodná mineralizace na suché cestě. Upravený a navážený vzorek je spalován v muflové peci postupným zvyšováním teploty. Poté se popel rozpustí ve vhodně zředěné kyselině. Přídavek kyseliny dusičné zaručí přechod prvku do správného oxidačního stavu, ve kterém nedochází ke ztrátám těkáním. Aby při následné generaci hydridů byla možná redukce mineralizátu, musí se pro další rozpouštění použít kyselina chlorovodíková místo kyseliny dusičné.

4.1.2 Mineralizace na mokré cestě

Mokřý rozklad je velmi rozšířeným, klasickým typem rozkladů. Mineralizace potravin mokrou cestou slouží k získání mineralizátu, ve kterém se stanovují jednotlivé minerální složky. Pro tento typ rozkladu se používají prakticky všechny známé minerální kyseliny a jejich směsi, např. HCl , H_2SO_4 (konc. 98 %), HNO_3 (konc. 65 %), $HClO_4$ (konc. 70 %), HF (konc. 40 %) a $NaOH$. U mineralizace na mokré cestě je vysoký požadavek na čistotu používaných chemikálií, protože každý přídavek další látky zvyšuje nebezpečí kontaminace vzorku. Rozklady mohou probíhat v otevřeném, polouzavřeném nebo uzavřeném systému [16], [17].

Vzorek se spaluje v Kjeldahlově baňce ve směsi např. kyseliny sírové nebo dusičné. Vzorky obsahující větší množství vody se předem vysuší. Při mineralizaci se také tvoří dýmy oxidu dusíku a síry, které je třeba odsávat, aby nepodráždily dýchací cesty.

Mineralizace na mokré cestě se dá urychlit přidáním katalyzátoru např. H_2O_2 , manganistanem draselným apod. Vzorek, který je správně zmineralizovaný má čirou, bezbarvou anebo mírně nažloutlou barvu [16].

Místo kyseliny dusičné je možné použít kyselinu chloristou, trichloroctovou nebo jinou kyselinu. Čistota jednotlivých použitých kyselin na mineralizaci musí být vysoká, aby se tím nezvyšoval obsah minerálních látek. Přesných výsledků lze dosáhnout paralelním stanovením slepého pokusu. Teplota rozkladu roste se zvyšujícím se tlakem. Potřebné teplo pro rozklad lze dodat klasickým ohřevem (vedením, sáláním), konvenčním ohřevem, nebo generovat přímo v rozkladné směsi pomocí mikrovlnného záření [16], [19].

4.1.3 Mineralizace za použití mikrovlnného záření

Mikrovlnou mineralizaci lze rozdělit na dva typy, a to buď s rozptýleným nebo usměrněným (fokusovaným) mikrovlnným zářením. Mineralizátory s rozptýleným zářením pracují podobně jako kuchyňské mikrovlnné trouby.

V dnešní době se většinou používají přístroje s fokusovaným mikrovlnným polem. Mikrovlny působí přímo na vzorek v rozkladné nádobce, ve které se mění energie mikrovlnného záření na teplo. Materiál rozkladných nádobek (teflon) působí jako izolátor.

Využití mikrovlnných mineralizátorů je dnes velmi mnohostranné a jeho velké rozšíření je spojeno zejména s významným zkrácením času potřebného k rozkladu vzorku, snížením množství používaných kyselin a dalších činidel, dosažením prakticky úplného rozrušení matrice vzorku, minimální kontaminací vzorku, zlepšením hygieny práce, zamezením ztrát těkavých analytů apod [20].

4.2 Příprava vzorků pro speciální analýzu – extrakční metody

Analytické metody stanovení kovových i nekovových analytů vyžadují, aby byl vzorek před měřením převeden do roztoku. Je nutné před vlastní analýzou uvolnit stanovované analyty z různých vazeb a forem, proto se musí zvolit takové extrakční postupy, které uvolňují analyty do roztoku kvantitativně a bez jakýchkoli chemických změn [19], [21].

Účinnost extrakce je závislá na přítomných speciích, typu rozpouštědla, povaze látky, době extrakce a teplotě [22].

Chromatografické separaci stanovení selenových specií obvykle předchází extrakce vzorku. Extrakční metody, které částečně rozpouštějí vzorek jsou založeny na použití mikrovlnného ohřevu, ultrazvuku nebo mechanického protřepávání s organickými nebo anorganickými rozpouštědly. Tyto procesy zahrnují využití horké vody [23], směsi voda-methanol, směsi voda-methanol-chloroform, kyselou hydrolýzou [24] a pufrů [25]. Enzymatická hydrolýza se využívá u vzorků obsahujících proteiny. Pro speciaci selenu v biologických materiálech jsou používány enzymy jako proteázy, proteinázy, lysozym-proteázy nebo proteázy-lipázy [22].

Extrakční metody mohou být prováděny postupnou extrakcí, a to nejprve extrakce podílu vzorku rozpustného ve vodě (extrakce vodou) a poté podílu ve vodě nerozpustném (extrakce pomocí enzymů) [22].

Dále je možné rozdělit vzorek na frakci rozpustnou ve vodě (extrakce Tris-HCl pufrům), frakci rozpustných bílkovin (extrakce Tris-HCl pufrům s přidavkem SDS) a zbytek (extrakce koncentrovanou HNO_3) [24].

Další autoři rozlišují mezi frakcí specií selenu rozpustných ve vodě (extrakce horkou vodou), frakcí selenu vázaného v buněčných stěnách (extrakce driselázou v Tris-HCl pufru), frakcí ve vodě nerozpustných selenoproteinů (extrakce Tris-HCl s přidavkem SDS), frakcí zbytkových selenoproteinů (enzymatická hydrolýza) a zbytkem (extrakce tetramethylamonium hydroxidů – TMAH) [22].

4.2.1 Extrakce vodou

Selenoaminokyseliny jsou dobře rozpustné ve vodě. Extrakce horkou vodou je dostačujícím u specií selenu, které nejsou zabudovány do velkých molekul.

Extrakce horkou vodou byla použita u seleničitých kvasinkových tablet, které byly používány jako selenové potravní doplňky. K 25 ml deionizované vody byl přidán 1,0 g vzorku a směs byla umístěna ve zkumavce do horké lázně po dobu jedné hodiny [26].

Selenizované droždí bylo extrahováno horkou vodou (85-90 °C) po dobu jedné hodiny a analyzováno pomocí HPLC-ICP-MS. Extrakce horkou vodou měla účinnost pouze 10 %, získaný extrakt obsahoval velmi slabě vázané, ve vodě rozpustné, sloučeniny selenu a to selenoaminokyseliny, seleničitan, selenoglutathion a trimethylselenium. Získané výsledky z extrakce horkou vodou byly téměř stejné jako výsledky po extrakci ve směsích metanol-HCl a neutrálním pufru (Tris-HCl při pH 7). Stanovovaný vzorek droždí obsahoval až 90 % selenu přítomných ve speciích, které však nejsou rozpustné ve vodě. Přídavkem TMAH v horké vodě (60 °C) po dobu 4 hodin se účinnost extrakce zvýšila téměř na 100 % [27].

4.2.2 Extrakce organickými rozpouštědly

U extrakce organickými rozpouštědly byl použit metanol v 0,2 M HCl na extrakci vzorku selenizovaného droždí. Tato směs byla inkubována v ultrazvukové lázni po dobu jedné hodiny. Účinnost této extrakce byla identická s extrakcí pomocí horké vody [27].

4.2.3 Extrakce neutrálními pufrů

Extrakce neutrálními pufrů jsou nejčastěji založeny na použití Tris-HCl pufru při neutrálním pH. U extrakce vzorků kvasinek obohacených selenem byla účinnost této extrakce srovnatelná s extrakcí vzorku horkou vodou. Přídavkem SDS (denaturační činidlo pro proteiny) lze zvýšit účinnost extrakce [25].

Účinnost extrakce z droždí obohaceného selenem byla 37 % při použití extrakce amonium fosfátovým pufrům (pH 7,5), který byl složen z 0,15 M NaCl, 0,1 mM PMSF, 1 mM EDTA a 5% SDS [27].

4.2.4 Extrakce kyselinami

Při analýze selenizovaných kvasinek a selenu v rostlině *Brassica juncea*, která akumuluje selen, byla použita extrakce kyselinou chlorovodíkovou. K extrakci byly použity tři různé koncentrace HCl a to 0,5 M, 1 M a 2 M [24].

Dále extrakce kyselinami HNO₃ (o koncentraci 2 M) a HCl (o koncentraci 4 M) byla použita při analýze specií selenu v půdách [28].

4.2.5 Extrakce amoniakem

Potravní doplňky obohacené sloučeninami selenu byly extrahovány vodou se 6% amoniakem za současného působení ultrazvuku [30].

4.2.6 Enzymatická extrakce

K této extrakci se používají různé enzymy, jako jsou proteázy, které jsou schopné štěpit peptidové vazby proteinů přítomných ve vzorku. Nejčastěji používané jsou Proteáza XIV [14], [24], což je nespecifická proteáza štěpící peptidové vazby proteinu přítomného ve vzorku.

Další využívané enzymy mohou být proteáza z *Bacillus licheniformis* [29], driseláza, směs nespecifické proteázy a lipázy. Driseláza je pektolytická směs enzymů, která se používá k narušení buněčné stěny hub a díky tomu se dá využít také k extrakci specií selenu ze selenizovaného droždí.

Působením enzymu by mělo dojít k uvolnění selenu obsaženého v buněčných stěnách a také chemicky nebo fyzikálně-chemicky koordinované komplexy v komponentech buněčné stěny [29].

Enzymatickou extrakci lze doplnit i různými činidly, jako jsou např. 0,05 M NH_4HCO_3 , PMSF v 0,03 M Tris-HCl pufru nebo kombinace s pufrů (0,1 M citráto-fosfátový pufr [29]). Extrakce v selenizovaném droždí byla účinná z 88 % při použití proteázy XIV s lipázou v fosfátovém pufru při 37 °C po dobu 16 hodin [27].

5 SPECIAČNÍ ANALÝZA SELENU

5.1 Metody využívané při speciální analýze selenu

Při stanovení selenu se všeobecně používají metody atomové spektrometrie, a to atomová absorpční spektrometrie s generací hydridů (HGAAS), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP OES) a atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) [20].

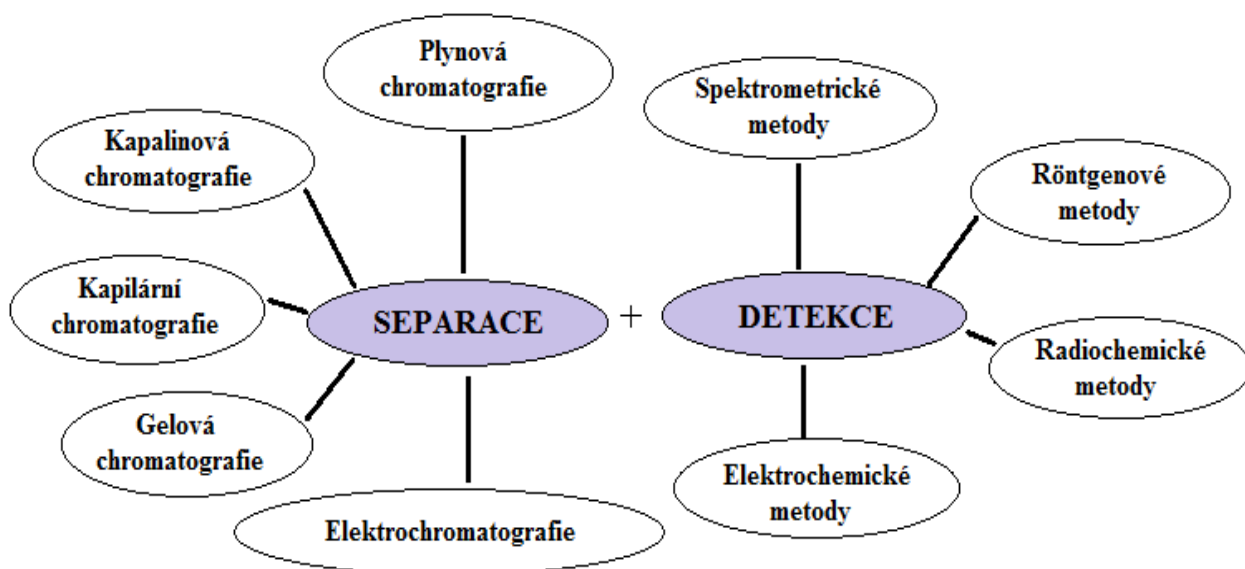
Nejvhodnější analytické řešení pro speciální analýzu představují tzv. spojené techniky („hyphenated techniques“), které poskytují dostatečné množství kvalitativních a kvantitativních informací [6].

Separace anorganických specií selenu může být provedena plynovou chromatografií (GC), prováděna přeměnou těkavých forem sloučenin selenu. Více používanou technikou je však kapalinová chromatografie (LC) ve formě iontově výměnné, iontově párové či gelové chromatografie. Pro speciální analýzu selenu se většinou používá spojení kapalinové chromatografie s technikami schopnými detekce kovů. K finální detekci separovaných chemických forem selenu se nejčastěji používají hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová fluorescenční spektrometrie s generací hydridů (HGAFS) a atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP AES) [31], [32], [33], [34].

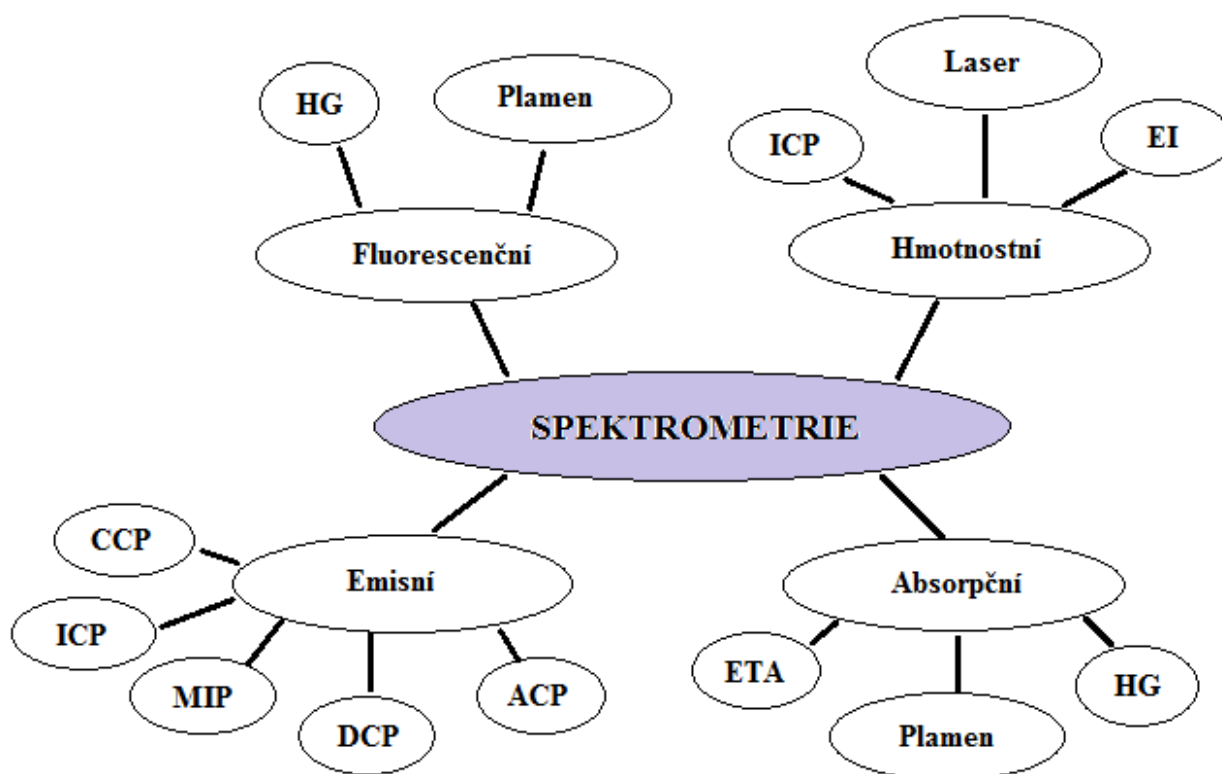
5.1.1 Spojení separačních a detekčních technik ve speciální analýze

Spojené techniky (hyphenated techniques), termín zaveden roku 1980 Hirschfeldem [6], jsou nejvhodnějším analytickým řešením při poskytování kvalitativních a kvantitativních informací o prvkových speciích ve stopovém a ultrastopovém obsahu ve složitých maticích. Nejčastěji používané spojené techniky jsou uvedeny na Obr. 4 a Obr. 5. Uvedené techniky jsou většinou použitelné pro kapaliny. U tuhých látek musí být možnost jejich převedení do roztoku bez ztráty anebo poškození informací o speciích. To je však velmi pracné a také zdrojem mnoha chyb [8].

Diplomová práce se zabývá spojením technik vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), jako separační části, s použitou detekční částí atomové fluorescenční spektrometrie s technikou generování hydridů (AFS-HG). Proto jsou v dalších kapitolách tyto metody podrobněji popsány.



Obr. 4 Schéma spojení separačních a detekčních technik ve speciální analýze ([8] částečně upraveno)



Obr. 5 Schéma nejčastěji používaných spektrometrických technik ([8] částečně upraveno)

5.2 Separáční část - Kapalinov chromatografie

5.2.1 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při níž se využívá mnohokrát opakovan ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Jedna fáze je pritom vždy pohybliv (plyn nebo kapalina) a nazývá se mobilní bez ohledu na skupenství. Druhá je nepohybliv (tuh nebo kapalina), označuje se jako stacionární a v chromatografii může být v různých formách.

Chromatografie se většinou používá ke kvalitativn a kvantitativn analýze vzorku. Vzorek se umístí na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen soustavou. Ve stacionární fázi se mohou složky vzorku zachycovat, tedy se zdržují při pohybu. Ty složky, které stacionární fáze vže silněji, jsou více zdrženy. Tm se od sebe separují jednotlivé složky a mne zdržované složky se drve dostávají na konec stacionární fáze [35].

5.2.2 Princip kapalinov chromatografie

Principem metody u kapalinov chromatografie je použit kapaliny jako mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi stacionární a mobilní fázi. Možnými druhy separace mohou být adsorpce, iontov výměna, rozdělování na základě rozdíln rozpustnosti, specifick interakce v afinitn chromatografii a molekulov stov efekt.

K uinn separaci je potebn použit dostatečné množství malých zrníček sorbentu, která kladou značný odpor prostupující kapalině. Je tedy nutné pracovat při vysokm tlaku [35], [36].

5.2.3 Stacionární fáze v HPLC

Rozhodujícím vlivem na separaci při použit nplnvch kolon je velikost a uspořádanost částic. Kolony se pln polymerem o definovan proovitosti. Základem většiny npln je silikagel, buď ve formě pln porézních částic nepravidelného tvaru, nebo pln porézních kulovitých částic (u těchto částic je separace uinnjší). Bžne užívané velikosti částic jsou 5 ař 10 μm , avšak dnes jsou dostupn komerční npln s velikostí částic 2 μm a mn.

Silikagel se modifikuje pomocí vazby Si-O-Si, a to kdyř se silanolové skupiny ($\equiv\text{Si-OH}$) na silikagelu nechají reagovat v nepolárním rozpouštědle např. s oktadecyltrichlorsilanem [37].

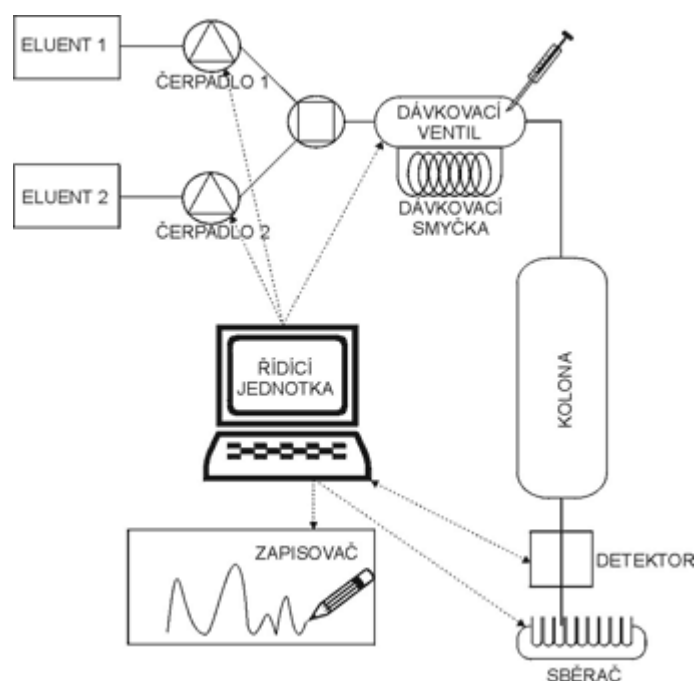
5.2.4 Mobilní fáze v HPLC

Mobilní fáze se vznamne podl na separaci složek. Změna složení mobilní fáze je prakticky neomezen a je vždy jednoduřší zmnit složení mobilní fáze neř použit jinou stacionární fázi. Změnami složení rozpouštědel, pH, intov provmi činidly a iontovými silami lze ovlivnit složení mobilní fáze. Dále pomocí polarit a selektivitě charakterizujeme mobilní fázi.

Polárními mobilními fázemi mohou být např. alkoholy (methanol, alifatick alkoholy aj.), ethery (tetrahydrofuran, diethylether, dioxan) a nitrily (acetonitril). Tyto eluenty vřak mívají pliř velkou eluční sílu, proto se používají ve směsi s vodou.

Vlastnosti mobilních fází jsou velmi dležit z hlediska separace a detekce [37], [38].

5.2.5 Instrumentace



Obr. 6 Schéma HPLC sestavy [39]

Jednotlivé části chromatografu HPLC:

Zásobník mobilní fáze

Do čerpadla se přivádí odplyněná mobilní fáze ze zásobníku (u HPLC se používají rozpouštědla toxická, proto je nutné mít uzavřené zásobníky a mít HPLC přístroj napojen na odťah) přes filtr (zachycení případných nečistot přítomných v mobilní fázi).

Odplynění se provádí proto, aby v detektoru nevznikaly bubliny. Lze je odstranit pomocí podtlaku, ultrazvuku, probublávání heliem nebo kombinací jednotlivých postupů.

Čerpadlo

Kapalinu lze čerpat do kolony pomocí pístových nebo membránových čerpadel. Čerpadlo musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze v rozsahu asi $0,1$ až $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, tento průtok je plynule regulovatelný. Průtok mobilní fáze by neměl překročit 2 % při tlaku až 35 MPa a také by měl být bez pulzů. I při velmi nízkém pracovním tlaku např. 10 MPa by měla být splněna podmínka konstantního průtoku mobilní fáze a jeho plynulé regulovatelnosti.

Veškeré části čerpadla jsou většinou zhotoveny z nerezové oceli, keramiky nebo plastu. Tyto materiály musí zaručit, aby nedocházelo ke kontaminaci mobilní fáze nebo ke korozi těchto částí. Ventily řídící tok eluentu jsou často vyrobeny ze safíru nebo pryže.

Nejčastěji používanými čerpadly jsou pístová. Při pohybu pístu vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do chromatografického systému a při pohybu zpět se komora naplní. Výškou zdvihu pístu se řídí množství dodávané mobilní fáze.

Výhodou pístových čerpadel je nepřetržitá dodávka a snadná změna mobilní fáze. Jednočinné pístové čerpadlo způsobuje rušivé tlakové pulzy, proto se používají dvojčinná

čerpadla, v sérii zapojená čerpadla a čerpadla využívající dvou nebo více pulzů. Pro dokonalé vyhlazení pulzů se využívá řízení čerpadla pomocí mikroprocesoru.

Čerpadla na principu injekční stříkačky naplněné zásobou mobilní fáze jsou další alternativou k čerpadlům pístovým.

Nevýhodou tohoto čerpadla je omezený objem mobilní fáze, který vyžaduje časté naplňování, avšak práce probíhá bez pulzů a s velmi nízkým průtokem rozpouštědla.

V kapalinové chromatografii se také používají membránová čerpadla, která mají prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou. Tento prostor je oddělen membránou od pracovního prostoru pro mobilní fázi.

Směšovací zařízení

Ve směšovací komoře je směs dokonale rozmíchána před vstupem do čerpadla. Složení mobilní fáze může být stále (neboli izokratická eluce) nebo se může během separace měnit (tedy gradientová eluce). Směšovací zařízení je vybaveno zásobníky s různými kapalinami. Je schopno po naprogramování připravit směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace. V gradientových zařízeních je možno nastavit libovolný průběh gradientu složeného ze dvou až tří eluentů v závislosti na čase.

Dávkování vzorku

Vzorek se dávkuje třicestným analytickým dávkovacím ventilem, který má dvě pracovní polohy, poloha plnění – LOAD a poloha dávkování – INJECT, pomocí injekční stříkačky. Nevýhody dávkování injekční stříkačkou jsou jednak těsnost, udržení tlaku a vnesení stop materiálu injekční stříkačky.

Injekční zařízení je ovládáno ručně nebo automaticky. Většinou bývají vyrobeny z inertních materiálů (titan, nerezová ocel, některé polymery).

Náhradou za injekční stříkačky je dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem. K dávkování se používá šesticestný kohout s vyměnitelnou smyčkou. Obsah dávkovací smyčky je 10 nebo 20 μl . Smyčka je připojena na kohout a je plněna pomocí injekční stříkačky. Nejprve se naplní smyčka vzorkem a poté se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony. Dávkování je reprodukovatelné, její opakovatelnost nástřiku se pohybuje okolo 0,2 % a lze jej plně automatizovat.

Až do tlaku 40 MPa je schopen dávkovat šesticestný kohout.

Hojně se také používá systém se sedmicestným kohoutem. U tohoto kohoutu je možno měnit dávkovací smyčky různého objemu.

Je-li použit slabý eluent, může být dávkován větší vzorek (řádově stovky μl). Vzorek se tedy zachytí v hlavě kolony, zatímco eluent postupuje dále. Změníme-li slabší eluent za silnější, dosáhneme eluce analytů.

Vzorky v řádu zlomků μl se aplikují v kolonách o malých vnitřních průměrech pomocí speciálních mikroinjektorů.

Kolony

U HPLC používáme výhradně náplňové kolony. Většinou se zhotovují z nerezové oceli, plastu nebo skla. Při konstrukci je upřednostňována rovná trubka s délkou v rozmezí 10 až

50 cm. Pro analytické účely se používají poměrně krátké kolony (10, 15 a 25 cm), jejich vnitřní průměr je 4,6 nebo 5 mm a vnější průměr ¼ palce (palec = 2,54 cm).

Pro HPLC je důležité, aby vnitřní průměr kolon byl vždy stejný po celé délce a také vnitřní povrch zcela hladký (např. leštěný).

Průtok eluentu kolonou bývá 1 – 2 ml za minutu. Pro rychlé separace se volí krátké analytické kolony délky jen 3 cm. Spotřebují jen malé množství mobilní fáze a jsou také levnější. Objemový průtok eluentu je 4 ml/min. Průměr náplňového materiálu je 3 až 10 µm.

Tab. 1 shrnuje jednotlivé typy náplňových kolon v HPLC, jejich vnitřní průměry a objem průtoku mobilní fáze.

Tab. 1 Srovnání vnitřních průměrů a průtoků u jednotlivých HPLC kolon

typ kolony	vnitřní průměr	objem průtoku mobilní fáze
Náplňové (konvenční)	3 – 4,5 mm	1 ml.min ⁻¹
Semimikronáplňové	2,5 mm	0,2 – 0,4 ml.min ⁻¹
Mikronáplňové	0,8 – 1 mm	20 – 60 µl.min ⁻¹
Kapilární náplňové	0,15 – 0,5 mm	1 – 15 µl.min ⁻¹
Otevřené kapiláry	10 µm	1 ml.min ⁻¹

U kolon s velmi malým vnitřním průměrem 1 – 2 mm je délka v rozmezí 25 – 50 cm. Jejich účinnost je velmi vysoká, nejsou příliš ekonomicky náročné a spotřebují malé množství rozpouštědla 10 až 100 µl za minutu.

V některých případech je možné spojit dvě kolony za sebou, kdy jedna tvoří tzv. předkolonu. Tyto předkolony plní funkci ochrany kolony před nečistotami a nerozpustnými nečistotami [35], [37], [38], [40].

Eluát je veden z kolony do detektoru, kde se signál detektoru vyhodnocuje počítačem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením.

Detektory

Při samostatném použití HPLC se využívá mnoho druhů detektorů. Použité detektory v HPLC musí vyhovovat určitým požadavkům. Detektory by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Důležité je, aby měl detektor malý vnitřní objem, což přispívá k rozmytí elučních křivek.

Detektor by měl mít reprodukovatelný a stabilní signál, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu (široký lineární rozsah). Dalším důležitým parametrem je citlivost, která by měla být co největší a mez detekce naopak co nejnižší. Šum signálu je nutné eliminovat na co nejnižší hodnotu a neměl by obsahovat drift.

Detektory lze rozdělit na univerzální (tyto měří vlastnosti systému jako celku, např. index lomu, relativní permitivita, tepelná vodivost) a selektivní (měří elektrolytický proud při určitém potenciálu, absorpenci při určité vlnové délce apod.).

Používané detektory v HPLC jsou fotometrické, refraktometrické, fluorimetrické, elektrochemické a hmotnostní [37], [38].

V diplomové práci je využíváno spojení HPLC-HG-AFS, kde jako detektor slouží právě atomový fluorescenční spektrometr s generací hydridů. Proto výše uvedené detektory jsou pouze informativní a použitelné při samostatném využití HPLC.

5.3 Detekční část I - Generování a atomizace těkavých sloučenin

Ve stopové analýze se často využívá tvorby těkavých sloučenin a jejich následné separace do plynné fáze. Takovými sloučeninami jsou např. některé hydridy, organokovové sloučeniny, cheláty, halogenidy, karbonyly kovů, methylester kyseliny borité a z prvků rtuť aj. Pro stanovení metodami atomové spektrometrie je třeba analyt přeměnit na některou z těchto těkavých forem prvku. Poté následuje její uvolnění ze vzorku, vedení do atomizátoru a atomizace [41].

U metod atomové spektrometrie je pravidlem, že vzorek může být přiváděn do detektoru/atomizátoru buď v plynné nebo kondenzované fázi. Dávkování v plynné fázi je založeno na generování těkavých sloučenin analytu. Principem generování těkavých sloučenin je selektivní převedení analytu z kapalného vzorku do plynné fáze. Tento převod je způsoben pomocí chemické reakce vedoucí ke vzniku těkavé sloučeniny analytu. Technika generování hydridů je velmi populární díky jednoduchosti a nízké ceně potřebného vybavení. Hlavní předností je separace analytu od matrice a jeho nakoncentrování. Tím také dochází k omezení rušivých vlivů při detekci/atomizaci a k vysoké citlivosti.

Kovalentní binární hydridy jsou nejčastěji generovanou třídou těkavých sloučenin. Spojení generace hydridů s některou metodou analytické atomové spektrometrie se běžně využívá pro stanovení As, Bi, Ge, Pb, Se, Sb, Sn, Te a někdy i pro stanovení In, Tl a Cd. Značné pokroky v instrumentaci a metalurgii generování hydridů umožňují stanovení hydridotvorných prvků ve velice nízkých koncentracích v rozsáhlé škále materiálů, a to od biologických a environmentálních až po metalurgické [42], [43].

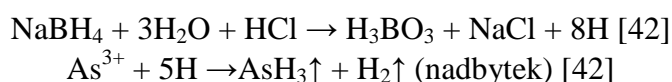
Stanovení hydridotvorných prvků se provádí spojením dvou nezávislých kroků. Prvním je generování hydridů, dalším atomizace hydridů a detekce.

5.3.1 Generování hydridů

Generování hydridů je proces, skládající se ze dvou základních kroků. Nejprve je analyt v okyseleném vzorku konverzí přeměněn na hydrid a poté převeden do plynné fáze. Druhým krokem je transport uvolněného hydridu do atomizátoru pomocí proudu nosného plynu [42].

Pro převedení analytu na hydrid je nejčastěji používáno redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný NaBH_4 (stabilizovaný roztokem NaOH) v prostředí různé koncentrace kyseliny. Optimální koncentrace NaBH_4 jsou v rozmezí několika řádů v závislosti na analytu a na typu generátoru hydridu. U kyselin lze zpravidla pracovat ve velmi širokém rozsahu koncentrace, od téměř neutrálních roztoků až po velmi koncentrované. Nejčastěji se používá HCl o koncentraci 1 mol.l^{-1} .

Roztok tetrahydroboritanu lze rozkládat i v alkalickém prostředí. V koncentrovanějších roztocích hydroxidu je rozklad pomalejší, avšak vyšší koncentrace hydroxidu mohou být nežádoucí kvůli riziku kontaminace. Běžná koncentrace NaOH se pohybuje v rozmezí 0,05 – 2 %. Vhodně zvolené podmínky a nepřítomnost interferentů umožňují uvolnění hydridů s účinností téměř 100 % [42], [43], [44].



Pro generaci hydridů jsou vytvořeny dva základní postupy. Při přímém přenosu je uvolněný hydrid z reakční směsi veden přímo do atomizátoru, naproti tomu u generátorů hydridů s kolekcí (vymrazování hydridů) je hydrid nahromaděn v kolekčním zařízení a po ukončení reakce převeden do atomizátoru.

Reakce vzorku s tetrahydroboritanem a separace plynné fáze od reakční směsi mohou být prováděny dávkově nebo technikou průtokové analýzy. U dávkového uspořádání je k dávce vzorku v reakční nádobě přidáván hydroboritan a současně dochází k separaci. Průtoková analýza probíhá následovně: dochází ke styku dvou konstantních proudů, a to alkalického roztoku tetrahydroboritanu a buď kyselého roztoku (kontinuální uspořádání), nebo zředěné kyseliny, do které jsou přidávány malé objemy vzorku – uspořádaná na principu průtokové injekční analýzy (FI). U průtokového uspořádání probíhá separace plynné fáze přiváděním konstantního proudu reakční směsi do separátoru fází. Z tohoto separátoru odchází dva konstantní proudy (plyn s hydridem do atomizátoru a zreagovaná kapalina do odpadu) [42].

Uvolněný hydrid se do atomizátoru transportuje pomocí nosného plynu, který může ulehčit uvolnění hydridů z roztoku vzorku. Podmínkou nosného plynu je inertnost vůči hydridům. Nejčastěji používaný nosný plyn je argon. Někdy se dá použít také dusík, případně helium nebo vodík.

5.3.2 Atomizace hydridů

Atomizátor převádí hydridy na volné atomy. Je důležité si uvědomit, že zastoupení jednotlivých forem (sloučenin) analytu v hydridových atomizátorech je obvykle daleko od termodynamické rovnováhy - volné atomy jsou za pracovních teplot většiny hydridových atomizátorů „termodynamicky zakázány“. Z toho vyplývá, že atomizace hydridů není termický proces – hydridy jsou atomizovány interakcí s vysoce energetickými vodíkovými radikály. Kvalita hydridových atomizátorů je tedy dána jejich schopností produkovat dostatečné množství „vhodně“ rozložených vodíkových radikálů [42].

V současné době jsou nejrozšířenějšími atomizátory křemenné trubice, obvykle vyhřívané, buď plamenem acetyl-vzduch, či odporově. V posledních letech se stávají velice populární grafitové atomizátory (záchyt v grafitové květi). Dalším atomizátorem je difúzní plamen [42].

5.4 Detekční část II - Atomová fluorescenční spektrometrie

5.4.1 Princip atomové fluorescenční spektrometrie

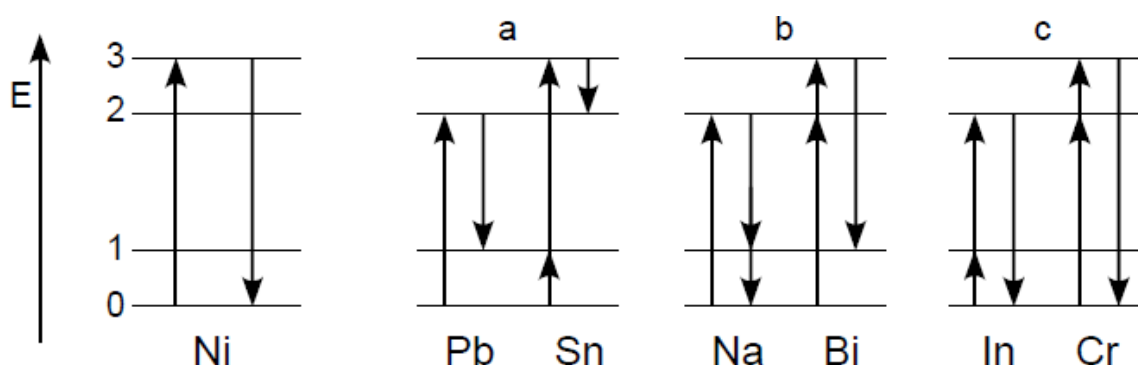
Atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) sleduje emisi záření plynnými atomy, které byly excitovány absorpcí elektromagnetického záření. Fluorescenční spektra jsou velmi jednoduchá, protože excitace čárovým zdrojem je selektivní, detekce nevyžaduje složitý optický systém. Předpokládá se, že v analytickém prostředí je většina atomů v základním nevzbuzeném stavu. Poté nejsilněji jsou absorbovány tzv. rezonanční čáry, které odpovídají přechodu atomu mezi stavem základním a některým vzbuzeným stavem. Těchto čar se využívá k měření. Tyto čáry mají největší koeficient κ a také největší citlivost. Pro praktická

měření mohou být využity i nerezonanční čáry. Na těchto čarách se poté měří s menší citlivostí [36], [37].

AFS má nevýhodu v požadavku excitačního zdroje pro každý prvek. Fluorescence není příliš účinný proces, dutokatodové výbojky musí produkovat vysokou intenzitu záření a tím se také snižuje jejich životnost. Také neexistují vhodné výbojky pro všechny prvky. Řešením je laditelný laser, který je ale příliš drahý [36].

5.4.2 Vznik fluorescenčních spekter

Fluorescenční záření vysílané atomy může mít stejnou, delší a ojediněle i menší vlnovou délku než záření excitační, tj. absorbované. Podle typu elektronových přechodů můžeme rozlišovat rezonanční fluorescenci od nerezonanční Obr. 7 [43].



Obr. 7 Elektronové přechody atomové fluorescence: rezonanční - Ni ($\lambda = 232,0 \text{ nm}$); nerezonanční: a) přímá - Pb ($\lambda_{exc} = 283,3 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 405,8 \text{ nm}$); Sn ($\lambda_{exc} = 270,6 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 333,1 \text{ nm}$); b) postupná - Na ($\lambda_{exc} = 330,2 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 589,0 \text{ nm}$); Bi ($\lambda_{exc} = 206,2 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 293,8 \text{ nm}$); c) anti-Stokesovská - In ($\lambda_{exc} = 451,1 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 410,2 \text{ nm}$); Cr ($\lambda_{exc} = 359,3 \text{ nm}$, $\lambda_{fl} = 357,9 \text{ nm}$) [43]

U rezonanční fluorescence jsou vlnové délky excitační (λ_{exc}) i emitované (λ_{fl}) stejné, např. absorpce a reemise čáry niklu 232,0 nm. Rezonanční fluorescence vzniká i při přechodu mezi excitovanými stavy, tudíž rezonanční záření při fluorescenci nemusí vždy odpovídat absorpční rezonanční vlnové délce atomu.

V případě nerezonanční fluorescence při $\lambda_{exc} < \lambda_{fl}$ může dojít k několika možnostem: při přímé fluorescenci excitující i fluorescenční čára odpovídají elektronovému přechodu se společnou horní energetickou hladinou (např. čára Pb 405,8 nm excitovaná čarou olova 283,3 nm). K postupné fluorescenci dochází, jsou-li hladiny o vyšší energii pro excitační a fluorescenční čáru různé.

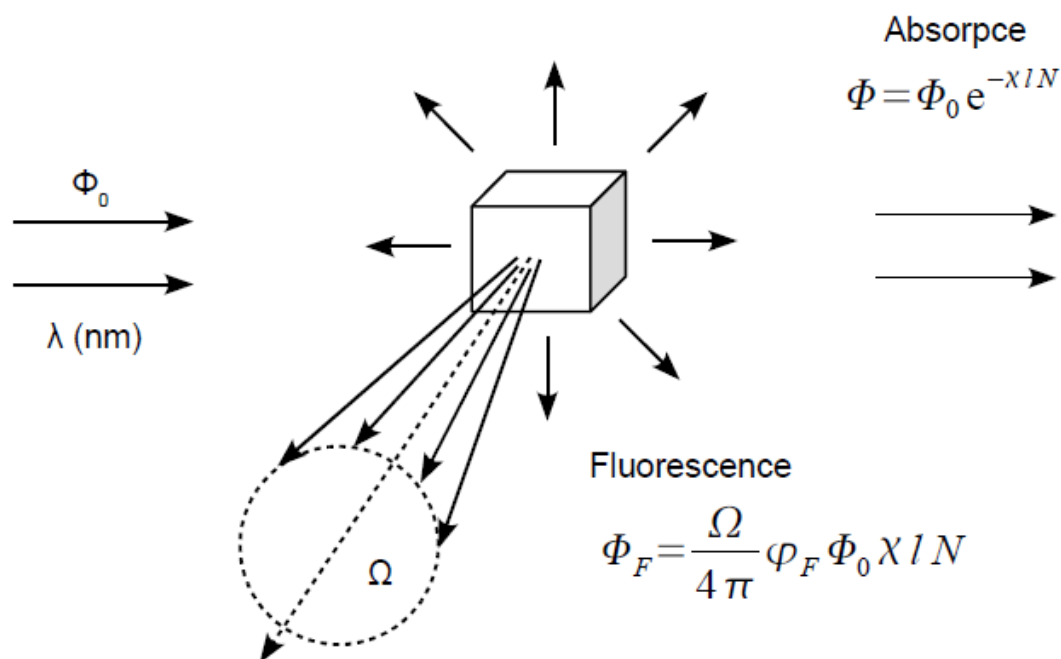
Při nerezonanční fluorescenci $\lambda_{exc} > \lambda_{fl}$ se jedná o anti-Stokesovskou fluorescenci, např. emise čáry india 410,2 nm excitovaná čarou india 451,1 nm.

Při excitaci atomové fluorescence laserem dochází k multifotonové fluorescenci, kdy probíhá absorpce dvou či více fotonů o celkové energii rovné rozdílu energie mezi elektronovými stavy absorpčního procesu, např. emise čáry kadmia 228,8 nm při excitaci zářením o $\lambda = 457,6 \text{ nm}$.

Zvolení vhodných čar pro fluorescenční spektrometrii je složitější než u atomové absorpční spektrometrie (AAS) a také závislé na používaném zdroji záření a dalších podmínkách měření [43], [44].

5.4.3 Základní vztahy

Atomová fluorescence se hodnotí na základě velikosti toku fluorescenčního záření Φ_F . Volné atomy sledovaného prvku v plynném stavu vystavené toku monochromatického záření Φ_0 (kde použitá λ odpovídá vlnové délce rezonančního přechodu) část záření absorbovaly a přešly do vzbuzeného stavu. Absorbovanou energii částečně ztrácejí neexcitačními srážkami s částicemi (tzv. zhášení fluorescence), částečně ji vyzáří zpětným přechodem do základního stavu rezonanční fluorescencí.



Obr. 8 Schematické znázornění atomové absorpce a fluorescence [43]

Z energetického hlediska je možné atomovou fluorescenci charakterizovat kvantovým výtěžkem fluorescence φ_F , tj. podílem, který je reemitován z celkového počtu absorbovaných fotonů, vyjádřeným jako poměr fluorescenčního toku Φ_F a absorbovaného toku záření Φ_0 . Jeho hodnota je za atmosférického tlaku vždy menší než 1, leží v rozmezí 10^{-3} až 10^{-4} . Vliv přítomnosti molekul plynů zapříčiňuje nezářivou deaktivaci a snížení její hodnoty (jako zhášeče fluorescence se mnohem účinněji projevují např. molekuly O_2 , CO , CO_2 , N_2 než např. atomy vzácných plynů).

Fluorescenční záření je vyzařováno všemi směry do prostorového úhlu 4π a měřený fluorescenční signál závisí na použitém prostorovém úhlu Ω (Obr. 8) [43].

Pro měřený fluorescenční tok Φ_F lze uvést zjednodušený vztah

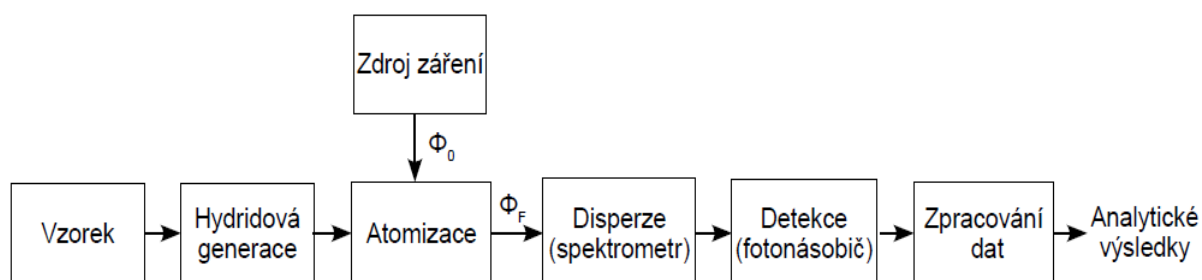
$$\Phi_F = \Omega/4\pi \cdot \varphi_F \cdot \Phi_0 \cdot \chi \cdot l \cdot N$$

kde φ_F je kvantový výtěžek fluorescence, χ je monochromatický absorpční koeficient pro uvažovaný (zpravidla rezonanční přechod), l je délka hrany fluoreskujícího elementu a N je úměrné koncentraci atomů analytu v základním stavu. Z tohoto plyne, že fluorescenční signál je pro oblasti malých koncentrací úměrný počtu atomů vzorku v základním stavu, zářivému toku primárního zdroje Φ_0 a výtěžku fluorescence φ_F . Roste-li hodnota Φ_0 , roste

i fluorescence, až dosáhne své limitní hodnoty (tzv. nasycená fluorescence); pak již není Φ_F funkcí Φ_0 a φ_F , ale jen koncentrace vzorku. Těchto velkých budících toků Φ_0 lze dosáhnout laditelnými lasery [43].

5.4.4 Schéma atomového fluorescenčního spektrometru

Jednoduché schéma atomového fluorescenčního spektrometru je znázorněno na Obr. 9. Přístroj pro sledování atomové fluorescenční spektrometrie se skládá ze čtyř základních částí: zdroje primárního záření (zdroj čar prvku, který je stanovován), prostředí, kde dochází k emisi záření plynnými atomy (ty byly předtím excitovány absorpcí elektromagnetického záření), monochromátoru pro izolaci fluorescenčního záření a detekčního systému [43].



Obr. 9 Schéma atomového fluorescenčního spektrometru ([43] částečně upraveno a doplněno)

5.4.5 Zdroje primárního záření

U atomové fluorescenční spektrometrie je selektivita dána použitým zdrojem primárního záření, kterým jsou excitovány pouze atomy stanovovaného prvku. Primární zdroj záření leží mimo optickou osu, obvykle kolmo na absorpční prostředí. Nevýhodou u AFS je tedy, že pro každý prvek vyžaduje vlastní excitační zdroj.

Primární záření, jež je atomy sledovaného prvku absorbováno, musí mít vysokou zářivou energii soustředěnou do úzkého spektrálního intervalu, dlouhodobě stabilní zářivý tok Φ_0 , pozadí musí být minimální a čáry nesmí být deformované samoabsorpcí.

Toto nejlépe splňují čárové zdroje realizované spektrálními výbojkami s parami kovů a zvláště výbojky s dutou katodou nebo vysokofrekvenční bezelektrodové výbojky. Jelikož je fluorescence málo účinný proces, musí dutokatodové výbojky produkovat vysokou intenzitu záření a tím se také snižuje jejich životnost.

Jako zdroje záření se tedy používají buď výbojky s dutou katodou, bezelektrodové výbojky nebo Superlamps. Klasické výbojky s dutou katodou ale poskytují málo intenzivní čáry, což snižuje dosahované detekční limity. Použití kontinuálních zdrojů není příliš obvyklé, protože vyzářená intenzita při diskrétní vlnové délce je nízká [44].

Použití spojitého spektra ve spojení s monochromátorem s vysokou rozlišovací schopností je též možné, avšak méně běžné (vysokotlaký xenonový výboj dosáhl uplatnění v AFS). U atomové fluorescenční spektrometrie se využívá i zářivá energie laserů, zvláště laditelných nebo nových typů laserových diod. Tyto lasery mají řadu předností, např. výrazné zvýšení citlivosti stanovení. Nevýhodou bývá vysoká cena [37], [42], [43].

Díky snadné korekci pozadí může být fluorescence běžně pozorována i v plazmatu a jsou vyráběny komerční ICP AFS (atomová fluorescenční spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) přístroje [37].

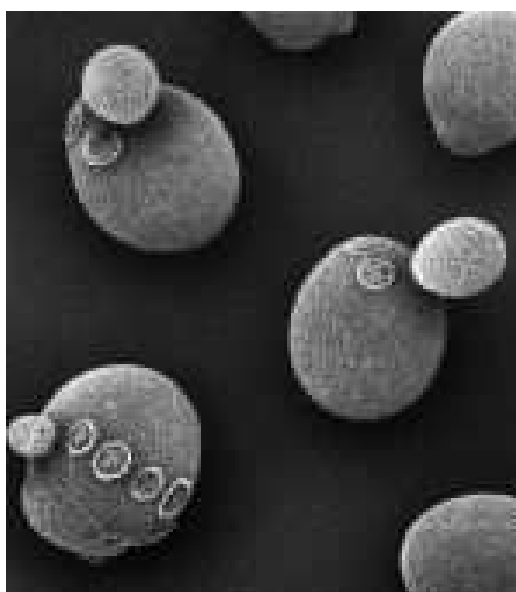
5.4.6 Detekce a registrace signálu

K detekci u AFS není třeba složitý optický systém. S přihlédnutím k malým hodnotám měřených zářivých toků se pro detekci využívá především fotonásobič. Výhodou fotonásobiče je vysoká citlivost a velmi nízká časová konstanta (10^{-8} - 10^{-9} s). Závislost výstupního proudu na intenzitě zářivého toku je lineární přes 5-6 řádů. Výsledný signál je registrován buď analogovým zařízením, nebo se převádí na digitální formu a dále se zpracovává matematicky [37], [42].

6 KVASINKY SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Rod *Saccharomyces* patří do třídy Ascomycetes (Endomycetes), rozmnožuje se vegetativně multilaterálním dělením tedy pučením. Jejich buněčný cyklus je podobný cyklu zvířat a rostlin. Druh *Saccharomyces cerevisiae* (zobrazen na Obr. 10) má elipsoidní až kulovité buňky o délce 3,7 – 9,7 μm . Vytváří stromečkovité, bohatě větvené pseudomycelium. *S. cerevisiae* je nejvíce známým a užívaným druhem kvasinek v pivovarnictví a pekařství. Řadí se mezi modelové organizmy. Její výhodou je lehká kultivace a podobnost buněčné struktury s rostlinami a živočichy.

Kvasinky *S. cerevisiae* obsahují velké množství proteinů, a tedy i množství potenciálních míst pro nahrazení síry za selen. Mohou přijímat přibližně 3000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ selenu a velmi dobře se přizpůsobují různým prostředím [45], [46].



Obr. 10 Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

6.1 Selenem obohacené kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

V poslední době došlo k významnému vývoji selenem obohacených potravních doplňků, které jsou alternativou ke zvýšení potravního příjmu biodostupných organických sloučenin selenu. Některé z těchto doplňků obsahují anorganické soli selenu, hlavně selenan sodný. Nicméně, ostatní selenem obohacené doplňky jsou připraveny na základě selenem obohacených kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Jejich výroba je snadná a levná. Do média je přidávána anorganická ve vodě rozpustná sůl (seleničitan sodný) a poté je selen při fermentaci inkorporován do proteinů kvasinek. Vznikají různé organické sloučeniny selenu, z kterých převládá forma selenomethioninu [45], [46].

V závislosti na kultivačních podmínkách mohou kvasinky akumulovat velké množství selenu (až 3000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Kvasinky jsou částečně schopny absorbovanou anorganickou formu selenu dále metabolicky přeměnit na organickou formu selenu (selenomethionin), který je hlavní selenoaminokyselinou nacházející se v matrici kvasinek.

V závislosti na druhu kvasinky je absorpce selenu ze selenizovaných kvasinek lidským organismem v intervalu 50 – 90 %, z příjmu potravin 80 %.

Produkce selenizovaných kvasinek je částečně ekonomická a dosažitelná přidávkou anorganického selenu, obvykle seleničitanu sodného nebo selenanu sodného do kultivačního média. Kvasinka je proteinově bohatá matrice, ve které je selen začleněn hlavně jako selenomethionin. Selenizované kvasinky jsou nejlépe popsány selenem obohaceným produktem. Avšak identifikace a kvantifikace selenových specií je stále objektem zkoumání [2], [46], [47].

6.2 Kultivace kvasinek ve fermentoru

Kultivace v různě upravených kultivačních zařízeních jako jsou například fermentory navazují na kultivace ve zkumavkách a baňkách. Tato zařízení mívají zpravidla několikanásobně větší objem než kultivační baňky, aby byl k dispozici dostatek materiálu k analýzám a také aby se odběrem vzorků nepozměnil objem kultury, a tím i podmínky míchání a vzdušnění. Za optimální laboratorní rozměr pro kvasinkovité organismy se považuje pracovní objem v rozmezí 3 až 5 l. Laboratorní fermentor poskytuje hodnotné výsledky získané z nevelkého objemu kultury za nízkých provozních nákladů a je cenově dostupným, tudíž se stává hospodárným zařízením základních laboratoří a efektivním mezistupněm v procesu převádění výsledků výzkumu do výrobního měřítká.

Fermentor se obvykle skládá ze dvou částí: zvláštního fermentoru a z přístrojové části ovládající provoz fermentoru. Laboratorní fermentor sestává ze skleněného válce, který je uzavřen horním a spodním víkem. Bývá většinou snadno rozebíratelný, dá se snadno čistit a sestavovat [48]. Laboratorní fermentor je zobrazen na Obr. 11.



Obr. 11 Laboratorní fermentor BIOSTAT B [49]

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité přístroje a chemikálie

7.1.1 Použité přístroje

Kapalinový chromatogram

- a) izokratické čerpadlo Gynkotec P580 (Gynkotec, Germering, Německo)
- b) dávkovací analytický ventil smyčkový, typ D (Enom, Praha, ČR)
- c) mikrostříkačky Hamilton 100 μ l (Hamilton, Reno, USA)
- d) předkolona Hamilton PRP-X100 (Hamilton, Reno, USA)
- e) kolona Hamilton PRP-X100 (250 x 4,1 mm, 10 μ m) (Hamilton, Reno, USA)
- f) software, CSW verze 1.7. (Data Apex s r.o., Praha, ČR)

Atomový fluorescenční spektrometr

- a) UV cela PSA 10.570 (PS Analytical, Orpington, Velká Británie)
- b) zařízení pro ohřev (Chromspec, Praha, ČR)
- c) atomový fluorescenční spektrometr Millenium Excalibur (PS Analytical, Orpington, Velká Británie)
- d) super výbojka pro Se (Photron, Pty. Ltd., Victoria, Austrálie)
- e) software SAMS, verze 1.08 (PS Analytical, Orpington, Velká Británie)

Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem

- a) hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem X Series ICP-MS (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)
- b) automatický dávkovač Cetac ASX-520 (Cetac technologies, Omaha, USA)
- c) chladič komora Power pack - spray chamber cooling (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)
- d) chladič jednotka Neslab Merlin M-100 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA)

Ostatní použité přístroje a zařízení

- a) digitální laboratorní váhy Kern 442-43 (Sysmatec, Eyholz, Švýcarsko)
- b) analytické laboratorní digitální váhy AND HA-202M (A&D Company, Tokio, Japonsko)
- c) jednotka pro přípravu ultračisté vody Purelab Classic UV (Elga, Marlow, Velká Británie)
- d) ultrazvuková lázeň Powersonic PSO 3000 A (Ultrashalltechnik AG, Straubehardt, Německo)
- e) pH metr Knick (Knick Portamess, Heidelberg, Německo)
- f) magnetické míchadlo (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- g) fermentor BIOSTAT B (Pegasus Scientific Inc., Rockville, USA)

- h) odstředivka EBA20 (Hettich Zentrifugen, Německo)
- i) sušička Memmert (Labtronic, Port Elizabeth, Jižní Afrika)
- j) vortex Genie 2 (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA)
- k) centrifuga Eppendorf Centrifuge 5417 R (Elisabeth Pharmacon, spol. s r.o., Brno, ČR)
- l) třepačka Heidolph Unimax 1010 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Swabach, Německo)
- m) mikropipety 100 – 1000 µl LABMATE+ (HT high tech lab, Varšava, Polsko)

7.1.2 Použité chemikálie

Standardní látky

- a) seleničitan sodný, 99,999 % (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- b) selenan sodný dekahydrát, 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- c) L-(+)-selenomethionin, 99,62 % (Calbiochem, Kanada)
- d) Seleno-DL-methionin, 99 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- e) Se-(methyl)-seleno-L-cystein, 98 % (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- f) Seleno-L-cystin, 98,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- g) standardní roztok selenu, 1000 mg.l⁻¹, 99,999 % (Merck, Darmstadt, Německo)

Enzym

- Proteáza XIV z *Streptomyces griseus* (5,6 jednotek/mg), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

Ostatní použité chemikálie

- a) dihydrogenfosforečnan amonný, 99,0 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- b) kyselina chlorovodíková, p.a.+ (Analytika, Praha, ČR)
- c) hydroxid sodný, p.a. (Analytika, Praha, ČR)
- d) tetrahydroboritan sodný, 98+% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- e) kyselina dusičná, p.a.+ (Analytika, Praha, ČR)
- f) peroxid vodíku, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- g) pufr pro kalibraci pH metru (Hamilton, Reno, USA)
- h) argon – čistota 4,6 (Siad Czech spol s r.o., Praha, ČR)
- i) methanol, 99,0 % (Fluka, Seelze, Německo)
- j) fosfátový pufr (Lachema, Brno, ČR)
- k) vodík/helium (Siad Czech spol s r.o., Praha, ČR)

Kvasinky

- Droždí FALA s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae Hansen* (ACCOM Slovakia, s r.o., Slovensko)

Chemikálie na kultivační médium

- a) Síran amonný čistý (Lachema s.p., Brno, ČR)
- b) Glukóza (Lachema, Brno, ČR)
- c) Dihydrogenfosforečnan draselný čistý (Lachema s.p., Brno, ČR)
- d) Hydrogenfosforečnan draselný bezvodý p.a. (Lachema, a.s., Neratovice, ČR)
- e) Chlorid sodný (Lachema, a.s., Neratovice, ČR)
- f) Dihydrát chloridu vápenatého (Lachema n.p., Brno, ČR)
- g) Síran hořečnatý p.a. (Lachema n.p., Brno, ČR)

7.2 Analýza celkového množství selenu pomocí metody ICP-MS

7.2.1 Instrumentace

Celkové množství selenu v extrahovaných částech vzorků bylo stanoveno metodou ICP-MS. Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem byl od firmy Thermo Electron Corporation, typu X Series. Pro transport vzorku do plazmatu bylo použito autosampleru Cetac ASX-520, zabudovaného peristaltického čerpadla, zmlžovače typu Mainhard a kuželové mlžné komory s impaktorem. Vzorkovací kónus spektrometru byl niklový. Hmotnostní spektrometr byl kalibrován v koncentračním rozsahu 0-200 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Sledovaným izotopem byl ^{82}Se .

7.2.2 Příprava vzorků

Pro stanovení celkového selenu byly vzorky připraveny podle extrakce schematicky znázorněné na obrázcích 13A a 13B. Mineralizace byla prováděna směsí 5 ml 65% HNO_3 s 2 ml 30% H_2O_2 při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Stanovení celkového selenu bylo provedeno pouze u kultivačního média.

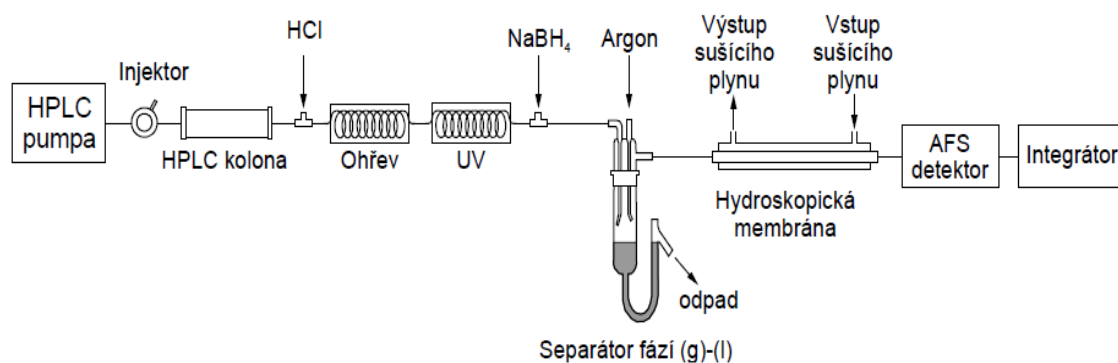
7.3 Analýza specií selenu spojenými metodami HPLC-HG-AFS

7.3.1 Schéma pro speciaci selenu

Roztok, který obsahoval specie selenu byl dávkován do analytického dávkovacího kohoutu o objemu 50 μl . Tento kohout byl připojen k HPLC pumpě. Poté byl vzorek injektován a unášen proudem mobilní fáze do předkolony a analytické kolony, kde byly jednotlivé specie separovány. V okamžiku injektování vzorku byla v programu SAMS spuštěna analýza.

Výstup z kolony byl připojen k postkolonovému reakčnímu bloku, do něhož byl kontinuálně přiváděn roztok kyseliny chlorovodíkové za pomoci peristaltické pumpy. V tomto reakčním bloku docházelo ke směšování eluentu z kolony s roztokem kyseliny chlorovodíkové. Roztok, který vystupoval z reakčního bloku, byl veden přes zahřívací zařízení a UV celu. Výstup z UV cely byl propojen do další části reakčního bloku, kde byl kontinuálně směšován s roztokem tetrahydridoboritanu sodného zaváděného pomocí peristaltické pumpy. V této fázi dochází k reakci selenu s tetrahydridoboritanem a tvoří se kovalentní hydridy. Proud pokračoval do separátoru plynné a kapalné fáze, kde byly těkavé

hydridy separovány z roztoku a unášeny proudem argonu skrz sušící membránu do detektoru. Hydridy byly atomizovány ve vodíkovém plameni a po jejich excitaci byl měřen fluorescenční signál pomocí super výbojky pro selen ($\lambda = 196,0$ nm). Uspořádání jednotlivých částí techniky HPLC-HG-AFS je schematicky znázorněno na Obr. 12.



Obr. 12 Schéma zapojení pro stanovení forem selenu [50]

V tabulce 2 je přehledně popsáno souhrnné nastavení jednotlivých částí spojených metod HPLC-HG-AFS, které bylo použito pro speciální analýzu selenu v extrahovaných vzorcích z kvasinek.

Tab. 2 Experimentální podmínky pro speciální analýzu selenu

Jednotlivé části	Podmínky	
HPLC	Kolona	Hamilton PRP-X100, (250 x 4,1 mm, 10 mm)
	Složení mobilní fáze	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 40 mmol.l^{-1} , pH 6,4, 1 ml.min^{-1}
Ohřev	Teplota v ohřívací cele	180 °C
Generace hydridů	HCl	10 mol.l^{-1} , 3 ml.min^{-1}
	NaBH ₄	0,7 % v 0,1M NaOH, 3 ml.min^{-1}
AFS	Vlnová délka pro Se	196,0 nm
	Primární proud	20,0 mA
	Sekundární proud	25,0 mA

7.3.2 Podmínky HPLC a jejich optimalizace

HPLC kolona

Separace specií selenu je možná na koloně Hamilton PRP-X100. Tato kolona je silným anexem s náplní založenou na sférických 10 μm částicích polystyrendivynylbenzenu s vysoce

bazickými kvarterními amoniiovými skupinami na výměnných místech. Díky vysoce inertnímu polymernímu nosiči odolává náplň kolony působení agresivních organických rozpouštědel a vodných pufrů (0-100 % vodných nebo organických) a pH v rozsahu 1-13. Při poklesu výkonu kolony (ztráta symetrie píků a jejich rozšiřování) lze kolonu regenerovat do původního stavu. Regenerace kolony se provádí roztokem 60 mmol.l⁻¹ HNO₃ v metanolu při průtoku 0,5 ml.min⁻¹ po dobu dvou hodin.

Kolona byla skladována v mobilní fázi, jestliže byl interval mezi měřeními 1 až 3 dny. Při delším intervalu mezi měřeními byla kolona skladována v roztoku voda-methanol v poměru 4:1, aby se zabránilo mikrobiálnímu růstu.

Mezi analytickou kolonu a dávkovací kohout byla umístěna ochranná předkolona Hamilton PRP-X100, mající stejnou náplň jako analytická kolona. Tato předkolona chránila analytickou kolonu před možným vnesením nečistot nebo pevných částic.

Na přípravu mobilní fáze byla použita ultračistá voda o čistotě 18,2 MΩ.cm. Chemikálie na přípravu mobilní fáze byly svou čistotou určeny pro HPLC. Mobilní fáze byla vždy před použitím odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Před měřením byla kolona vždy ekvilibrována mobilní fází po dobu 30 minut.

Mobilní fáze

Hodnota pH mobilní fáze musí být optimalizována, neboť na pH mobilní fáze závisí retenční časy specií. V této práci byla testována mobilní fáze s pH od 6,0 do 6,8. Při optimalizaci bylo dbáno na to, aby píky jednotlivých specií byly od sebe dostatečně odděleny, což je důležité pro kvantitativní vyhodnocení chromatogramu.

Pro speciaci selenu byl jako mobilní fáze použit dihydrogenfosforečnan amonný o koncentraci 40 mmol.l⁻¹. K přípravě byla použita ultračistá voda o čistotě 18 MΩ.cm, která byla upravena na jednotce Purelab Classic UV. Před každým měřením byla mobilní fáze odplyňována po dobu 15 minut a upravenou mobilní fází byla 30 minut promývána kolona. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹.

7.3.3 Podmínky HG-AFS a jejich optimalizace

Atomový fluorescenční spektrometr byl nastaven podle manuálu pro měření specií Se a podmínky stanovení nebyly dále optimalizovány. Nastavení spektrometru je uvedeno v Tab. 3, podmínky během analýzy zůstávaly stejné.

Tab. 3 Nastavení atomového fluorescenčního spektrometru pro analýzu selenu

Prvek	Se
Vlnová délka	196,0 nm
Primární proud	20,0 mA
Sekundární proud	25,0 mA
Průtok nosného plynu (Ar)	250 ml.min ⁻¹
Průtok sušícího plynu (Ar)	2,5 l.min ⁻¹

7.4 Příprava standardních roztoků pro speciální analýzu selenu

Jako standardní sloučeniny selenu byly použity následující látky seleničitan sodný, selenan sodný dekahydrát, L-(+)-selenomethionin, Se-methyl-seleno-L-cystein, seleno-L-cystin a seleno-DL-methionin.

Na přípravu všech standardních roztoků byla použita ultračistá voda o čistotě 18,2 M Ω .cm. Zásobní roztoky standardů o koncentraci 100 mg.l⁻¹ byly připraveny do plastových odměrných baněk a uchovávány při teplotě 4 °C v temnu. Ze zásobních roztoků byly poté připravovány zředěné roztoky.

Pro přehlednost jsou jednotlivé sloučeniny v dalším textu označeny následujícími zkratkami: Se (IV) – seleničitan, Se (VI) – selenan, SeMetCys – Se-(methyl)-seleno-L-cystein, SeLCys – Seleno-L-cystin, SeLMet – L-selenomethionin, SeDLMet – Seleno-DL-methionin.

7.5 Vzorky pro speciální analýzu selenu

Speciální analýza selenu byla provedena v kultivovaných kvasinkách (*Saccharomyces cerevisiae*), obohacených anorganickou formou selenu. Jako zdroj kvasinek bylo použito čerstvé pekařské droždí FALA.

Vzorky kvasinek obohacených anorganickými formami selenu byly po kultivaci zamrazeny na -24 °C. Vzorky kvasinek byly poté při 105 °C usušeny do konstantní hmotnosti. Z každého vzorku byly prováděny tři paralelní stanovení. Usušené vzorky byly naváženy do čistých, suchých eppendorfových baněk. Navážka každého vzorku byla 1000±10 mg. Do každé baňky bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru (pH 7,5) a skleněné kuličky, sloužící k dezintegraci buněk. Rozbití buněk bylo provedeno na vortexu 3-krát 20 minut. Poté byly vzorky odstředěny.

V získaném supernatantu byly změřeny specie selenu (navázané uvnitř buněk a v cytoplazmě), k odstředěnému sedimentu bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru a 40 mg enzymu (Proteáza XIV). Vzorky, obsahující enzym Proteáza XIV byly ponechány na třepačce po dobu 24 hodin při 37 °C. Po skončení extrakce byly vzorky odstředěny při 3000 rpm po dobu 15 minut.

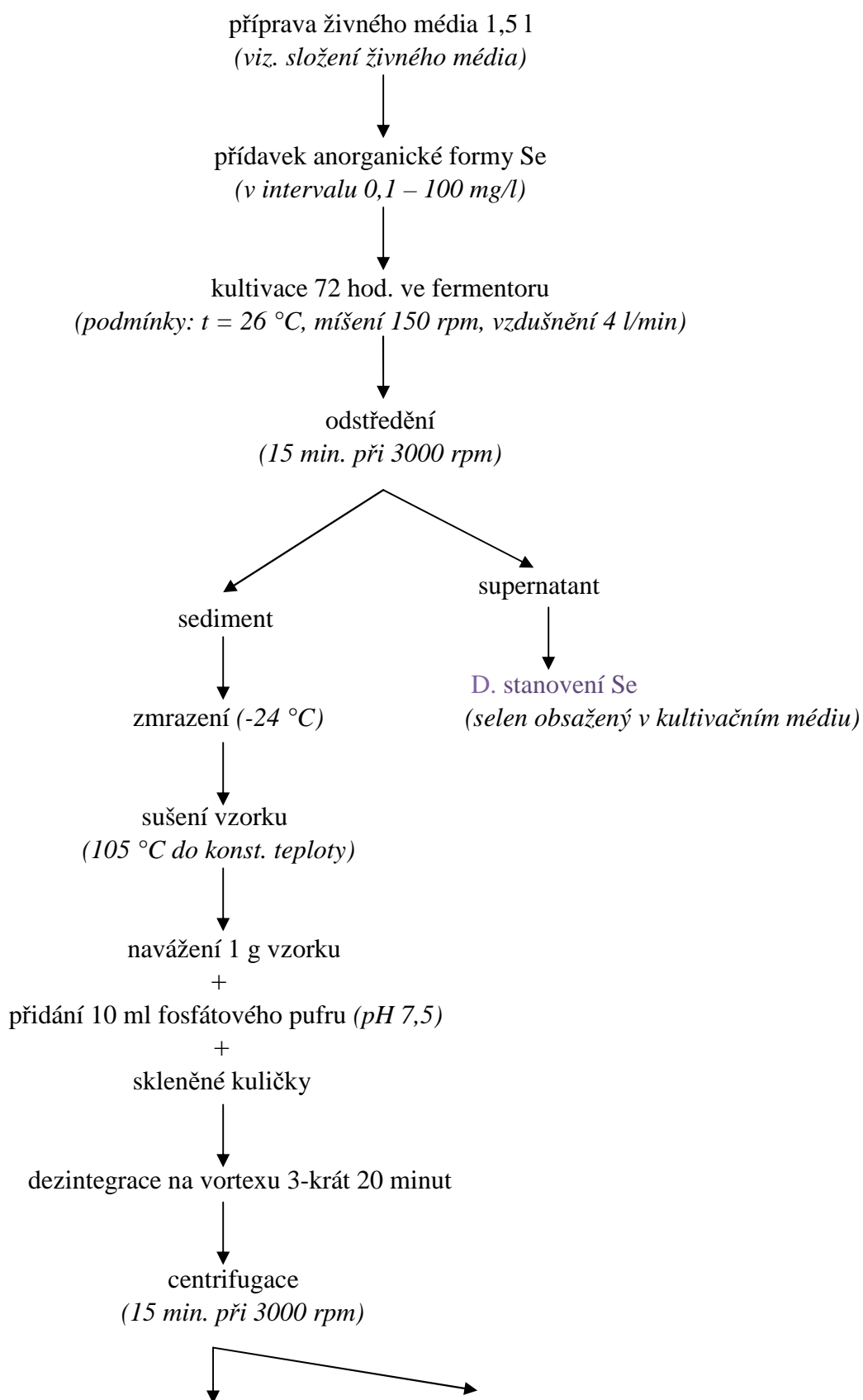
Odstředěný sediment byl zmineralizován a byly změřeny specie selenu (navázané na buněčné membrány). Získaný supernatant byl dekantován a přefiltrován přes 0,45 mm filtr. V supernatantu byly změřeny specie selenu (navázané na bílkovinné struktury).

Na obrázcích 13A a 13B je schematicky znázorněn celý postup přípravy a extrakce jednotlivých vzorků.

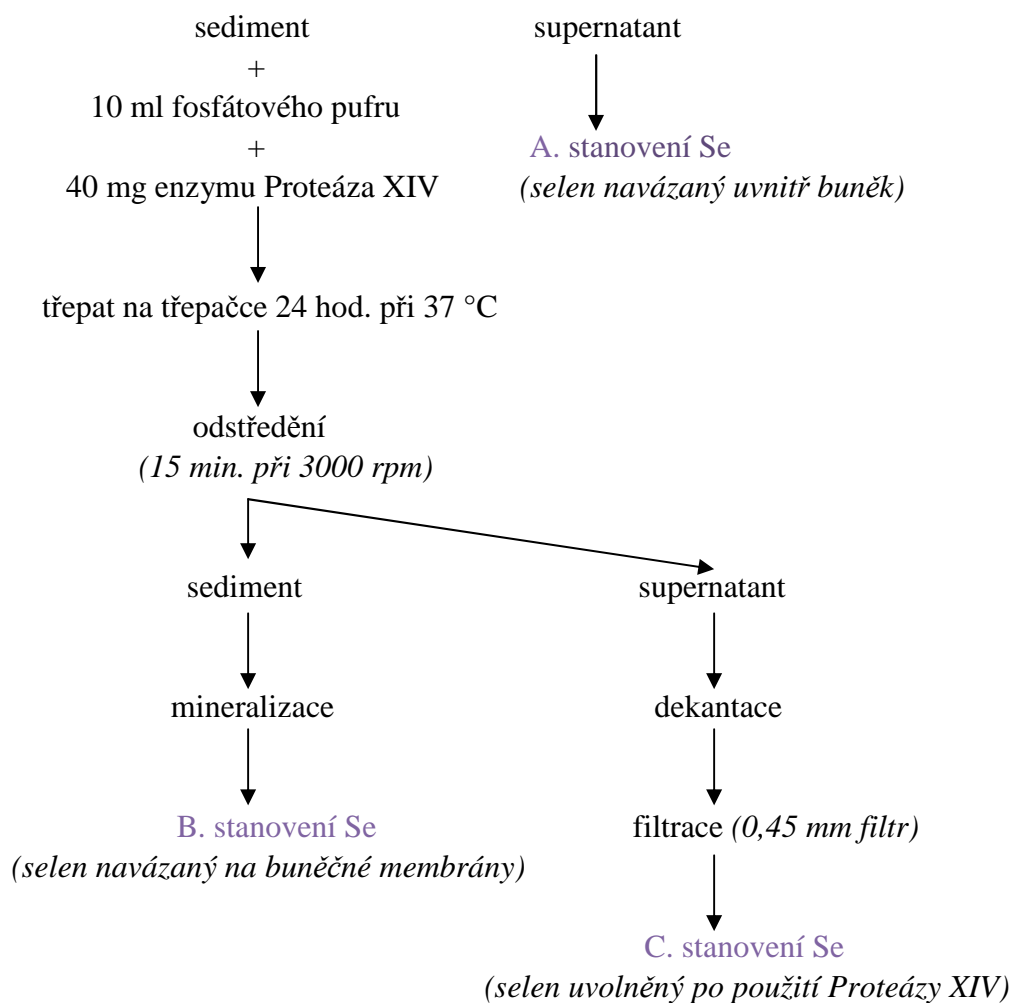
Složení živného média

Živné médium mělo následující složení [g/l]: (NH₄)₂SO₄ 10,0; glukóza 20,0; KH₂PO₄ 1,0; K₂HPO₄ 0,2; NaCl 0,1; CaCl₂.2H₂O 0,3; MgSO₄ 0,5; kvasničný autolyzát 4,0.

Kultivace probíhala ve fermentoru BIOSTAT B 72 hodin. Teplota kultivace byla 26 °C, míchání 150 rpm a vzdušnění 4 l.min⁻¹.



Obr. 13A Schematické znázornění postupu přípravy kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* obohacených selenem a extrakce jednotlivých vzorků



Obr. 13B Schematické znázornění postupu přípravy kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* obohacených selenem a extrakce jednotlivých vzorků

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Výsledky optimalizace pH mobilní fáze pro HPLC

V Tab. 4 jsou přehledně uvedeny výsledky závislosti retenčních časů na pH mobilní fáze pro jednotlivé sloučeniny selenu. Výsledky byly naměřeny pro koncentrace směsi selenu 500 ng.ml⁻¹ pro každou specii. Podmínky měření byly následující: 0,7% NaBH₄ v 0,1 mol.l⁻¹ NaOH (průtok 3 ml.min⁻¹), 10 mol.l⁻¹ HCl (průtok 3 ml.min⁻¹). Koncentrace mobilní fáze byla 40 mmol.l⁻¹ a průtok byl 1 ml.min⁻¹. Rozsah měřených pH mobilní fáze byl 6,0; 6,2; 6,4; 6,6 a 6,8.

Tab. 4 Závislost retenčních časů na pH mobilní fáze pro specie selenu

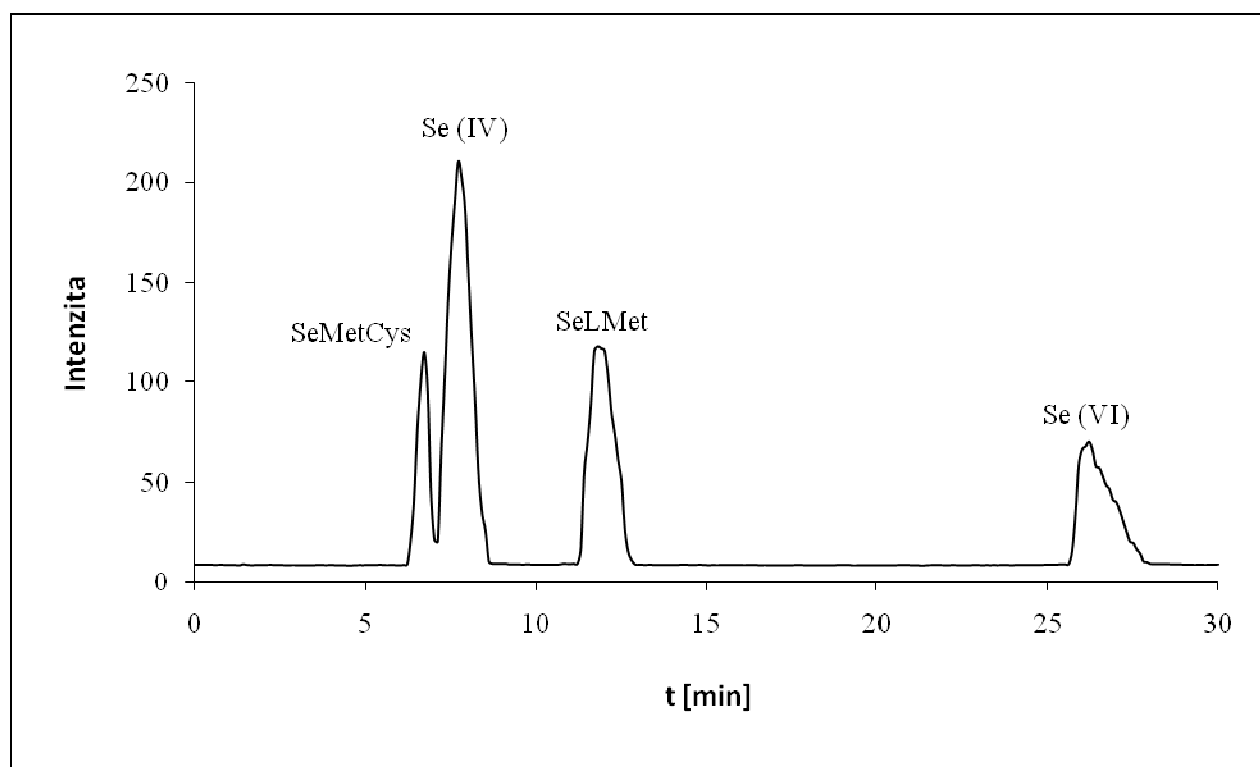
Specie	Retenční časy [min]				
	pH 6,0	pH 6,2	pH 6,4	pH 6,6	pH 6,8
Se ^{IV}	7,8	7,6	6,7	6,6	6,2
Se ^{VI}	41,5	33,8	27,5	19,6	17,3
SeLMet	10,1	10,2	10,6	13,9	15,2
SeDLMet	10,5	11,8	12,5	13,8	15,1
SeMetCys	5,8	5,9	6,0	6,6	7,4
SeLCys	5,2	5,6	5,8	6,1	6,2

Z výše uvedené tabulky je zřejmé, že se retenční časy pro jednotlivé organické formy selenu s rostoucím pH zvyšují, avšak u anorganických forem selenu je tomu naopak. U selenanu je pokles retenčních časů nejvýraznější, při pH 6,0 je jeho retenční čas až 41,5 minuty. Jelikož program SAMS, sloužící k ovládní AFS spektrometru disponuje nejdelší nastavitelnou analýzou jen na 30 minut, bylo nutné vytvořit takové podmínky, aby se retenční časy selenanu pohybovaly pod touto hranicí.

Při pH 6,0 koeluoval L-selenomethionin s DL-selenomethioninem a také retenční čas selenanu byl za hranicí 30 minut. Při pH 6,2 nebylo možné dosáhnout retenčního času selenanu pod 30 minut.

Při pH 6,6 docházelo ke koeluci seleničitanu se Se-methyl-seleno-L-cysteinem a při pH 6,8 koeluoval seleničitan se seleno-L-cystinem. Jako nejvhodnější bylo vybráno pH 6,4, při kterém došlo k rozdělení jednotlivých specií selenu v čase pod 30 minut a získaný chromatogram byl dobře vyhodnotitelný.

Byl změřen standardní roztok specií selenu o koncentraci 500 ng.ml⁻¹ při zjištěném neoptimálnějším pH mobilní fáze. V roztoku specií byly použity následující sloučeniny selenu: Se^{IV}, Se^{VI}, SeMetCys a SeLMet. Chromatogram s jednotlivými píky standardního roztoku specií selenu je uveden v grafu 1.



Graf 1 Chromatogram směsi standardních roztoků specií selenu o koncentraci 500 ng.ml^{-1}

8.2 Výsledky optimalizace podmínek pro ICP MS

Parametry přístroje ICP MS byly nastaveny takovým způsobem, aby byla získána nejvyšší odezva signálu při co nejmenším poměru Ce/CeO. Na vyladění přístroje ICP MS byl použit ladící roztok, o koncentraci $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ Se a Ce. Optimalizované podmínky jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab.5 Experimentální podmínky pro stanovení celkového selenu metodou ICP MS

	Podmínky
Příkon do ICP	1302 W
Průtok plazmového plynu (Ar)	$13,0 \text{ l.min}^{-1}$
Průtok pomocného plynu (Ar)	$0,7 \text{ l.min}^{-1}$
Hloubka vzorkování	150,0 mm
Poloha hlavice v ose x	18,0 mm
Poloha hlavice v ose y	411,0 mm
Rychlost nasávání vzorku	$0,88 \text{ ml.min}^{-1}$
Typ zamlžovače	Mainhard
Teplota mlžné komory	$4,0^{\circ}\text{C}$
Extrakce	-125,5 V
Extrakční čočky 1	-1200 V
Extrakční čočky 2	-83,9 V
Extrakční čočky 3	-200 V
Čočky D1	-40,8 V
Čočky D2	-139,6 V
Focus	11,9 V
Pole Bias	-3 V
Napětí na detektoru	1098 V
Integrační doba	0,2 s
Klidová doba	15 s
Materiál vzorkovacích kónů	Ni
Monitorovaný izotop	^{82}Se
Poměr Ce/CeO	< 3%

8.3 Výsledky kultivace kvasinek

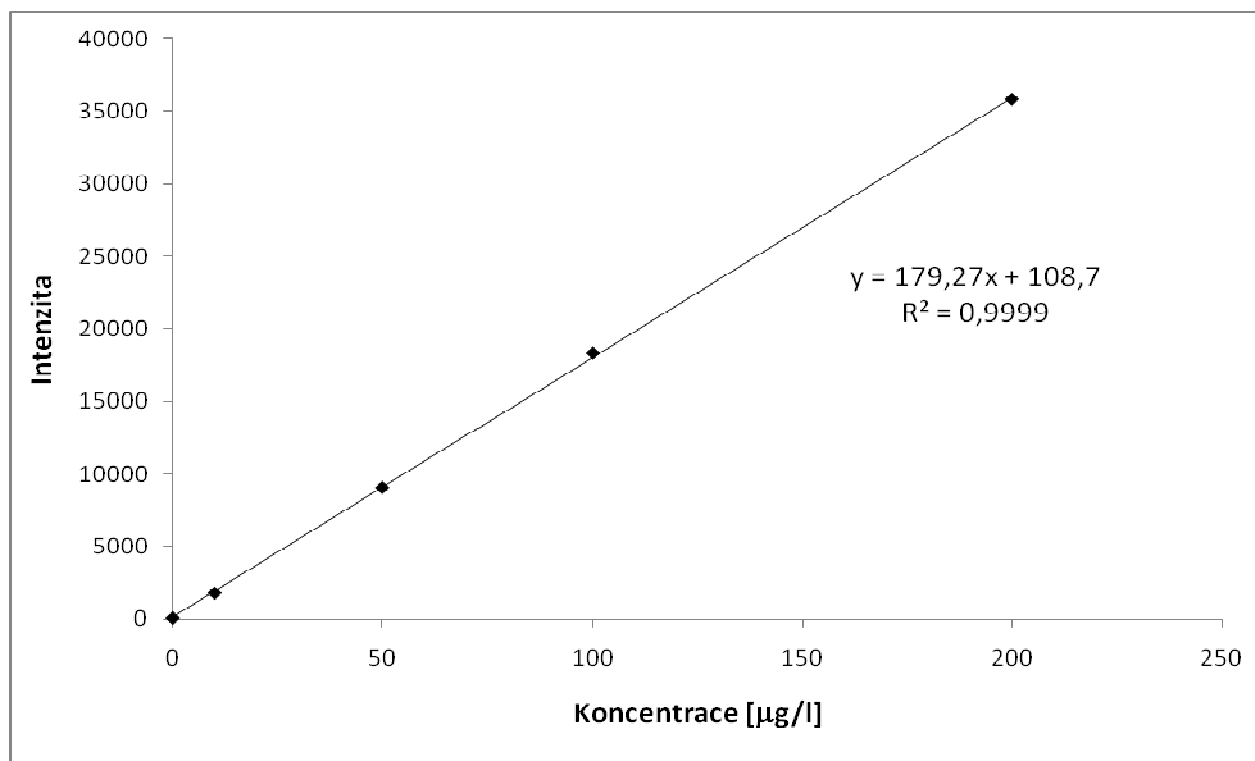
Kultivační médium bylo připraveno z příslušných chemikálií (viz. *Složení kultivačního média*) do 1,5 l sterilní vody. Do takto připraveného média bylo vloženo pekařské droždí s kulturou *Saccharomyces cerevisiae*. Takto byla připravena čtyři kultivační média. Do každého kultivačního média byla přidána různá koncentrace anorganické formy selenu (seleničitan sodný), a to v rozmezí 0,1 mg.l⁻¹, 1,0 mg.l⁻¹, 10 mg.l⁻¹ a 100 mg.l⁻¹.

Každá kultivace probíhala ve fermentoru po dobu 72 hodin. Podmínky ve fermentoru byly následující: t = 26 °C, míšení 150 rpm a vzdušnění 4 l.min⁻¹. Po kultivaci byly kvasinky s kultivačním médiem odstředěny při 3000 rpm po dobu 15 minut. V odstředěném kultivačním médiu (supernatant) bylo změřeno celkové množství selenu pomocí metody ICP MS.

Odstředěné kvasinky (sediment) byly zmrazeny na -24 °C. Poté byly kvasinky dále zpracovávány a spojením metod HPLC a HG-AFS byly změřeny specie selenu v jednotlivých částech extrahovaných kvasinek.

8.3.1 Stanovení celkového množství selenu v kultivačním médiu

Celková koncentrace selenu v kultivačním médiu po odstředění nakultivovaných kvasinek byla určena z kalibrační křivky po změření metodou ICP-MS. Hmotnostní spektrometr byl kalibrován v rozsahu 0-200 µg.l⁻¹. Kalibrační závislost znázorňuje graf 2. Hodnoty, z nichž byla sestrojena kalibrační závislost jsou uvedeny v tabulce v příloze 1.



Graf 2 Kalibrační závislost pro stanovení celkového množství selenu metodou ICP MS

Výsledky analýz kultivačního média jsou uvedeny v tabulce 6. Změřená kultivační média obsahovala 0,05, 0,27, 5,53 a 44,68 mg/l selenu.

Do kultivačního média s pekařskými kvasinkami byly přidávány 4 různé koncentrace seleničitanu, a to v rozmezí 0,1; 1,0, 10,0 a 100,0 mg.l⁻¹.

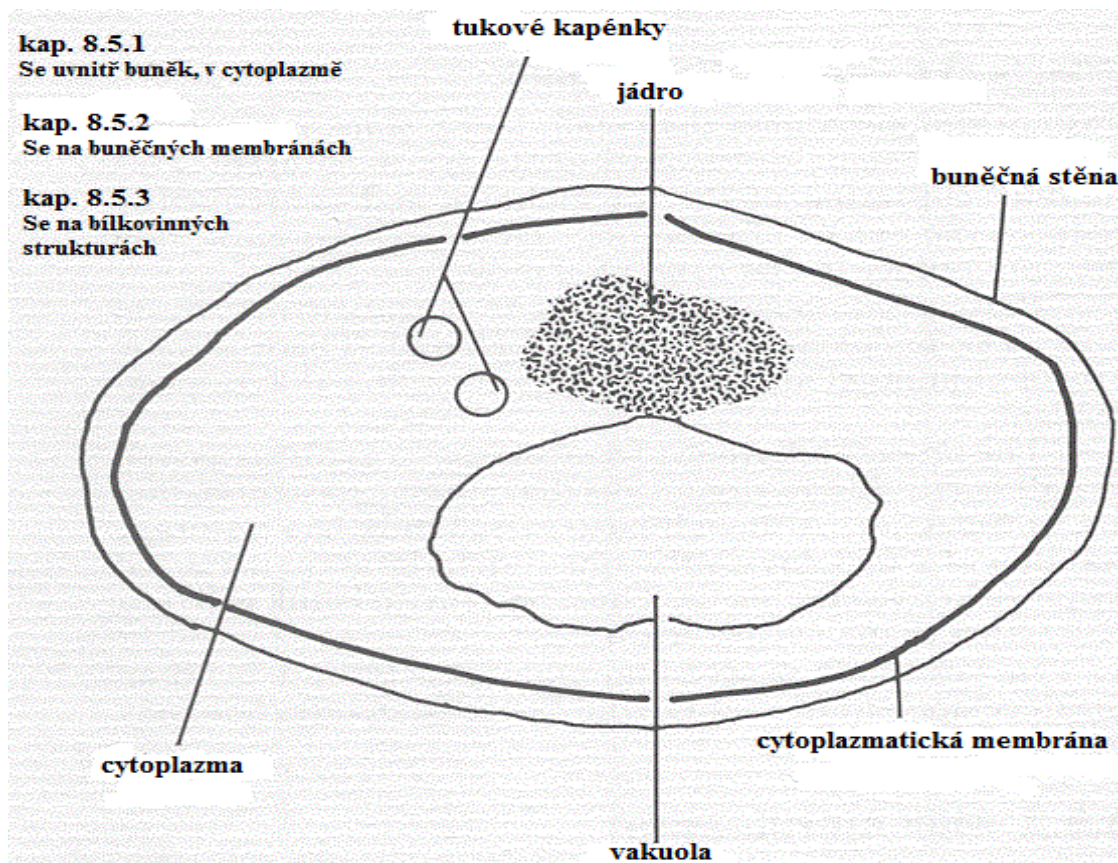
Podle změřených hodnot uvedených v tabulce 6 je zřejmé, že sorpce anorganické formy selenu do kvasinek se pohybuje okolo 50 % u všech vkládaných koncentrací anorganické formy selenu do kultivačních médií. Z naměřených hodnot vyplývá, že sorpce selenu do kvasinek není přímo závislá na výši vkládané koncentrace selenu do kultivačního média.

Tab. 6 Výsledky analýzy celkového množství selenu v kultivačním médiu (*s* – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka)

	Vzorky supernatantu	Koncentrace Se	<i>s</i>	RSD	Koncentrace Se přidaná ke kvasinkám
		[mg/l]	[mg/l]	[%]	[mg/l]
1.	Se ^{IV} + <i>S. cerevisiae</i>	0,05	0,002	3,36	0,1
2.	Se ^{IV} + <i>S. cerevisiae</i>	0,27	0,004	1,60	1
3.	Se ^{IV} + <i>S. cerevisiae</i>	5,53	0,114	2,06	10
4.	Se ^{IV} + <i>S. cerevisiae</i>	44,68	0,478	1,07	100

8.4 Stanovení specií selenu v různých částech kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

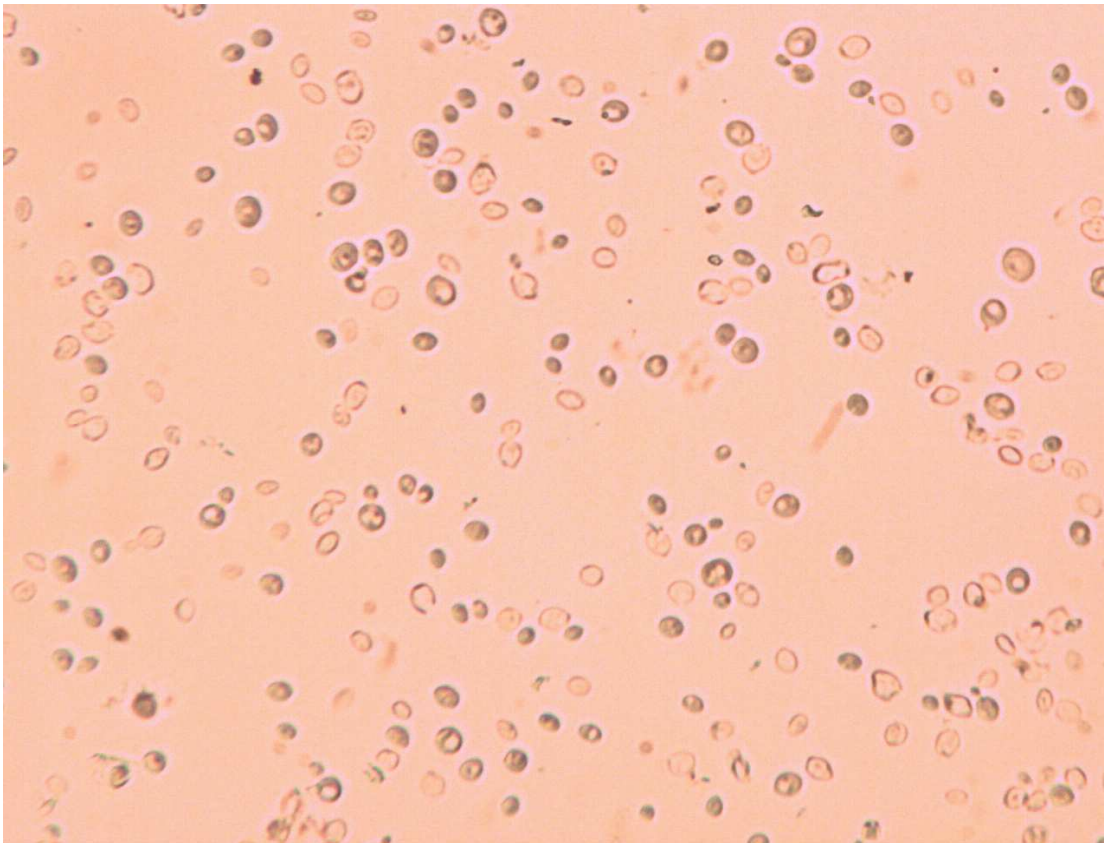
Na obr. 14 je uvedena struktura kvasinky a popsány jednotlivé části, ve kterých byly stanoveny specie selenu.



Obr. 14 Struktura kvasinky a jednotlivé části, ve kterých byly stanoveny specie selenu ([52] částečně doplněno a upraveno)

Podle přehledného postupu uvedeného na obrázcích 13A a 13B byly připraveny jednotlivé vzorky z nakultivovaných kvasinek.

Vzorky z kvasinek obohacených anorganickou formou selenu byly po zmrazení usušeny při 105 °C do konstantní teploty v sušárně. Z každého usušeného vzorku s rozdílnou koncentrací selenu, která byla vložena do kultivačního média, bylo naváženo množství 1000±10 mg a následně smícháno s 10 ml fosfátového pufru a skleněnými kuličkami. Takto připravená směs byla dezintegrována na vortexu 3-krát 20 minut. Dezintegrované buňky kvasinek jsou zobrazeny na obr. 15.

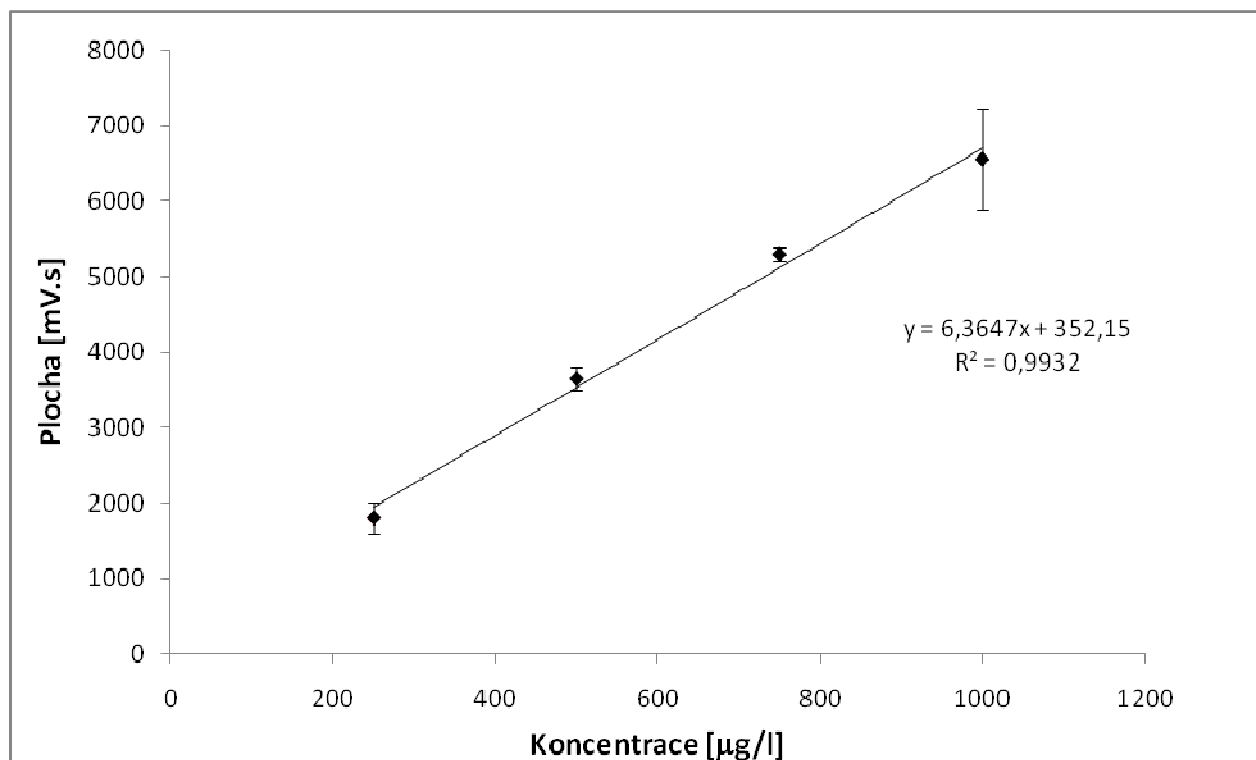


Obr. 15 Buňky kvasinek po dezintegraci na vortexu

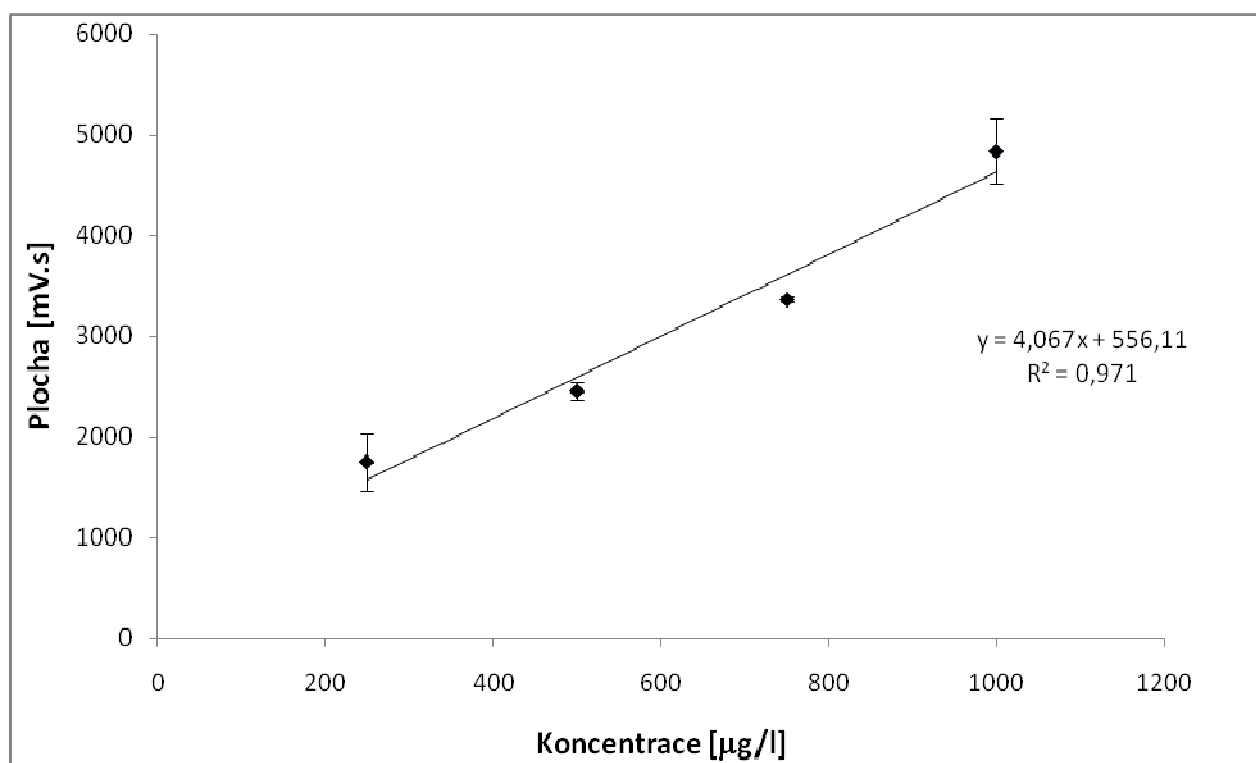
Je zřejmé, že po použití skleněných kuliček a působením vortexu došlo k částečnému rozbití buněk.

Dezintegrované kvasinky byly odstředěny při 3000 rpm po dobu 15 minut. Byl získán supernatant (vzorek A), který obsahoval organické formy specií selenu (selenomethionin) v cytoplasmě a uvnitř buněk. Sediment byl dále zpracováván. K sedimentu bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru a 40 mg enzymu Proteáza XIV. Připravená směs byla protřepávána při 200 rpm po dobu 24 hodin za použití mechanické třepačky. Teplota po celou dobu protřepávání byla udržována na 37 °C. Poté byla směs odstředěna po dobu 15 minut při 3000 rpm. Odstředěný sediment (vzorek B) byl zmineralizován směsí kyseliny dusičné (5 ml 65%) s peroxidem vodíku (2 ml) při laboratorní teplotě. Sediment obsahoval pouze anorganické formy selenu (seleničitan) vázané v buněčných membránách. Druhá odstředěná část, supernatant (vzorek C), byla dekantována a přefiltrována přes 0,45 mm filtr. V supernatantu byly přítomny organické formy selenu (selenomethionin) a také nepatrné množství anorganické formy selenu (seleničitan).

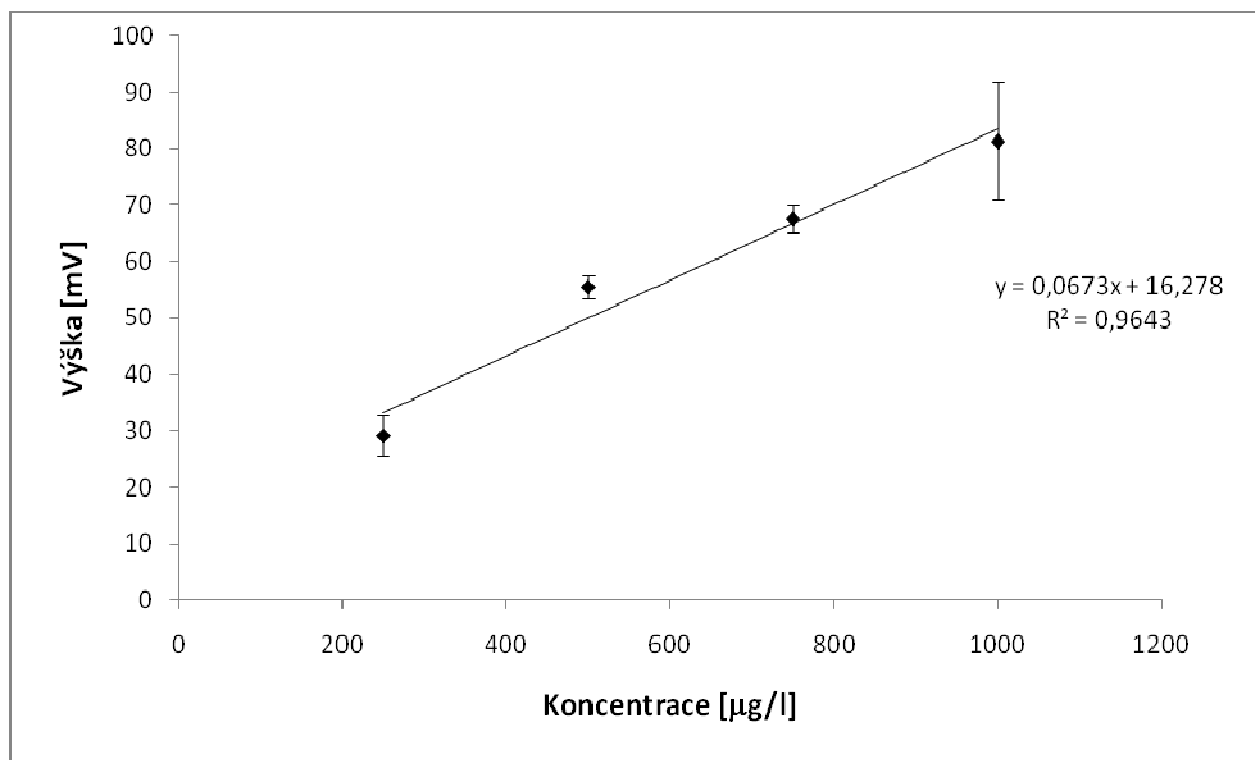
Koncentrace standardních roztoků pro sestavení kalibračních závislostí uvedených v grafech 3 až 6 byly 250 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 750 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Tabulky obsahující hodnoty, ze kterých byly grafy sestaveny, jsou uvedeny v přílohách 2-5. Každý kalibrační roztok byl třikrát proměřen. Kalibrační závislosti byly sestaveny jednak pro plochu píku a také pro výšku píku. Pro výpočet jednotlivých množství specií ve vzorcích byla vybrána kalibrační závislost koncentrace na ploše píku.



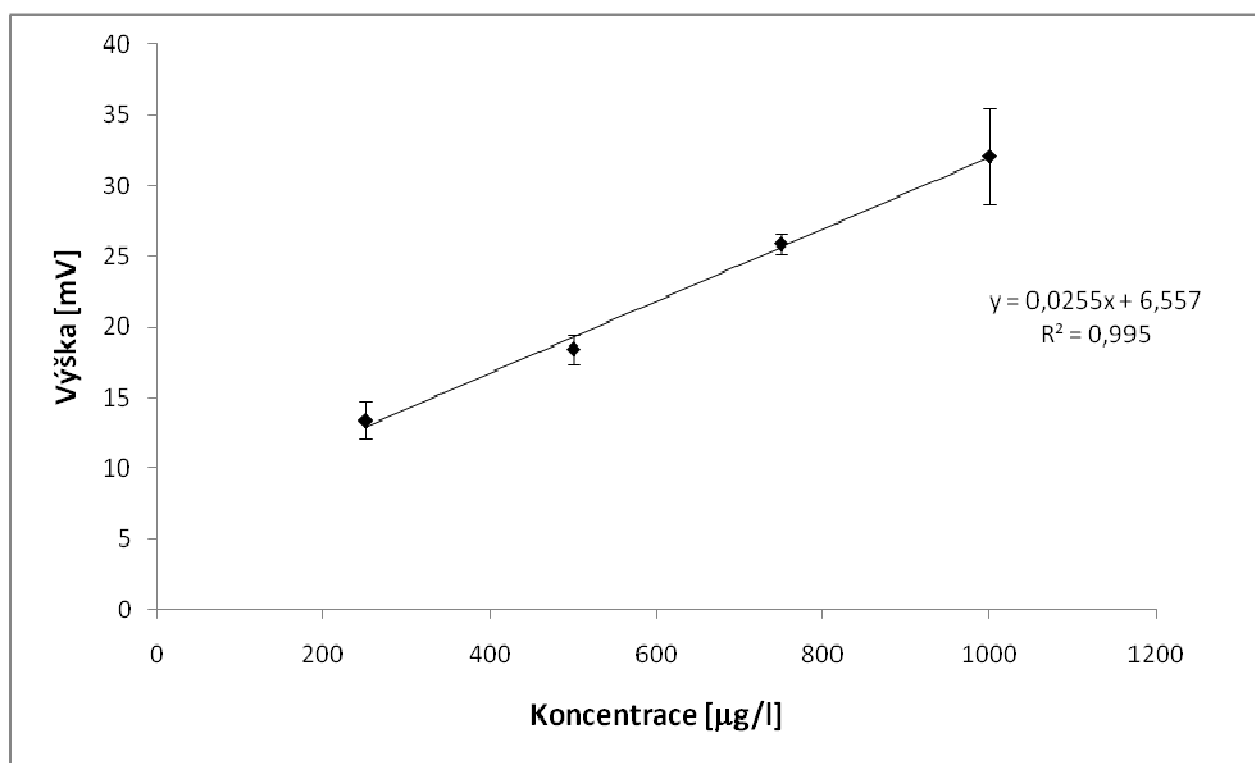
Graf 3 Kalibrační závislost pro seleničitan



Graf 4 Kalibrační závislost pro L-selenomethionin

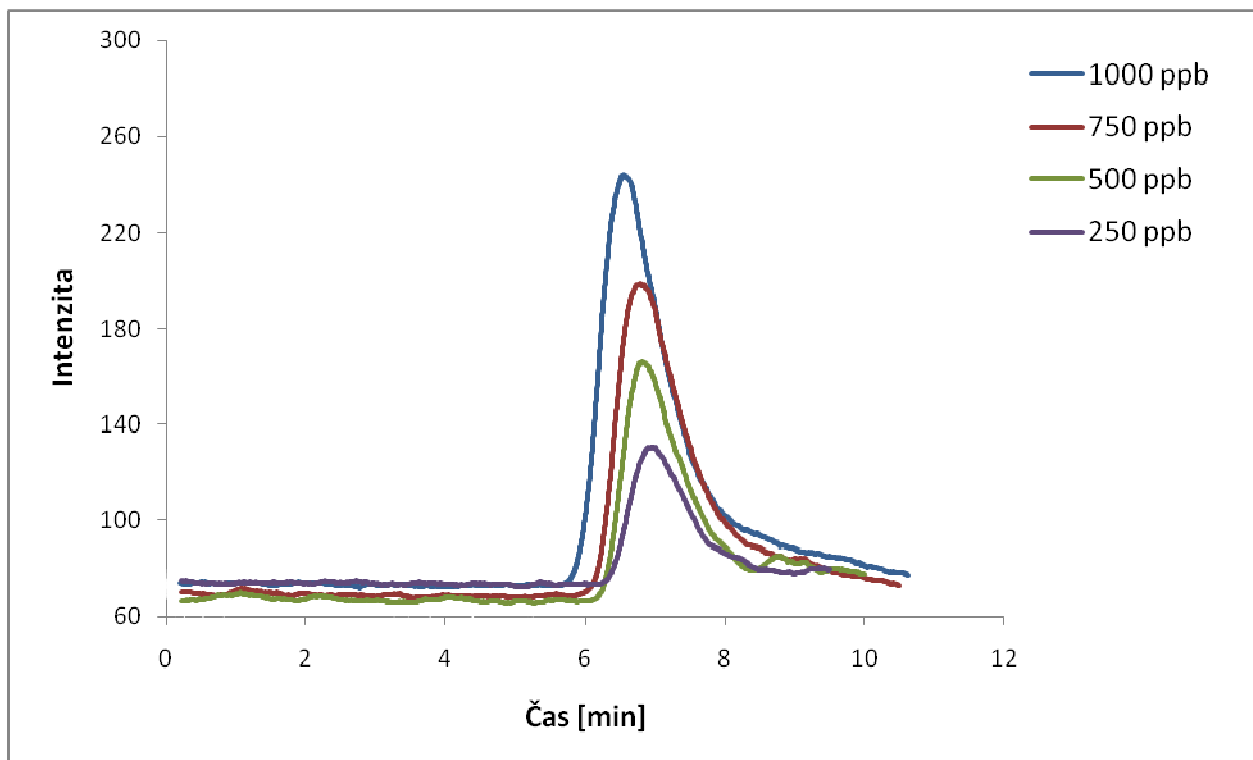


Graf 5 Kalibrační závislost pro seleničitan

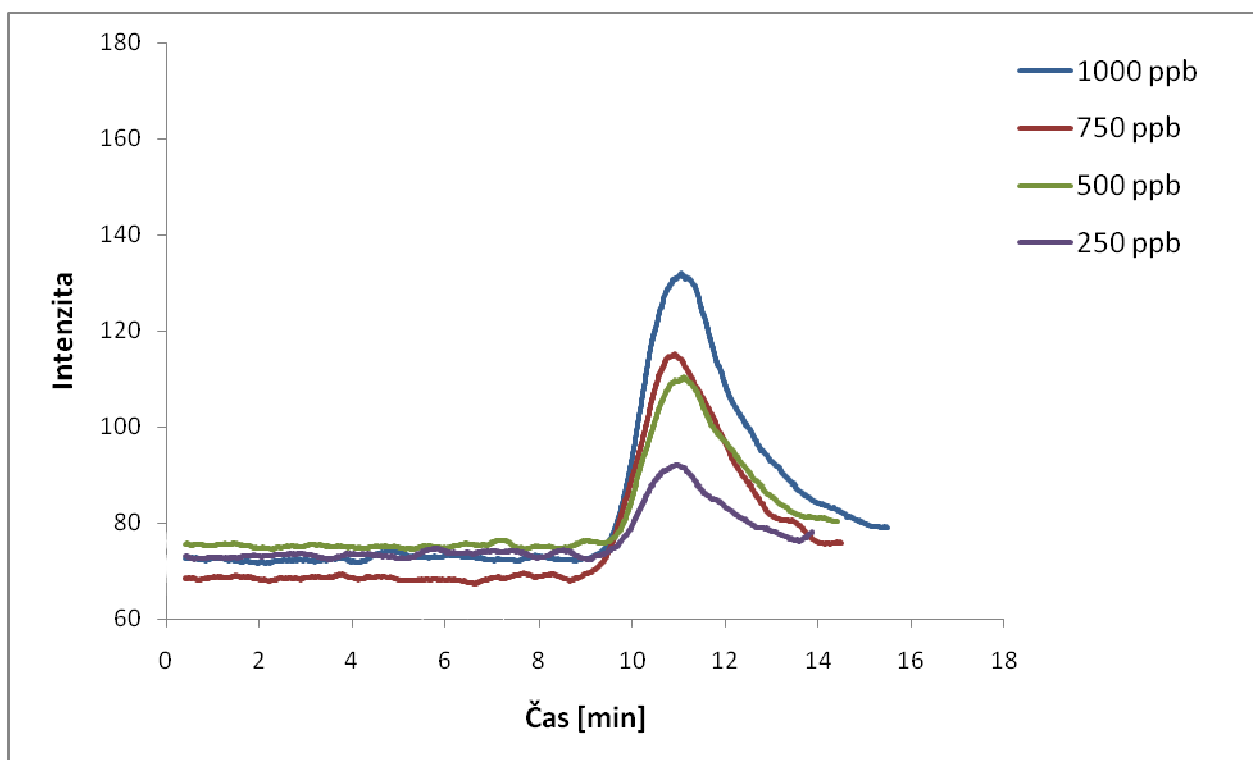


Graf 6 Kalibrační závislost pro L-selenomethionin

Chromatogramy standardních kalibračních roztoků Se^{IV} a SeLMet měřených při různých koncentracích jsou uvedeny v grafech 7 a 8.



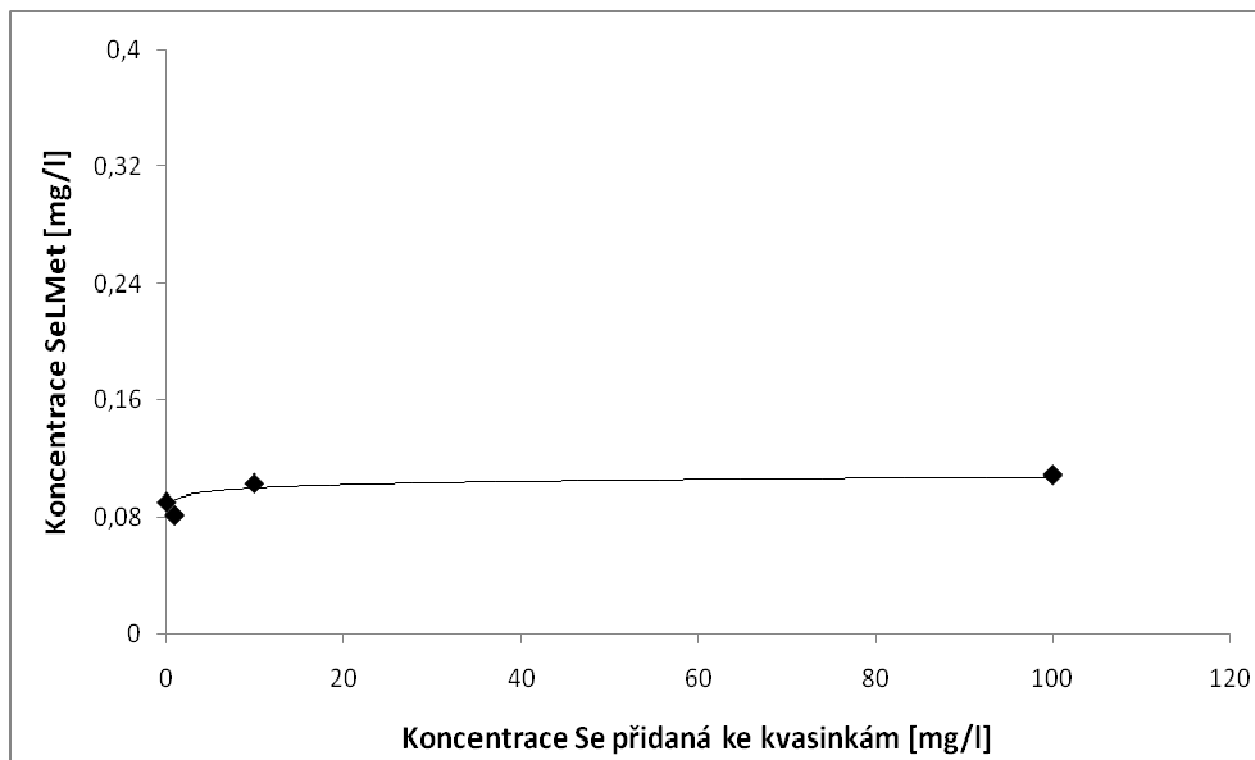
Graf 7 Chromatogram standardních roztoků seleničitanu



Graf 8 Chromatogram standardních roztoků L-selenomethioninu

8.4.1 Analýza specií selenu navázaných uvnitř buněk

Ve vzorku A, kde byly specíe selenu identifikovány uvnitř buněk a v cytoplasmě, se nacházely pouze organické formy selenu (selenomethionin). Vzorky byly analyzovány ve třech paralelních stanoveních.



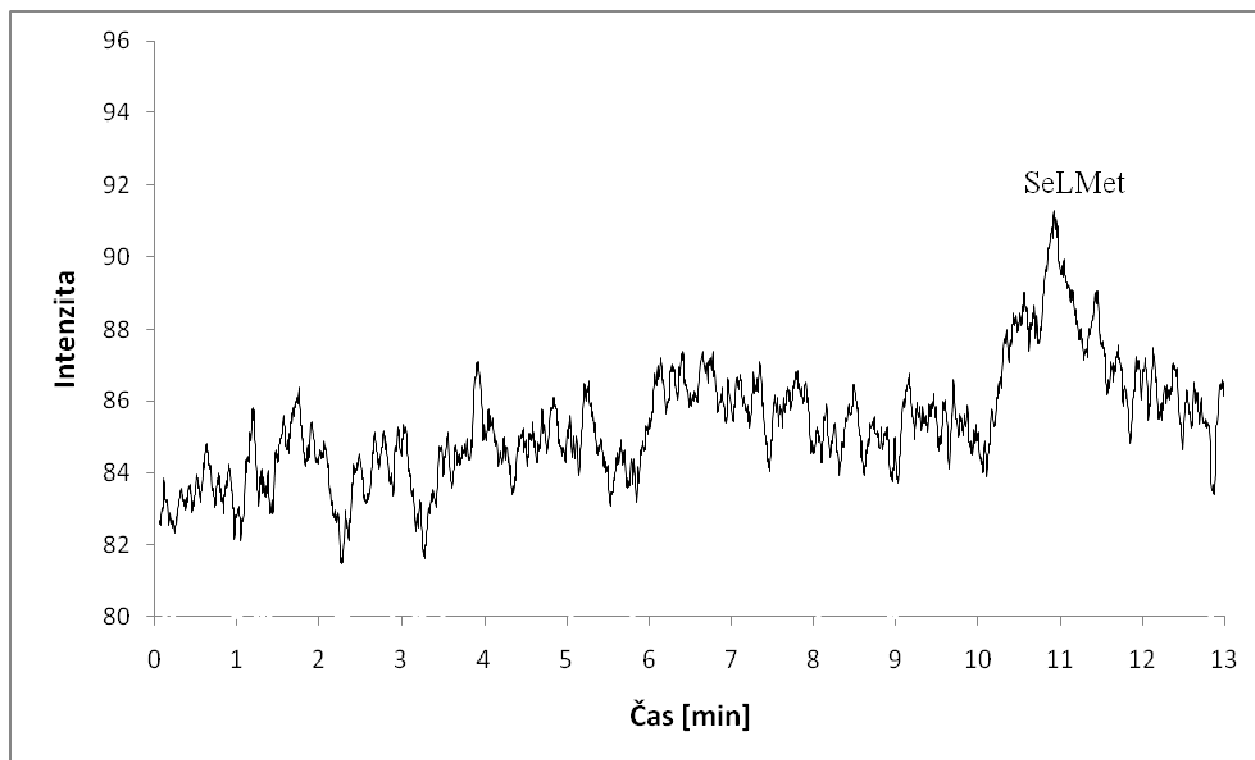
Graf 9 Závislost koncentrace přidané anorganické formy selenu ke kvasinkám a vzniklé organické formy selenomethioninu uvnitř buněk a v cytoplasmě

Z grafu 9 je zřejmé, že se vzrůstající koncentrací anorganické formy selenu přidané ke kvasinkám se koncentrace vzniklé organické formy selenu (zde selenomethionin) dále nezvyšuje. Uvedená závislost je tedy lineární. Příklady chromatogramů stanovovaných vzorků jsou uvedeny v grafech 10 a 11.

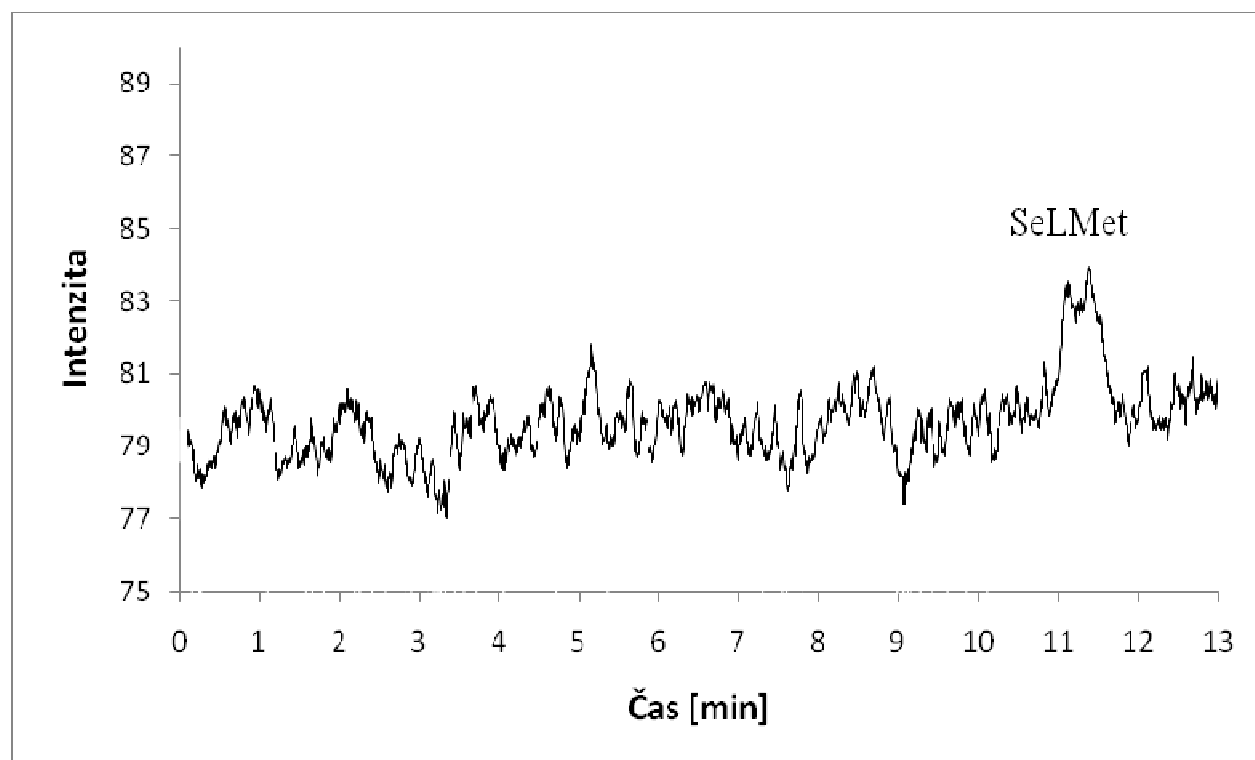
Množství selenomethioninu ve vzorcích se pohybovalo v rozmezí 0,090 mg.l⁻¹ až 0,108 mg.l⁻¹. Výsledky zastoupení organické formy selenu v jednotlivých vzorcích kvasinek jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7 Zastoupení selenomethioninu uvnitř buněk a v cytoplasmě

Vzorek	Specie	Koncentrace [mg/l]			Průměr	s [mg/l]	RSD [%]
		1	2	3			
1	SeLMet	0,090	0,101	0,078	0,090	0,011	12
2	SeLMet	0,076	0,103	0,062	0,081	0,021	25
3	SeLMet	0,072	0,156	0,079	0,102	0,046	45
4	SeLMet	0,106	0,111	0,108	0,108	0,002	2



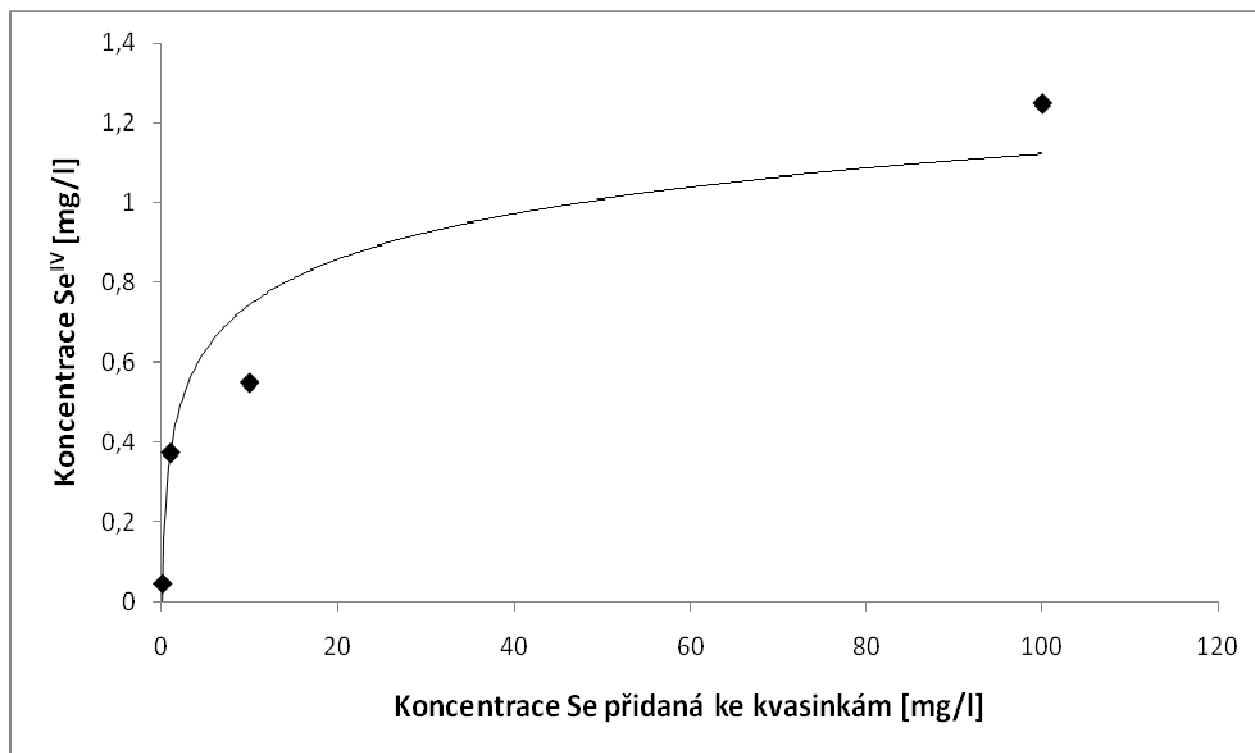
Graf 10 Chromatogram stanovovaného vzorku (specie selenu uvnitř buněk a v cytoplazmě)



Graf 11 Chromatogram stanovovaného vzorku (specie selenu uvnitř buněk a v cytoplazmě)

8.4.2 Analýza specií selenu navázaných na buněčnou membránu

V další části kvasinek (vzorek B), a to v buněčné membráně byla zjištěna přítomnost pouze anorganické formy selenu (seleničitan).



Graf 12 Závislost koncentrace přidané anorganické formy selenu ke kvasinkám a anorganické formy Se^{IV} na buněčných membránách

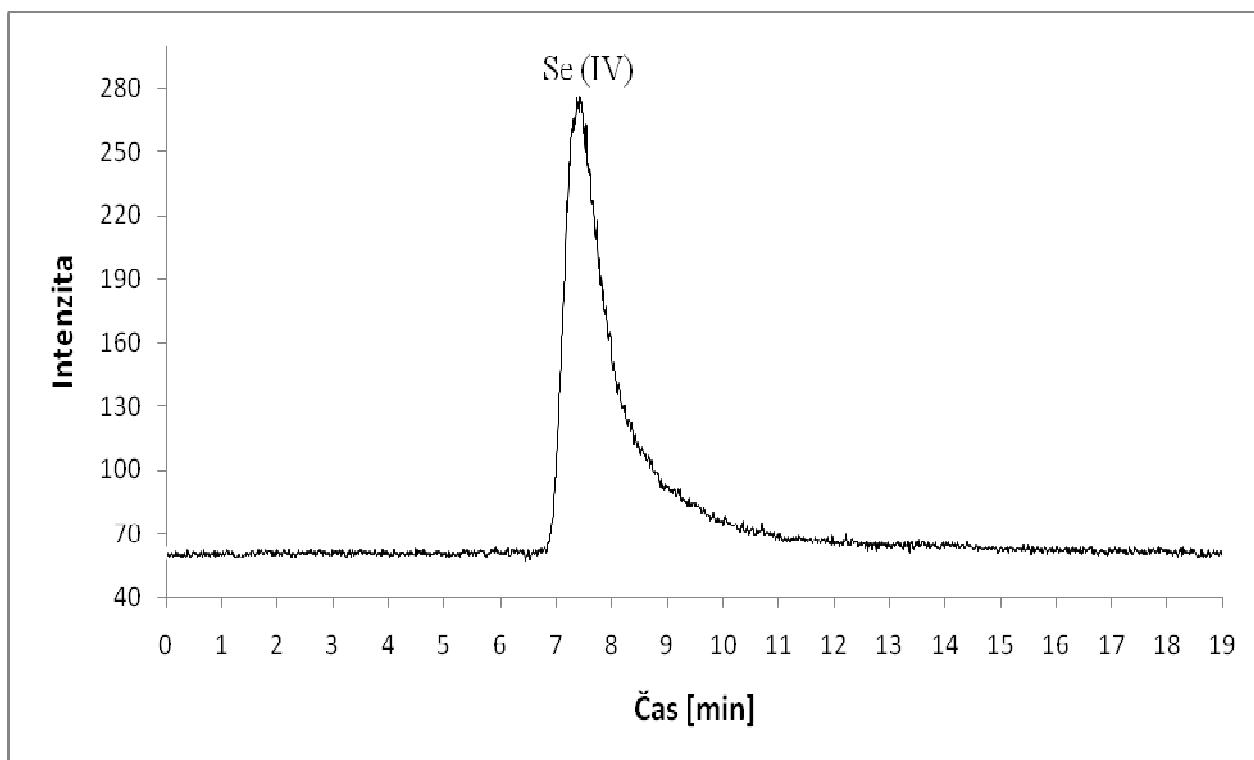
Z uvedeného grafu 12 vyplývá, že s rostoucí koncentrací přidávané anorganické formy selenu ke kvasinkám dochází ke zvyšování koncentrace anorganické formy selenu (seleničitan) uvnitř kvasinek. Uvedená závislost není lineární, a proto nejvyšší použitá koncentrace 100 mg.l⁻¹ Se přidávaná ke kvasinkám může způsobit zpomalení sorpce anorganické formy selenu do kvasinek. Dá se předpokládat, že takto vysoká koncentrace může na kvasinky působit stresově.

V této části byl k extrakci použit enzym Proteáza XIV. Příklady chromatogramů analyzovaných vzorků jsou uvedeny v grafech 13 a 14. Koncentrace Se^{IV} v analyzovaných vzorcích se pohybovala od 0,044 mg.l⁻¹ do 1,247 mg.l⁻¹.

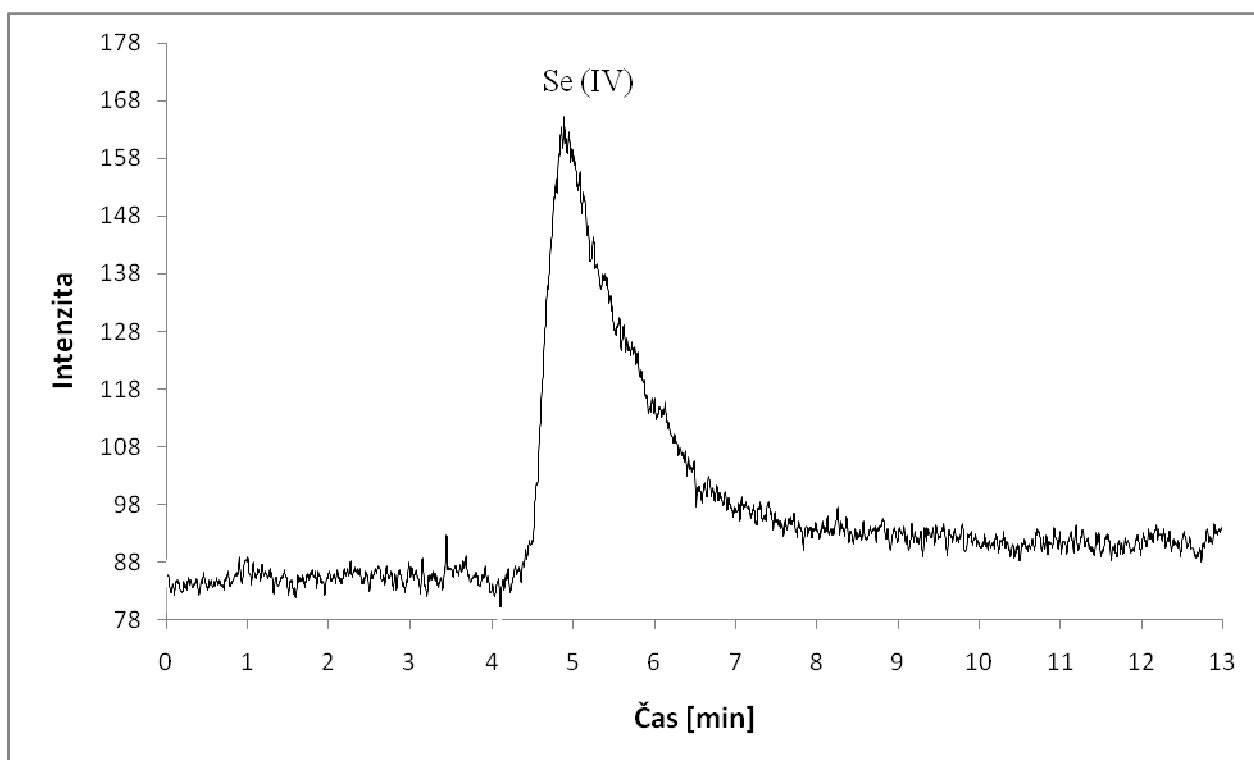
Výsledky zastoupení anorganické formy selenu (seleničitan) jsou přehledně uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8 Zastoupení seleničitanu navázaného na buněčných membránách

Vzorek	Specie	Koncentrace [mg/l]				s [mg/l]	RSD [%]
		1	2	3	Průměr		
1	Se ^{IV}	0,045	0,043	0,044	0,044	0,001	2
2	Se ^{IV}	0,427	0,327	0,362	0,373	0,051	13
3	Se ^{IV}	0,585	0,597	0,466	0,549	0,072	13
4	Se ^{IV}	1,089	1,379	1,272	1,247	0,146	11



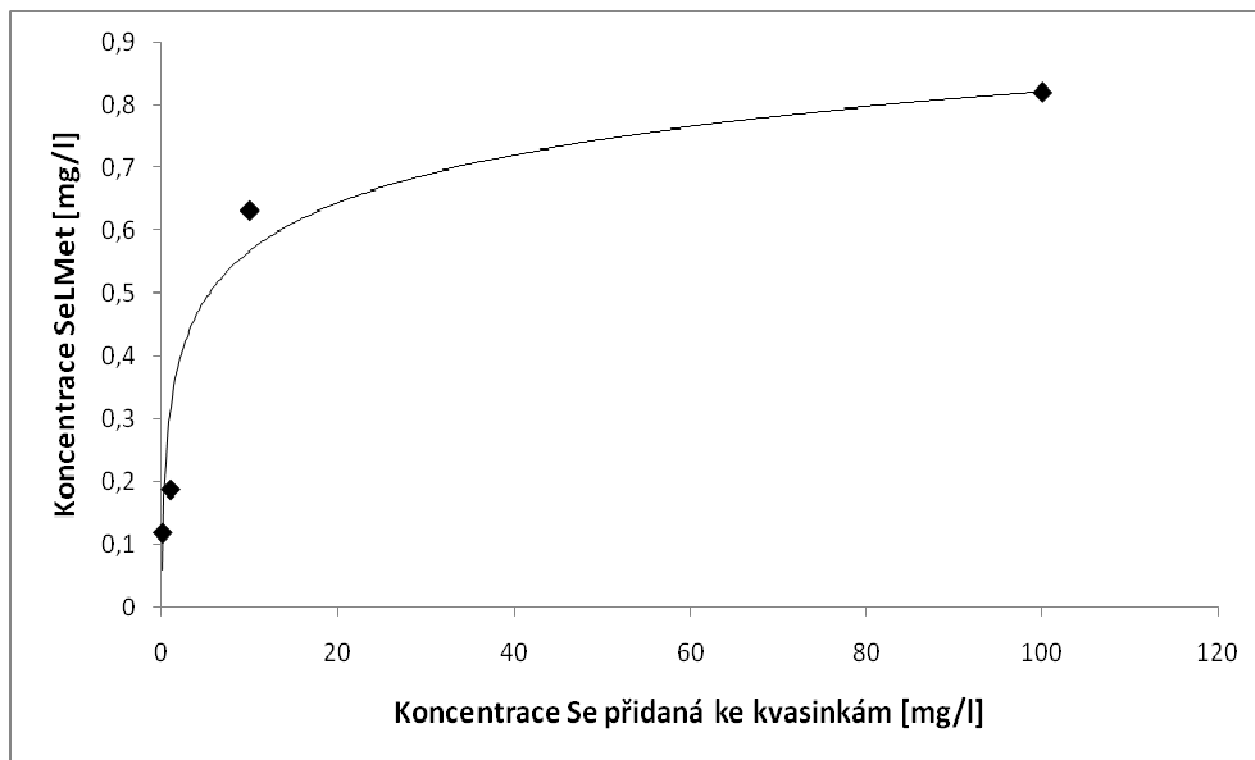
Graf 13 Chromatogram stanovovaného vzorku (specie selenu navázané na buněčné membrány)



Graf 14 Chromatogram stanovovaného vzorku (specie selenu navázané na buněčné membrány)

8.4.3 Analýza specií selenu navázaných na bílkovinné struktury

Ve třetí části kvasinek (vzorek C), tedy v bílkovinných strukturách podrobených enzymu Proteáza XIV byly identifikovány organické formy selenu (selenomethionin) a také nepatrné koncentrace anorganické formy selenu (seleničitan).



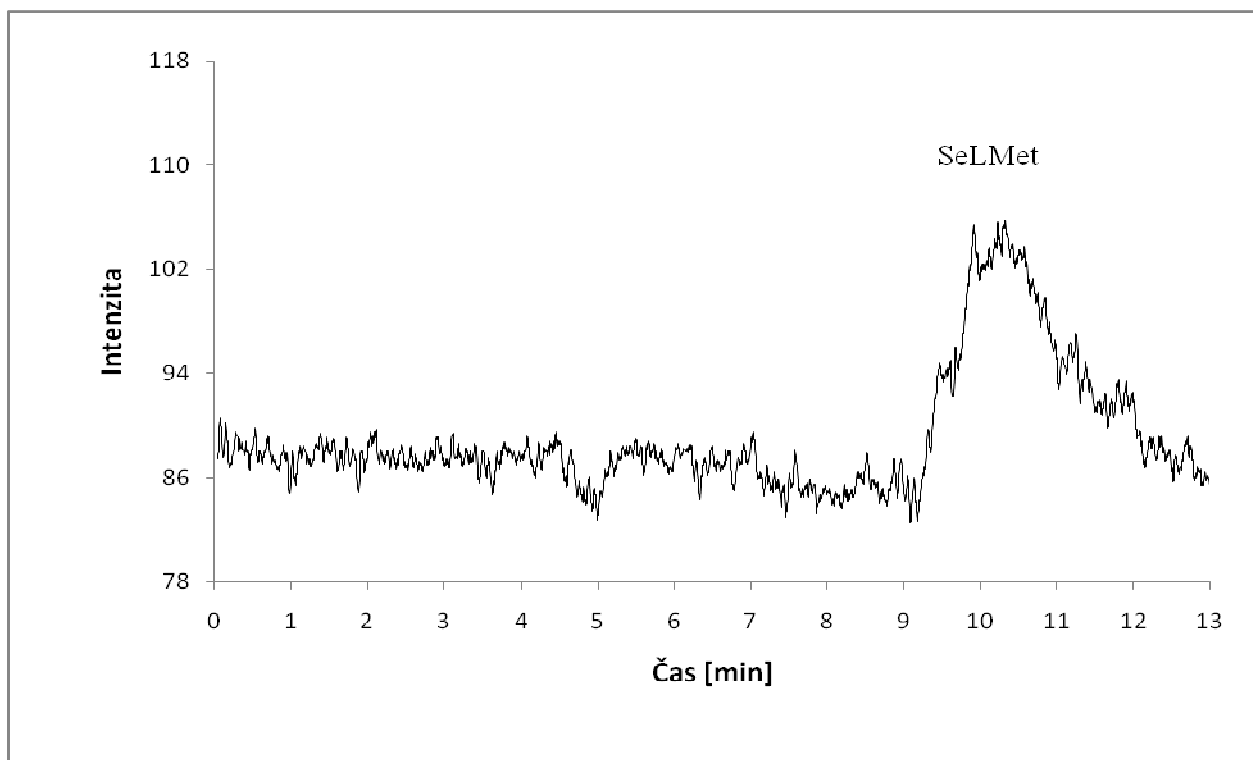
Graf 15 Závislost koncentrace přidané anorganické formy selenu ke kvasinkám a vzniklé organické formy selenu selenomethioninu navázaného na bílkovinné struktury

Z výše uvedeného grafu 15 je patrné, že při postupném zvyšování koncentrací přidávané anorganické formy selenu ke kvasinkám se zvyšuje koncentrace vzniklé organické formy selenu (selenomethionin) uvnitř kvasinek. V této části byl použit k extrakci enzym Proteáza XIV. Příklady chromatogramů stanovovaných vzorků jsou uvedeny v grafech 16 a 17.

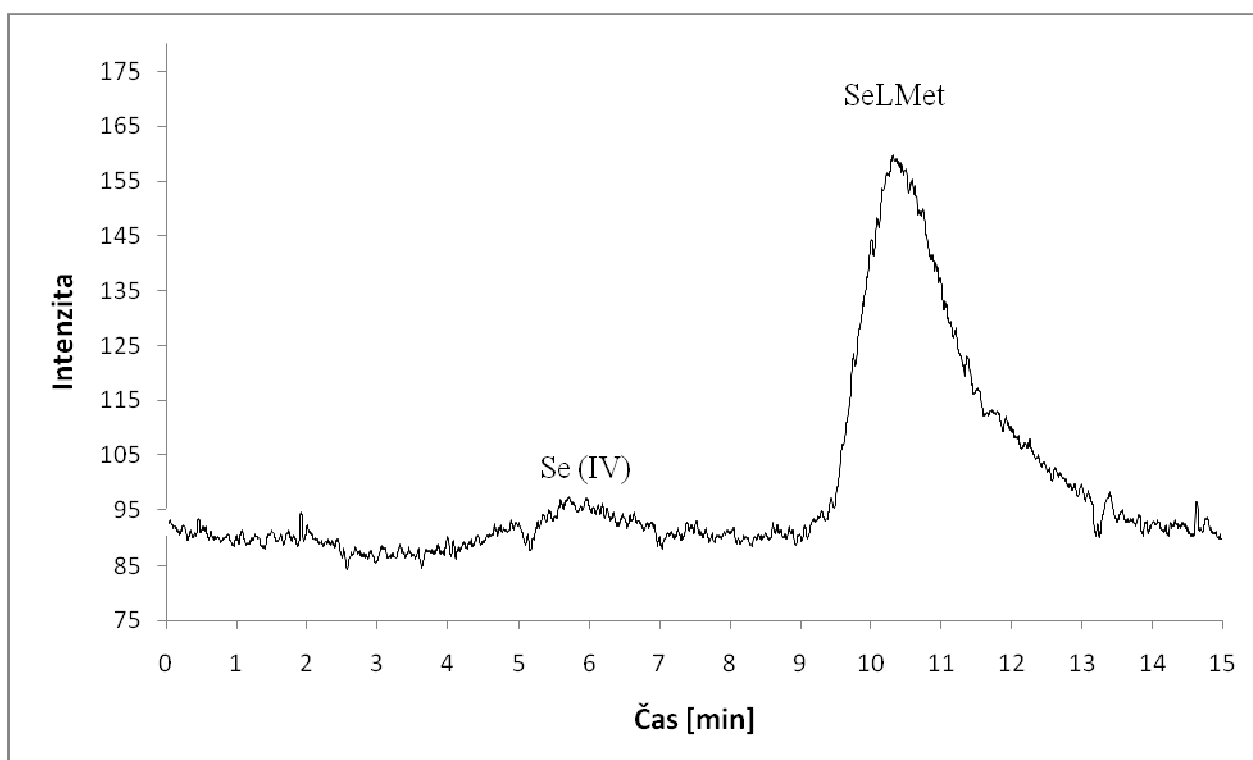
V tabulce 9 jsou shrnuty výsledky zastoupení organických forem selenu navázaných na bílkovinné struktury v kvasinkách.

Tab. 9 Zastoupení selenomethioninu v bílkovinných strukturách

Vzorek	Specie	Koncentrace [mg/l]				s [mg/l]	RSD [%]
		1	2	3	Průměr		
1	SeLMet	0,119	0,119	0,119	0,119	0,001	0,3
2	SeLMet	0,148	0,203	0,213	0,188	0,035	18,6
3	SeLMet	0,465	0,606	0,825	0,632	0,181	28,6
4	SeLMet	0,809	0,853	0,798	0,820	0,028	3,5



Graf 16 Chromatogram stanovovaného vzorku (specie selenu navázané na bílkovinné struktury)



Graf 17 Chromatogram stanovovaného vzorku (specie selenu navázané na bílkovinné struktury)

9 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení jednotlivých specií selenu v kvasinkách, které byly kultivovány v médiu s přídatkem selenu. Kultivace probíhala s koncentracemi $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$; $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$; $10,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $100,0 \text{ mg.l}^{-1}$ anorganické formy selenu (seleničitan sodný). Složení kultivačního média, kultivační podmínky a rozmezí koncentrací selenu bylo převzato z odborného článku cit. [45]. Speciační analýza byla provedena ve všech částech extrahovaných kvasinek.

Příznivé účinky selenu na lidský organismus jsou závislé na koncentraci selenu a na chemické formě, ve které se selen nachází. Na chemické formě, ve které je selen přítomen například v potravních doplňcích, je závislá jeho nutriční dostupnost. Organické formy selenu se v trávicím traktu resorbují až z 97 % aktivním transportem, zatímco anorganické formy selenu se resorbují pasivně. Selenový potravinový doplněk poskytuje selen v anorganické formě jako selenit nebo selenát nebo v organické formě od chelátů až po čistý L-selenomethionin. Selen v organické formě je účinnější než anorganický selen, protože hlavní složka organického selenu je selenomethionin, který se skládá v tělesném proteinu a je podle potřeby k dispozici. Správné selenové kvasinkové produkty jsou založeny na specifických kmenech kvasinek kultivovaných v prostředí s vysokým obsahem selenu. Selenové kvasinky koncentrují selen v přirozené formě, která je snadno stravitelná, absorbovaná, metabolizovaná a ukládaná.

V diplomové práci bylo prokázáno, že po přídatku anorganické formy selenu (seleničitan sodný) ke kvasinkám a působením metabolismu přeměny u kvasinek, došlo ke vzniku organické formy selenu (selenomethionin) uvnitř kvasinek.

Pro speciační analýzu selenu bylo použito spojení metod HPLC a HG-AFS. Byla prováděna optimalizace pH mobilní fáze v rozmezí hodnot pH 6,0-6,8. Jako nejvhodnější bylo vyhodnoceno pH 6,4, kdy došlo k úplnému rozdělení píků všech stanovovaných specií. Podmínky měření jednotlivých specií na přístroji HG-AFS byly převzaty z manuálu přístroje Millennium Excalibur a nebyla prováděna optimalizace.

Po kultivaci bylo změřeno celkové množství selenu v odstředěném kultivačním médiu (supernatant). Bylo zjištěno, že sorpce selenu do kvasinek se pohybuje okolo 50 %.

Sediment (odstředěné kvasinky oddělené od kultivačního média) byl zamražen na $-24 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Před navážením byl sediment usušen při 105°C do konstantní teploty. Navážené množství kvasinek bylo extrahováno fosfátovým pufrům a enzymem Proteáza XIV. Specie selenu byly stanoveny ve všech částech extrahovaných kvasinek.

V první části, tedy supernatantu (vzorek A), po dezintegraci buněk byla identifikována organická forma selenu (selenomethionin). Koncentrace zjištěné organické formy selenu se pohybovala od $0,090 \text{ mg.l}^{-1}$ do $0,108 \text{ mg.l}^{-1}$. Bylo zjištěno, že se vzrůstající koncentrací přidávané anorganické formy selenu ke kvasinkám se nezvyšuje koncentrace vzniklé organické formy uvnitř buněk a v cytoplazmě kvasinek.

Druhá část, tedy sediment (vzorek B), po dezintegraci, extrakci Proteázou XIV a mineralizaci obsahovala pouze anorganické formy selenu (seleničitan). Množství seleničitanu bylo v rozmezí $0,044 \text{ mg.l}^{-1}$ až $1,247 \text{ mg.l}^{-1}$.

Ve třetí části z kvasinek v supernatantu (vzorek C) byly identifikovány organické formy selenu navázané na bílkovinné struktury buněčných membrán, extrahované pomocí Proteázy XIV. Tato frakce obsahovala organické formy selenu (selenomethionin) a nepatrné množství anorganické formy selenu (seleničitan). Stanovené koncentrace organické formy selenu selenomethioninu se pohybovaly od 0,119 mg.l⁻¹ do 0,820 mg.l⁻¹.

Stanovením chemických forem selenu v kvasinkách, kultivovaných v médiu s přídavkem selenu se zabývalo mnoho studií a výzkumů, avšak málo je známo o metabolismu přeměny a lokalizaci organických specií v kvasinkách. Tato práce je pilotní studií a zabývá se výskytem anorganických forem selenu či organických forem selenu v různých částech kvasinek. Předmětem dalších analýz v návaznosti na tuto práci by proto mohl být výzkum metabolismu přeměny anorganické formy selenu na organickou formu selenu.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [2] PEDRERO, Z., MADRID, Y.: Novel approaches for selenium speciation in foodstuff and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2009, vol. 634, pp. 135-152. ISSN 0003-2670.
- [3] MACH, I a kol.: *Doplňky stravy*. 1. vyd. Praha: SVOBODA SERVIS, 2004. 157 s. ISBN 80-86320-34-0.
- [4] KOPLÍK, R., ČURDOVÁ, E., MESTEK, O.: Speciace stopových prvků ve vodách, půdách, sedimentech a biologických materiálech. *Chemické listy*, 1997, kap. 91, s. 38-47. ISSN 0009-2770.
- [5] SZPUNAR, J., LOBINSKI, R.: *Hyphenated Techniques in speciation analysis*. 1.st.ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. 216 p. ISBN 0-85404-545-7.
- [6] LOBINSKI, R., SZPUNAR, J.: Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. *Analytica Chimica Acta*, 1999, vol. 400, pp. 321-332. ISSN 0003-2670.
- [7] IUPAC *Compendium of chemical terminology* [online]. 2010 [cit. 2010-02-18]. Dostupné z www: <<http://www.iupac.org/publications/compendium/S.html>>.
- [8] KUBOVÁ, J. a kol.: *Špeciácia, špeciálna analýza a frakcionácia chemických prvkov v životnom prostredí*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2008. 224 s. ISBN 978-80-223-2540-0.
- [9] SASAKURA, C., SUYUKI, K.T.: Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *Journal of inorganic biochemistry*, 1998, vol. 71, pp. 159-162. ISSN 0162-0134.
- [10] IUPAC Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry*, 2000, vol. 72, no. 8, pp. 1453-1470. ISSN 1365-3075.
- [11] FLORENCE, T.M.: The speciation of trace elements in waters. *Talanta*, 1982, vol. 29, pp. 345-364. ISSN 0039-9140.
- [12] ALAEJOS, M.S., ROMERO, F.J.D., ROMERO, C.D.: Selenium and Cancer: Some nutritional Aspects. *Elsevier Science Inc.*, 2000, vol. 16, pp. 376-383. ISSN 0899-9007.
- [13] AMOAKO, P.O., UDEN, P.C., TYSON J.F.: Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. *Analytica Chimica Acta*, 2009, vol. 652, pp. 315-323. ISSN 0003-2670.

- [14] ARTEEL, G.E., SIES, H.: The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2001, vol. 10, pp. 153-158. ISSN 1382-6689.
- [15] PEREZ-CORONA, T., MADRID, Y., CAMARA, C.: Evaluation of selective of selenium (Se(IV) and Se(VI)) and antimony (Sb(III) and Sb(V)) species by baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *Analytica Chimica Acta*, 1997, vol. 345, pp. 249-255. ISSN 0003-2670.
- [16] PRIBELA, A.: *Analýza potravín*. 2. vyd. Bratislava: Slovenská Technická univerzita v Bratislavě, 1991. 58 s. ISBN 80-227-0398-2.
- [17] PROBELA, A.: *Analýza potravín – cvičenie*. 2. vyd. Bratislava: Slovenská Technická univerzita v Bratislavě, 1991. 394 s. ISBN 80-227-0398-2.
- [18] ZBÍRAL, J.: *Analýza rostlinného materiálu – jednotné metodické postupy*. 1. vyd. Brno: SKZÚZ, 1994. s.
- [19] KRAKOVSKÁ, E., KUSS, H.M.: *Rozklady v analytické chemii*. 1. vyd. Košice: Vienala, 2001. 226 s. ISBN 80-88922-48-8.
- [20] MOTLOVÁ, T.: *Analýza prvků v potravních doplňcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2008. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vitoulová, Ph.D.
- [21] CAPELO, J.L., FERNANDEZ, C., PEDRAS, B., SANTOS, P., GONZALEZ, P., VAZ, C.: Trends in selenium determination/speciation by hyphenated techniques based on AAS or AFS. *Talanta*, 2006, vol. 68, pp. 1442-1447. ISSN 0039-9140.
- [22] GOMÉZ-ARIZA, J.L., CARO DE LA TORRE, M.A., GIRÁLDEZ, I., MORALES, E.: Speciation analysis of selenium compounds in yeasts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-microwave-assisted digestion-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 524, pp. 305-314. ISSN 0003-2670.
- [23] ENCINAR, J.R., ŚLIWKA-KASZYŃSKA, M., POLATAJKO, A., VACCHINA, V., SZPUNAR, J.: Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 500, pp. 171-183. ISSN 0003-2670.
- [24] KAHAKACHCHI, CH., BOAKYE, H.T., UDEN, P.C., TYSON, J.F.: Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (India mustard) and in selenized yeast. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, pp. 303-312. ISSN 0021-9673.

- [25] CHASSAIGNE, H., CHÉRY, C.C., BORDIN, G., RODRIGUEZ, A.R.: Development of new analytical methods for selenium speciation on selenium-enriched yeast material. *Journal of Chromatography*, 2002, vol. 976, pp. 409-422. ISSN 0021-9673.
- [26] LIANG, L., MO, S., ZHANG, P., CAI, Y., MOU, S., JIANG, G., WEN, M.: Selenium speciation by high-performance anion-exchange chromatography-post-column UV irradiation coupled with atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1118, pp. 139-143. ISSN 0021-9673.
- [27] CASIOT, C., SZPUNAR, J., LOBINSKI, R., POTIN-GAUTIER, M.: Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 1999, vol. 14, pp. 645-650. ISSN 0267-9477.
- [28] SÉBY, F., GAUTIER, P., LESPÉS, G., ASTRUC, M.: Selenium speciation in soils after alkaline extraction. *The Science of the Total Environment*, 1997, vol. 207, pp. 81-90. ISSN 0048-9697.
- [29] VINAS, P., LÓPEZ-GARCÍA, I., MERINO-MERONO, B., CAMPILLO, N., HERNÁNDEZ-GÓRDOBA, M.: Determination of selenium species in infant formulas and dietetic supplements using liquid chromatography-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 535, pp. 49-56. ISSN 0003-2670.
- [30] GILON, N., POTIN-GAUTIER, M., ASTRUC, M.: Optimization of the determination of inorganic and organic selenium species using high-performance liquid chromatography-electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1996, vol. 750, pp. 327-334. ISSN 0021-9673.
- [31] GUERIN, T., ASTRUC, A., ASTRUC, M.: Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques. *Talanta*, 1999, vol. 50, pp. 1-50. ISSN 0039-9140.
- [32] TSOPELAS, F.N., OCHSENKÜHN-PETROPOULOU, M.TH., MERGIAS, I.G., TSAKANIKI, L.V.: Comparison of ultra-violet and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for the on-line quantification of selenium species after their separation by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 538, pp. 327-333. ISSN 0003-2670.
- [33] VILANO, M., PADRO, A., RUBIO, R., RAURET, G.: Organic and inorganic selenium speciation using high-performance liquid chromatography with UV irradiation and hydride generation-quartz atomic absorption spectrometric detection. *Journal of chromatography A*, 1998, vol. 819, pp. 211-220. ISSN 0021-9673.
- [34] IPOLYI, I., STEFÁNKA, Z., FODOR, P.: Speciation of Se(IV) and the selenoamino acids by high-performance liquid chromatography-direct hydride generation-atomic

- fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2001, vol. 435, pp. 367-375. ISSN 0003-2670.
- [35] ŠTULÍK, K. a kol.: *Analytické separační metody*. 1.vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [36] VOLKA, K. a kol.: *Analytická chemie II*. 1.vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [37] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dopl. vyd. Ostrava: Nakladatel Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [38] SHADESH, J. K.: *HPLC: practical and industrial applications*. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 461 s. ISBN 0-8493-0003-7.
- [39] *Schéma HPLC sestavy* [online]. 2010 [cit. 2010-02-17]. Dostupný z www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/figures/chromatografie_kapalinova.schema.01.gif>.
- [40] KOMÁREK, J.: *Atomová absorpční spektrometrie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2000. 85 s. ISBN 80-210-2500-X.
- [41] DĚDINA, J., TSALEV, D.L.: *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. 1. vyd. Chichester: Waley and Sons Ltd, 1995. 513 s. ISBN 0-471-95364-4.
- [42] KOLEKTIV AUTORŮ: *Atomová absorpční spektrometrie – Sborník přednášek z kurzu*. 2. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2003. 170 s. ISBN 80-86380-16-5.
- [43] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolium, 2004. 166 s. ISBN 80-246-0776-X.
- [44] ČERNOHORSKÝ, T., JANDERA, P.: *Atomová spektrometrie*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. 218 s. ISBN 80-7194-114-X.
- [45] SUHAJDA, A., HEGOCZKI, J., JANZCO, B., PAIS, I., VERECZKEY, G.: Preparation of selenium yeast I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements*, 2000, vol. 14, pp. 43-47. ISSN 0946-672X.
- [46] AMOAKO, P.O., UDEN, P.C., TYSON, J.F.: Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. *Analytica Chimica Acta*, 2009, vol. 652, pp. 315-323. ISSN 0003-2670.
- [47] PONCE DE LEÓN, C.A., BAYÓN, M.M., PAQUIN, C., CARUSO, J.A.: Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 92, pp. 602-610. ISSN 1365-2672.

- [48] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. a kol.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1. vyd. Praha: Academia, 1986. 376 s. ISBN 21-023-86.
- [49] *Laboratorní fermentor BIOSTAT B* [online]. 2010 [cit.2010-04-20]. Dostupný z www: <<http://www.labtrader.com/image/inventory/be5925d84d1917425d70961d9bc5afe3.jpg>>.
- [50] GÓMEZ-ARIZA, J.L., SÁNCHEZ-RODAS, D., MORALES, E., HERRGOTT, O., MARR, I.L.: Inorganic and Organic Selenium Compound Speciation with Coupled HPLC-MW-HG-AFS. *Appl. Organometal. Chem.*, 1999, vol. 13, pp. 738-787. ISSN 0268-2605.
- [51] DOUŠA, M.: *Validační program pro statistické zpracování analytických dat* [online]. 2010, [cit. 07-04-2010]. Dostupné z www: <<http://www.hplc.sweb.cz>>.
- [52] *Struktura kvasinky* [online]. 2010 [cit.2010-04-28]. Dostupný z www: <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/ILCA_Manual4/images/FIG%2011%20P19.gif>.

11 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
CCP	Excitace v kapacitně vázaném plazmatu
CZE MS/MS	Kapilární zónová elektroforéza a tandemová hmotnostní spektrometrie s elektrozmlžovačem
CZE-ICP-MS	Kapilární zónová elektroforéza s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
DCP	Přímé-aktuální plazma
ECD	Detektor elektronového záhytu
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EI	Elektronová ionizace
ETA	Elektrotermická atomizace
ETAAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
FI	Průtoková injekční analýza
FID	Plamenová ionizace
GC	Plynová chromatografie
GC AAS	Plynová chromatografie s atomovou absorpční spektrometrií
GC-MIP-AES	Plynová chromatografie s atomovou emisní spektrometrií s mikrovlnně vázaným plazmatem
GHAAS	Atomová absorpční spektrometrie s generací hydridů
GHAFS	Atomová fluorescenční spektrometrie s generací hydridů
HG	Generace hydridů
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-HG-AFS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s atomovou fluorescenční spektrometrií s generací hydridů
HPLC-ICP-MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií s generací hydridů
ICP	Indukčně vázané plazma
ICP AES	Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IUPAC	Mezinárodní spojení čisté a aplikované chemie
LC	Kapalinová chromatografie
MIP	Mikrovlnami indukované plazma
MFS	Molekulární fluorescenční spektrometrie
OES	Optická emisní spektrometrie
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
QCAAS	Atomová absorpční spektrometrie s křemennou celou
SDS	Dodecyl sulfát sodný
TMAH	Tetramethylamonium hydroxid

12 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Hodnoty kalibrační závislosti pro stanovení celkového selenu metodou ICP MS
- Příloha 2 Hodnoty kalibrační závislosti pro seleničitan sodný (plocha píku)
- Příloha 3 Hodnoty kalibrační závislosti pro L-selenomethionin (plocha píku)
- Příloha 4 Hodnoty kalibrační závislosti pro seleničitan sodný (výška píku)
- Příloha 5 Hodnoty kalibrační závislosti pro L-selenomethionin (výška píku)

13 PŘÍLOHY

Příloha 1 Hodnoty kalibrační závislosti pro stanovení celkového selenu metodou ICP MS

Koncentrace [µg/l]	Intenzita			Průměr	SD [mV]	RSD [%]
	1	2	3			
0	0	0	0	0	0	0
10	1815,18	1917,20	1900,19	1877,52	54,66	2,91
50	9123,57	9203,65	9092,54	9139,92	57,33	0,62
100	18458,72	18353,50	18427,65	18413,29	54,06	0,29
200	35951,95	35494,15	36254,14	35900,08	382,64	1,06

Příloha 2 Hodnoty kalibrační závislosti pro seleničitan sodný (plocha píku)

Koncentrace [µg/l]	Plocha píku [mV.s]			Průměr	SD [mV.s]	RSD[%]
	1	2	3			
250	1574,74	1898,84	1949,60	1807,72	203,36	11,25
500	3522,91	3610,58	3816,36	3649,95	150,63	4,13
750	5202,95	5392,06	5309,97	5301,66	94,82	1,79
1000	5853,39	7164,85	6665,09	6561,11	661,88	10,09

Příloha 3 Hodnoty kalibrační závislosti pro L-selenomethionin (plocha píku)

Koncentrace [µg/l]	Plocha píku [mV.s]			Průměr	SD [mV.s]	RSD[%]
	1	2	3			
250	1423,85	1937,01	1883,05	1747,97	281,99	16,13
500	2388,08	2548,38	2412,30	2449,59	86,41	3,53
750	3348,98	3343,79	3390,66	3361,14	25,69	0,76
1000	4545,70	4770,21	5184,01	4833,31	323,79	6,69

Příloha 4 Hodnoty kalibrační závislosti pro seleničitan sodný (výška píku)

Koncentrace [µg/l]	Výška píku [mV]			Průměr	SD [mV.s]	RSD[%]
	1	2	3			
250	25,07	30,77	31,63	29,16	3,56	12,22
500	52,98	55,62	57,11	55,23	2,09	3,78
750	68,47	69,26	64,84	67,52	2,35	3,49
1000	69,36	85,78	88,66	81,27	10,41	12,81

Příloha 5 Hodnoty kalibrační závislosti pro L-selenomethionin (výška píku)

Koncentrace [µg/l]	Výška píku [mV]			Průměr	SD [mV.s]	RSD[%]
	1	2	3			
250	12,15	13,21	14,83	13,40	1,35	10,07
500	18,38	17,41	19,52	18,44	1,05	5,71
750	26,11	26,49	25,05	25,89	0,74	2,89
1000	28,69	32,19	35,50	32,13	3,40	10,60